

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA	
Wydział PPT	KATEDRA INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ
Laboratorium	PODSTAWY BIOFOTONIKI
Ćwiczenie nr 3	Komputerowa analiza zdjęć fluorescencyjnych

ZAGADNIENIA WSTĘPNE:

- Absorpcja promieniowania elektromagnetycznego.
- Prawo Lamberta – Beera.
- Luminescencja (fluorescencja, fosforescencja).
- Metody wzbudzania luminescencji.
- Diagram Jabłońskiego.
- Stan singletowy, stan trypletowy.
- Co to jest chromofor?
- Podstawowe chromofory tkankowe.
- Warunek rezonansu.
- Zastosowanie technik luminescencyjnych w diagnostyce medycznej.

CEL ĆWICZENIA:

Zapoznanie się z możliwościami wykorzystania komputerowej analizy informacji obrazowej w optycznej diagnostyce medycznej

1. WPROWADZENIE

Jak wiadomo tkanki charakteryzują się silną anizotropią strukturalną. Jednocześnie skład chemiczny tkanek jest bardzo zróżnicowany, czego konsekwencją jest również obecność w tych strukturach biologicznych substancji posiadających selektywne właściwości absorpcyjne, które odgrywają rolę w oddziaływaniu materii żywej ze światłem. Selektywna absorpcja wykorzystywana jest w spektroskopowych technikach diagnostycznych, nie tylko do charakteryzacji tkanek, ich składu chemicznego, lecz również wykrywania różnego rodzaju zmian patologicznych.

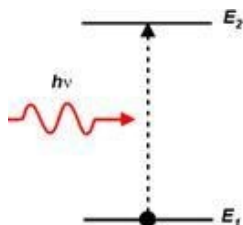
Spektroskopia opisuje zjawiska oddziaływania fali elektromagnetycznej z materią. Do podstawowych zjawisk spektroskopowych należą absorpcja, luminescencja i odbicie.

Wyróżnia się jeszcze inne zjawiska wykorzystywane w metodach pomiarowych, np. luminescencja, rozpraszanie Ramana i Brillouina, foteodbcie i inne, które służą do bardzo subtelnych badań materiałowych. Zależność wielkości absorpcji, natężenia luminescencji i innych wielkości od długości fali lub energii nazywamy widmem. Widma spektroskopowe są charakterystyczne dla danego atomu, cząsteczki lub ciała stałego.

1.1 ABSORPCJA PROMIENIOWANIA ELEKTROMAGNETYCZNEGO

Spektroskopia optyczna jest metoda badawczą służącą do określenia składu oraz np. stężenia różnych związków chemicznych.

Elektrony w atomach mogą przebywać na poziomie podstawowym lub wzbudzonym. Przejście elektronu ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego jest możliwe jedynie wówczas, gdy atom pochłonie pewną porcję energii, czyli ją zaabsorbuje. Ponieważ każdy układ dąży do obniżenia swojej energii, dlatego też po pewnym charakterystycznym dla danego atomu czasie tzw. czasie relaksacji, elektron przejdzie znowu do stanu podstawowego kosztem zdobytego wcześniej nadmiaru energii.



Rys. 1 Proces absorpcji promieniowania elektromagnetycznego [1].

Przejście elektronu ze stanu równowagi do stanu wzbudzenia może nastąpić po pochłonięciu kwantów promieniowania - fotonów. Podejście korpuskularne umożliwia rozpatrywanie powyższych procesów jako konsekwencję oddziaływania pomiędzy atomem i fotonem. Atom podczas zderzenia z fotonem pochłania jego energię, co prowadzi do powstania nadmiaru energii w tym atomie, a to w konsekwencji powoduje wzbudzenie atomu, czyli przeskok elektronu z niższego (stan E_1 na Rys. 1) na wyższy energetycznie poziom kwantowy (stan E_2). Proces ten nazywamy **absorpcją** fotonów rezonansowych. Jak wiadomo fotony różnią się między sobą długością fali i niesioną energią, co sprawia, że nie każdy foton może zostać zaabsorbowany przez atom. Pochłaniane są jedynie te fotony,

których energia odpowiada dokładnie różnicy energii między poziomem podstawowym a wzbudzonym $h\nu = \Delta E = E_2 - E_1$. Warunek ten nazywamy **warunkiem rezonansu**, a ν częstotliwością rezonansową. Ilościowo proces ten jest opisywany współczynnikiem Einsteina B_{12} . Prawdopodobieństwo zaabsorbowania fotonu rezonansowego jest proporcjonalne do gęstości strumienia fotonów, dlatego też zjawisko absorpcji uważamy za zjawisko wymuszone (przez obecność promieniowania) i żargonowo zjawisko to określamy mianem tzw. **pompowania**.

