

# Képelemzési gyakorlati jegyzet