Do opisu absorpcji w cieczach w najprostszym przypadku, gdy mamy duże rozcieńczenie i małe natężenie światła, stosuje się prawo Lamberta – Beera. To prawo odnosi się do substancji absorbujących rozmieszczonych w jakimś nieabsorbującym ośrodku. Wówczas osłabienie A (absorbancja) wiązki świetlnej przechodzącej przez ten ośrodek jest proporcjonalne do koncentracji c_{ab} znajdujących się tam absorberów oraz drogi optycznej d przebytej przez fale świetlne w tym ośrodku:

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon_{ab} c_{ab} d$$

gdzie osłabienie (absorbancja) A jest wielkością bezwymiarową, I_0 jest natężeniem światła padającego, I jest natężeniem światła po przejściu przez ośrodek, ϵ_{ab} to współczynnik absorpcji molowej, c_{ab} to stężenie substancji absorbujących, natomiast d to odległość pomiędzy punktami wejścia i wyjścia światła w ośrodku, czyli droga optyczna.

W wyniku absorpcji następuje osłabienie natężenia promieniowania poprzez zaabsorbowanie części energii niesionej przez strumień fotonów. Związki posiadające właściwości selektywnej absorpcji promieniowania nazywamy **chromoforami** [2]. Prawo absorpcji możemy zapisać w następującej postaci,

$$I = I_0 \exp(-\mu_a d)$$

gdzie padająca na próbkę fala świetlna ma natężenie I_0 , a po przebyciu drogi optycznej równej odpowiednio d natężenie wyjściowe wynosi I . Parametr μ_a oznacza liniowy współczynnik absorpcji wyrażony w cm^{-1} .

Należy pamiętać jednak, że absorpcja promieniowania przez dane substancje zależy od długości fali, a więc współczynnik absorpcji jest wielkością dyspersyjną $\mu_a=f(\lambda)$.

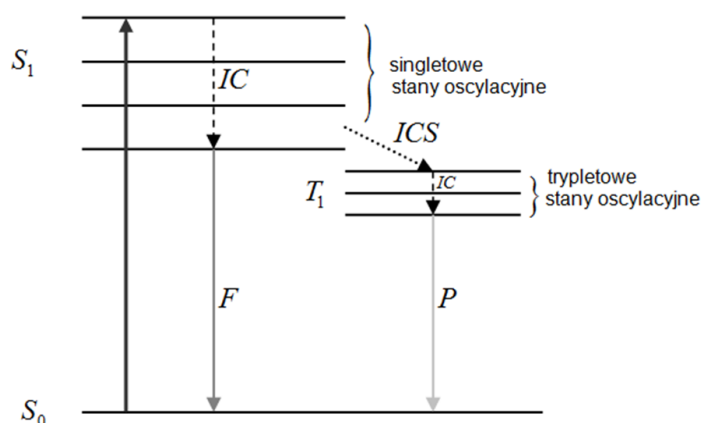
1.2 LUMINESCENCJA

Proces absorpcji promieniowania elektromagnetycznego przez struktury biologiczne, wykorzystywany jest w medycynie: do biostymulacji, fotoabblacji, do fotorozrywania, czy też odparowania tkanki. Zaobserwowane efekty zależą w głównej mierze od właściwości optycznych tkanki, długości fali promieniowania świetlnego, mocy wiązki oraz dostarczonej dawki promieniowania. Absorpcja promieniowania przez tkankę może prowadzić do jej **podgrzania (zamiany na energię termiczną)**, lub prowadzić do zamiany na energię fali świetlnej, z czym związane jest zjawisko luminescencji: **fluorescencji** lub **fosforescencji**. Jeśli współczynnik absorpcji tkanki jest niewielki dla danej długości fali (tzw. terapeutyczne okno transmisyjne 600-1000 nm), promieniowanie laserowe wnika w głąb tkanki. Jeśli natomiast współczynnik absorpcji jest wysoki, jak np. dla promieniowania UV-C, UV-B oraz podczerwieni, wówczas głębokość penetracji jest znikoma. Do głównych chromoforów w tkance zaliczyć można min. oksyhemoglobinę (O_2Hb), deoksyhemoglobinę (Hb), wodę oraz melaninę, protoporfirynę IX, białka zawarte w kolagenie i elastynie, FAD, NADH, NAD, DNA oraz kwasy tłuszczowe.

Luminescencja jest to emisja kwantu promieniowania elektromagnetycznego przy przechodzeniu elektronu ze stanu wzbudzonego do stanu o niższej energii. *Luminescencja to emisja promieniowania elektromagnetycznego o natężeniu większym od natężenia promieniowania cieplnego w danej temperaturze i o skończonym czasie trwania świecenia, niezanikającym natychmiast po przerwaniu wzbudzenia.* Ze względu na sposób wzbudzenia możemy wyróżnić kilka rodzajów luminescencji:

- *fotoluminescencja* – wywołana promieniowaniem elektromagnetycznym, np. laserem lub za pomocą lampy halogenowej, ksenonowej, deuterowej lub innej;
- *elektroluminescencja* – wywołana polem elektrycznym, np. przy przepływie elektronów w złączu p-n;
- *chemiluminescencja* – świecenie następuje w wyniku wzbudzenia reakcjami chemicznymi;
- *bioluminescencja* – wywołana procesami biologicznymi;
- *radioluminescencja* – wywołana promieniowaniem jonizującym;

- *rentgenoluminescencja* – świecenie następuje w wyniku wzbudzenia promieniami X;
- *tryboluminescencja* – występuje w wyniku wzbudzenia siłami tarcia i elektrostatycznymi;
- *sonoluminescencja* – wywołana promieniowaniem ultradźwiękowym;
- *katodoluminescencja* – wzbudzenie strumieniem elektronów;
- *elektrochemiluminescencja* – wywołana procesami chemicznymi i polem elektrycznym [2].



Rys. 2 Diagram Jabłońskiego

Struktura energetyczna cząsteczki jest określona przez jej konfigurację elektronową (Rys. 2), na którą składa się, oprócz podstawowego stanu singletowego S_0 , zwykle kilka wyższych energetycznie stanów singletowych S_1 , S_2 (zdefiniowanych przez obecność antyrównoległe ustawionych spinów elektronów na powłoce) oraz stany trypletowe (zdefiniowane przez równoległe ustawione spiny dwóch elektronów). Każda molekula w ramach określonej konfiguracji elektronowej może się znajdować w różnych stanach oscylacyjnych, które wynikają z drgań atomów w cząsteczce. Cząsteczka, która zaabsorbowała foton rezonansowy (A), czyli o energii dopasowanej do różnicy energetycznej pomiędzy stanem podstawowym a dowolnym stanem oscylacyjnym elektronowego stanu wzbudzenia (S_1 , S_2 , ...), ulega wzbudzeniu. Po czasie relaksacji ($\cong 10^{-15}$ s) traci nadmiar energii podczas przechodzenia do najniższego stanu oscylacyjnego należącego do danego poziomu elektronowego. Wyróżniamy kilka sposobów przejścia wzbudzonej cząsteczki do stanu podstawowego:

- gdy zostanie wyemitowany foton o energii $h\nu = E_{S_1} - E_{S_0}$, to elektron przechodzi na jeden z poziomów oscylacyjnych stanu podstawowego. Zjawisko to nazywamy

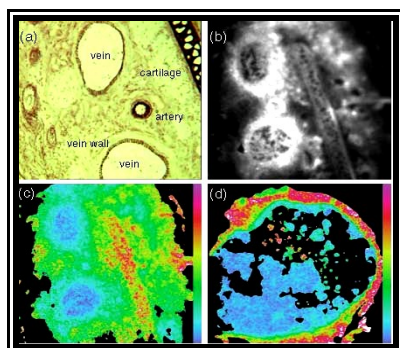
fluorescencją (F).

- gdy energia wzbudzonej cząsteczki jest przekazywana otoczeniu w wyniku zderzeń z innymi molekułami, wówczas następuje **konwersja wewnętrzna (IC)**, czyli **bezpromienisty zanik** populacji poziomu wzbudzonego do poziomu podstawowego. Efektywność i wydajność tego procesu zmniejsza się wraz ze wzrostem przerwy energetycznej pomiędzy poziomem wzbudzonym a podstawowym.
- przejścia singlet - tryplet są bardzo mało prawdopodobne, ale nie niemożliwe. Jest więc możliwe, że cząsteczka przejdzie do stanu trypletowego lub też przekazuje swoją energię innej cząsteczce. Proces transferu energii singlet – tryplet określamy mianem **wewnętrznej konwersji interkombinacyjnej (ICS** – inter-system crossing). Emisję fotonu przy przejściu ze stanu trypletowego do stanu podstawowego (singletowego) nazywamy wówczas **fosforescencją (P)**.

1.3 ZASTOSOWANIE ZJAWISKA FLUORESCENCJI W DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ

Sygnal fluorescencji można mierzyć spektroskopowo lub też badać fluorescencję całego obiektu za pomocą obrazowania fluorescencyjnego np. w mikroskopie fluorescencyjnym. Ten rodzaj obrazowania jest głównie związany ze zjawiskiem luminescencji składników budulcowych tkanki, które pod wpływem zaabsorbowanego pierwotnego promieniowania elektromagnetycznego emitują światło wtórne o innej długości fali. Odpowiednia barwa promieniowania fluorescencyjnego jest wykorzystywana do tworzenia tzw. mapy rozkładu różnych chromatoforów (*map of the distribution of different fluorescence molecules – “excitation - emission map”*), która pozwala na badanie struktur tkankowych lub też pojedynczych komórek. Jak wiadomo omawiane zjawisko trwa zwykle bardzo krótko (nanosekundy), dlatego z punktu widzenia praktycznej realizacji diagnostyki opartej na tym procesie pierwszorzędne znaczenie ma czas zaniku fluorescencji, co umożliwia dobranie odpowiednio szybkich detektorów promieniowania wtórnego. Na tym polega metoda obrazowania czasowego zaniku fluorescencji FLIM (Fluorescence- Lifetime Imaging), która może być wykorzystana do rozróżniania fluoroforów oraz przedstawienia czasowych zmian fluorescencji. Mapy FLIM mogą zostać wykorzystane do scharakteryzowania właściwości

spektroskopowych badanych struktur biologicznych. Rysunki poniżej przedstawiają wycinek tkanki z ucha szczura oraz ich obrazy wykonane za pomocą techniki FLIM.



a) mikroskopowy obraz badanej tkanki, widoczne są tu żyły (vein), tętnica (artery) oraz chrząstka (cartilage)

b) obraz natężenia fluorescencji po naświetleniu badanej tkanki światłem laserowym

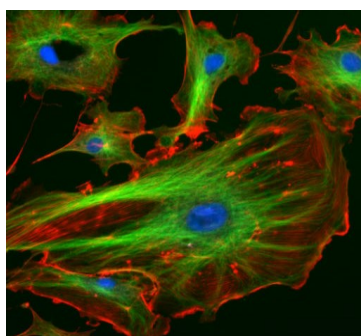
c) mapa FLIM badanej tkanki: widać, że żyły (kolor niebieski) mają bardzo krótki czas zaniku, natomiast chrząstka dość długi

d) powiększona mapa FLIM żyły pokazuje dokładnie właściwości. Widoczny jest tu też wyraźny kontrast pomiędzy różnymi typami tkanek

Rys. 3 Fluorescencyjne właściwości tkanki ucha szczura scharakteryzowane za pomocą FLIM [3]

Zjawisko luminescencji znalazło również szerokie zastosowanie w diagnostyce fotodynamicznej zmian nowotworowych.

Ćwiczenia laboratoryjne polegać będą na analizie obrazów fluorescencyjnych komórek, m.in. śródbłónka. Przykładowy cytoszkielet komórek śródbłónka został przedstawiony na Rys. 4. Mikrotubule na zdjęciu fluorescencyjnym są zabarwione na kolor zielony, aktyna ma kolor czerwony, podczas gdy DNA zawarte w jądrach komórkowych ma barwę niebieską. Należy jednak podkreślić, że w przypadku struktur komórkowych wzbudzanych w inny sposób, emisja promieniowania może następować w innych pasmach spektralnych, czyli mieć inną barwę na zdjęciach fluorescencyjnych.



Rys. 4 Przykładowe zdjęcie fluorescencyjne komórek śródbłónka [4]

Ze względu na to, iż poszczególne struktury biologiczne emitują promieniowanie o różnych długościach fali, w celu ich wyodrębnienia pomocna jest komputerowa analiza

zdjęć fluorescencyjnych, która pozwala m.in. na przetwarzanie poszczególnych kanałów (R, G lub B) kolorowego obrazu RGB. Takie rozwiązanie będzie podstawowym narzędziem wykorzystywanym w badaniach zdjęć fluorescencyjnych prowadzonych w ramach niniejszego ćwiczenia laboratoryjnego.

2. PROGRAM ĆWICZENIA

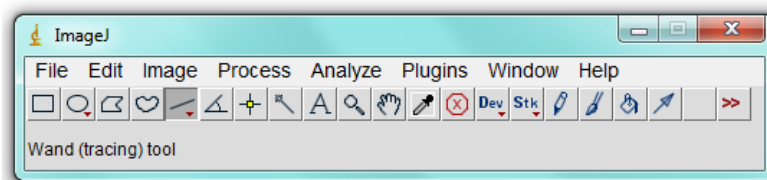
Zdjęcia fluorescencji komórek śródbłonna, które będą analizowane podczas ćwiczenia laboratoryjnego, umieszczone zostały w katalogu o nazwie „**Zdjęcia_fluorescencyjne**”. Prowadzący zajęcia wskaże każdej grupie zestaw zdjęć do analizy. W sprawozdaniu należy w jasny sposób opisać, które zdjęcia były analizowane. Komputerowa analiza informacji obrazowej zostanie przeprowadzona za pomocą programu **ImageJ**. Dodatkowo, zostaną przekazane zdjęcia fluorescencyjne wybranych struktur biologicznych do samodzielnego przeanalizowania przy pomocy programu ImageJ na podstawie umiejętności zdobytych podczas zajęć. Analiza dodatkowych zdjęć udostępnionych przez Prowadzącego powinna zostać uwzględniona w trakcie opracowywania wyników oraz zamieszczona w sprawozdaniu. Program ImageJ można pobrać bezpośrednio ze strony <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>.

2.1 Tworzenie katalogu z danymi pomiarowymi oraz ich zapisywanie

Na pulpicie monitora znajduje się katalog „**Podstawy_biofotoniki_cw.3**”. W katalogu tym należy utworzyć własny podkatalog, w którym zapisywane będą dane uzyskane w trakcie ćwiczenia. Nazwa podkatalogu powinna zawierać: nazwisko jednej osoby z grupy przeprowadzającej ćwiczenie oraz datę wykonania ćwiczenia (np. **Jan_Kowalski_22.02.2018**). W tym podkatalogu każda grupa zapisuje dane pośrednie lub też końcowe uzyskane w trakcie zajęć.

2.2 Wstępna obróbka zdjęć w programie ImageJ

Należy otworzyć program ImageJ przy pomocy ikony , która znajduje się na pulpicie monitora.



W zakładce **File** należy zaznaczyć **Open**, znaleźć katalog „**Zdjęcia_fluorescencyjne**” oraz wybrać wskazane przez Prowadzącego zdjęcia, które będą poddane obróbce komputerowej.

UWAGA! Aby cofnąć przeprowadzoną ostatnio operację należy w zakładce **Edit** zaznaczyć opcję **Undo**. W programie ImageJ możliwe jest jedynie cofnięcie ostatnio, bezpośrednio wykonanej operacji, dlatego też w przypadku popełnienia błędu we wcześniejszej fazie obróbki konieczne jest rozpoczęcie całego procesu od początku.

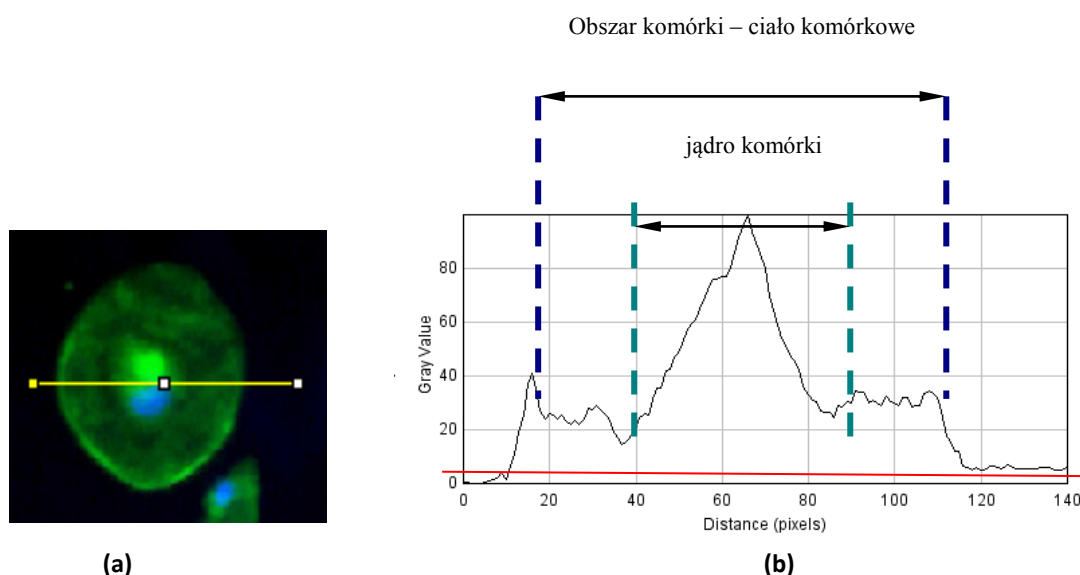
W celu poprawy jakości zdjęć, czyli ich wyostrenia, należy w zakładce **Process** zaznaczyć opcję **Sharpen**. Z kolei, aby poprawić kontrast, należy w tej samej zakładce zaznaczyć opcję **Enhance Contrast**.

2.3 Charakteryzacja obrazów fluorescencyjnych komórek biologicznych z wykorzystanie programu ImageJ

W tym celu należy zaznaczyć ikonę  dostępną na Pasku Narzędzi Programu ImageJ, a następnie na zdjęciu wybrać odpowiednią komórkę, która będzie analizowana. Przeciągając kursor od jednej krawędzi komórki do drugiej, w taki sposób, aby linia przechodziła przez jądro komórkowe oraz obejmowała również pewien niewielki obszar tła poza komórką, wyznaczamy kierunek, wzdłuż którego analizować będziemy profil komórki. Po zaznaczeniu tej linii, należy w zakładce **Analyze** wybrać opcję **Plot Profile**, która pozwoli na określenie profilu obrazu fluorescencyjnego komórki (Rys. 5). Wyznaczony profil będzie wykresem dyskretnych wartości natężenia obrazu fluorescencyjnego, zapisanych w skali szarości (0-256) oraz długości zaznaczonej linii (długość w pikselach). Profil należy zapisać poprzez zaznaczenie pod wykresem (Rys. 5b) ikony **List**.

Następnie w nowym oknie reprezentującym tabelę opisującą profil, które pojawiło się po odznaczeniu tej opcji, należy wejść do zakładki **File** i zaznaczyć opcję **Save as**. Program ImageJ w domyśle zapisze niniejszy profil w postaci tabeli w formacie: *xls*. Proszę pamiętać o zapisaniu danych we wcześniej wspomnianym podkatalogu na pulpicie monitora (patrz pkt.

2.1). Należy zapisać profile przynajmniej trzech wybranych komórek.



Rys. 5 (a) Kierunek wzdłuż którego wyznaczony zostanie profil, (b) profil komórki wzdłuż zaznaczonej linii (czerwona linia wyznacza natężenie tła - background).

Histogram jest niezwykle przydatnym narzędziem analizy danych. Stanowi on graficzne przedstawienie liczby pikseli o danej wartości natężenia w skali szarości. Należy wygenerować histogramy dla poszczególnych kanałów R, G, B, wybierając w zakładce **Plugins** opcję **Macros** i **RGB histogram**. Korzystając z opcji **PrntScr** należy zapisać obrazy poszczególnych histogramów.

Celem opracowywania wyników na podstawie zapisanych profili, należy sporządzić wykresy w Excelu, a następnie scharakteryzować natężenie fluorescencji (w stosunku do tła) poszczególnych obszarów komórki, jak również wyznaczyć rozmiar poprzeczny całej komórki oraz jej jądra wzdłuż linii wyznaczającej kierunek określenia profilu.

Dodatkowo w sprawozdaniu konieczne jest zamieszczenie wszystkich zdjęć z zaznaczoną linią wyznaczającą kierunek analizowanego przekroju (Rys. 5 a). W tym celu w trakcie zajęć można skorzystać z opcji **PrntScr** (Print Screen) oraz profili analizowanych obiektów (przygotowanych w programie ImageJ). Na profilach przygotowanych w programie Excel powinno być zaznaczone jądro komórki oraz jej ciało (Rys. 5b) oraz przypadające wartości natężenia pikseli w skali szarości (gray scale – od 0 do 256). W sprawozdaniu należy umieścić również histogramy poszczególnych kanałów R, G, B oraz podać: średnią wartość natężenia

pikseli (Mean) oraz odchylenie standardowe (StdDev). Proszę zamieścić również spostrzeżenia dotyczące średniej wartości natężenia pikseli w kontekście efektywności fluorescencji poszczególnych struktur komórkowych.

2.4 Określenie rozmiarów komórki oraz jej jądra na podstawie analizy jej profilu w jednym z kanałów R, G lub B zdjęcia fluorescencyjnego

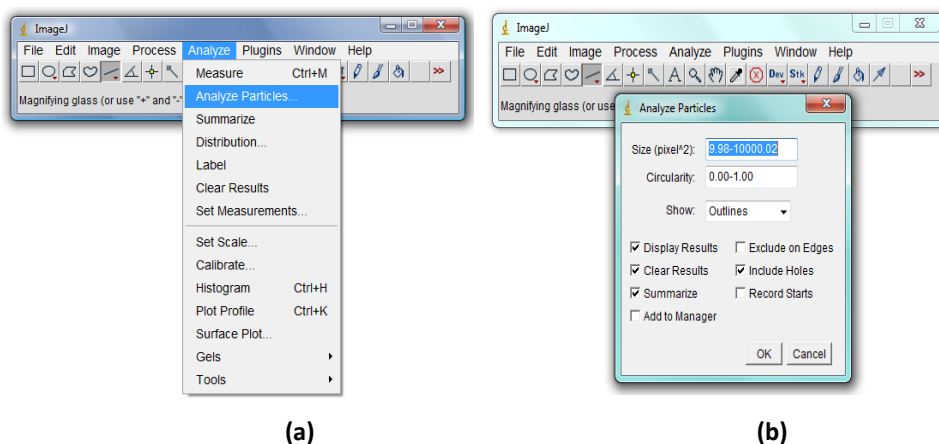
Dostępne w ćwiczeniu laboratoryjnym zdjęcia są zdjęciami kolorowymi, czyli zarejestrowanymi w trybie RGB. Wzbudzenie fluorescencji komórek umożliwia analizę poszczególnych struktur komórkowych, gdyż emitują one promieniowanie w różnych pasmach spektralnych. W celu wyodrębnienia jądra oraz ciała komórkowego komórek śródbłonna należy przeprowadzić separację kanałów: czerwonego (R- red), zielonego (G- green) oraz niebieskiego (B-blue) oraz wybrać te, dla których fluorescencja jądra lub ciała komórkowego jest najlepiej widoczna. Aby rozłożyć obraz RGB na poszczególne kanały należy zaznaczyć obraz i w zakładce **Image** wybrać **Color** a następnie **Split Channels**. W ten sposób wybrane obrazy (dla dwóch kanałów, R, G lub B) poddane zostaną dalszemu komputerowemu przetwarzaniu informacji obrazowej w celu analizy dynamiki fluorescencji poszczególnych struktur komórkowych oraz określenia ich ilości oraz przybliżonych rozmiarów. W celu realizacji tego zadania pomiarowego należy zaznaczyć ikonę  dostępną na Pasku Narzędzi programu ImageJ. Następnie na zdjęciu wybieramy odpowiednie struktury komórkowe (3 różne jądra oraz ciała komórkowe) i przeciągając kursor od jednej krawędzi tego obiektu do drugiej wyznaczamy kierunek, wzdłuż którego sporządzony zostanie profil. Postępując podobnie, jak w poprzednim punkcie 2.2, zapisujemy profile przynajmniej trzech wybranych komórek oraz jąder komórkowych (oczywiście w odpowiednich dla nich kanałach R,G,B, w których są najbardziej uwidocznione) w formacie .xls.

Na podstawie zapisanych danych pomiarowych przedstawiających profile analizowanych obiektów należy w Excelu sporządzić wykresy oraz określić rozmiary poprzeczne (w pikselach). W sprawozdaniu konieczne jest zamieszczenie zdjęć oraz profili analizowanych obiektów (zarówno tych z programu ImageJ, jak również przygotowanych w Excelu). Należy uwzględnić, jaki zakres wartości natężenia (gray scale) przypada na rozważaną strukturę. Podobnie, jak w poprzednim przypadku należy zapisać obrazy zdjęć z wyznaczonymi

kierunkami profilu, korzystając z opcji *PrntScr*. W sprawozdaniu zamieszczone powinny zostać również obrazy trzech kanałów R, G i B wejściowego zdjęcia RGB oraz krótkie spostrzeżenia dotyczące widoczności poszczególnych struktur w każdym kanale.

2.5 Analiza rozkładu rozmiarów struktur komórkowych na podstawie analizy obrazu w jednym z kanałów R, G, lub B z wykorzystaniem funkcji *Analyze Particles*

W celu przeprowadzenia analizy rozmiarów poprzecznych (w pikselach) komórek oraz jąder komórkowych należy skorzystać z funkcji **Analyze Particles** znajdującej się w zakładce **Analyze** na Pasku Narzędzi programu ImageJ (patrz Rys. 6a).

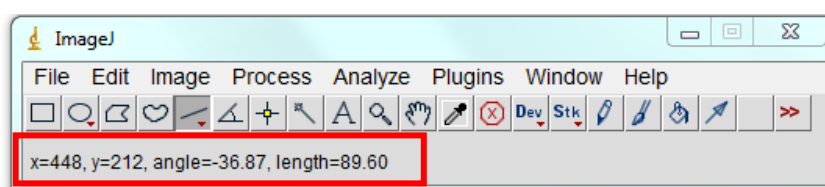


Rys. 6 Aplikacja programu do analizy rozmiarów badanych obiektów

Umożliwia ona określenie liczby obiektów o predefiniowanym polu powierzchni oraz określenie średniego pola powierzchni obiektów dzięki określeniu współczynnika cyrkularności, dla którego wartość 1 oznacza idealne koło, natomiast wartości z przedziału (0,1) oznaczają bardziej złożone struktury o nieregularnych kształtach, a tym samym bardziej dokładne przybliżenie obszaru zajmowanego przez badany obiekt. Zaznaczenie wartości współczynnika cyrkularności równej 1 sprawia, iż analizowane są jedynie obiekty o kształcie zbliżonym do koła, podczas, gdy pozostałe o bardziej nieregularnych kształtach są pomijane. Z kolei dla wartości tego współczynnika równej 0, analizowane będą obiekty o nieregularnych kształtach, a tym samym znajdujące się bardzo blisko siebie obiekty lub też dodatkowe artefakty, które nie są przedmiotem analizy, zostaną potraktowane jako jeden obiekt, co może wprowadzić istotne błędy w ocenie rozmiarów obiektów. Z tego też powodu dobór wartości tego współczynnika w istotny sposób może wpływać na poprawność

prorowadzonej analizy.

W pierwszej kolejności należy utworzyć binarną reprezentację obrazów analizowanych obiektów w kanałach R, G, B najbardziej je uwidaczniających. Można tego dokonać wybierając obraz w odpowiednim kanale, zaznaczając w zakładce **Process** opcję **Binary**, a następnie opcję **Convert to Mask**. Po wybraniu opcji **Analyze Particles** pojawia się okno umożliwiające zdefiniowanie odpowiednich parametrów prowadzonej analizy (patrz Rys. 6b), takich jak pole powierzchni (**Size**) w jednostkach pixel^2 oraz współczynnik cyrkularności (**Circularity**). Analizę przeprowadzamy dla trzech różnych, wybranych wartości współczynnika cyrkularności z zakresu od 0 do 1. Najistotniejsze jest oszacowanie zakresu rozmiarów, jakie przyjmują badane obiekty (cała komórka, jej jądro) na zdjęciu. W tym celu należy wyodrębnić jeden z najmniejszych oraz największych obiektów, a następnie zaznaczyć ikonę . Zaznaczając kursorem przekrój obiektu, podobnie, jak w przypadku wyznaczania profilu obiektów, w dolnej części Paska Narzędzi (patrz Rys. 7) pojawia się informacja na temat rozmiarów poprzecznych badanego obiektu (**length**) wyrażona w pikselach. Na podstawie tych danych możemy oszacować przedział pól powierzchni obiektów, które będą badane i wpisać go do okna predefiniującego parametry analizy (Rys. 6b).

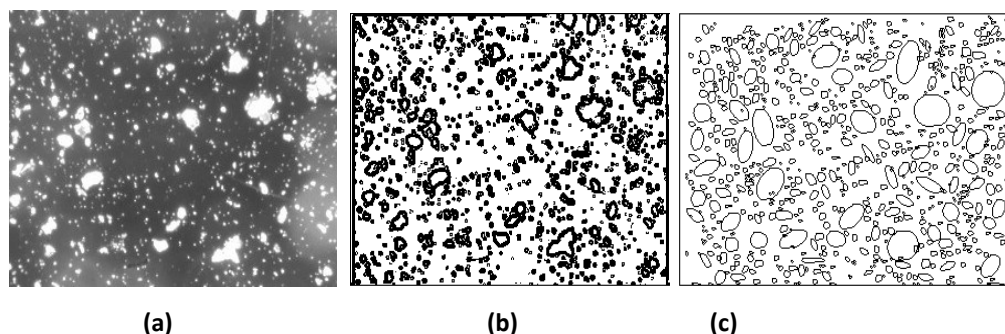


Rys. 7 Określenie rozmiaru poprzecznego analizowanego obiektu.

Współczynnik cyrkularności należy określić eksperymentalnie poprzez dobór najlepszego dopasowania obszaru zajmowanego przez analizowane obiekty. Poprzez wybór w opcji **Show** funkcji **Outlines**, możliwe jest graficzne przedstawienie dopasowania obszaru obiektu poprzez figury o kształtach predefiniowanych przez współczynnik cyrkularności. Ta opcja umożliwia kontrolę odpowiedniego doboru tego współczynnika (patrz przykład na Rys. 8). Należy wybrać trzy różne wartości współczynnika cyrkularności dla każdego zdjęcia w celu przeanalizowania wpływu jego odpowiedniego doboru na poprawność analizy.

Aby usprawnić prowadzoną analizę, należy w oknie poleceń (patrz Rys. 6b) zaznaczyć dodatkowe opcje **Exclude on Edges**, wykluczającą obiekty znajdujące się na brzegu zdjęć (na

skraju pola widzenia mikroskopu fluorescencyjnego rejestrującego zdjęcia) oraz opcję **Include holes**.



Rys. 8 Przykładowa analiza zdjęć ziaren czystego bioszkła: (a) zdjęcia ziaren (b) binarny obraz ziaren po szkieletyzacji (c) dopasowanie ziaren figurami o kształcie zdefiniowanym przez współczynnik cyrkularności.

W celu wygenerowania tabeli zawierającej liczbę obiektów o określonych rozmiarach należy w oknie poleceń (patrz Rys. 6b) zaznaczyć opcję **Display Results**, która sprawia, że po każdej analizie wyświetlone zostanie zbiorcze zestawienie uzyskanych wyników. Określony w ten sposób rozkład rozmiarów obiektów należy zapisać w formacie .xls, podobnie, jak w poprzednich przypadkach. Należy również zapisać obrazy poszczególnych kanałów R, G i B, maski binarne początkowych zdjęć oraz obrazy dopasowania obiektów figurami o kształcie zdefiniowanym przez współczynnik cyrkularności (np. Rys. 8c). Na podstawie zapisanych tabeli zbiorczych należy sporządzić wykresy przedstawiające liczbę obiektów o danym rozmiarze, wyznaczyć średni rozmiar obiektów oraz przeanalizować wpływ wartości współczynnika cyrkularności na poprawność prowadzonej analizy.

3. Literatura

-
- [1] „Optyka biomedyczna: wybrane zagadnienia”, red. H. Podbielska, Oficyna Wydawnicza PWR, 2011
 - [2] www.invocom.et.put.poznan.pl/~invocom/C/P1-9/swiatlowody_pl/p1-1_6_2.htm
 - [3] „Diagnostyka i terapia fotodynamiczna, red. H. Podbielska, A. Sieroń, W. Stręk, Wyd. Urban&Partner, 2004
 - [5] http://www.imperial.ac.uk/research/photonics/research/topics/biomedical_imaging/flim.htm
 - [6] www.stolaf.edu/people/giannini/cell/nuc.htm

Opracowanie: dr inż. Igor Buzalewicz

Katedra Inżynierii Biomedycznej Wydziału Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej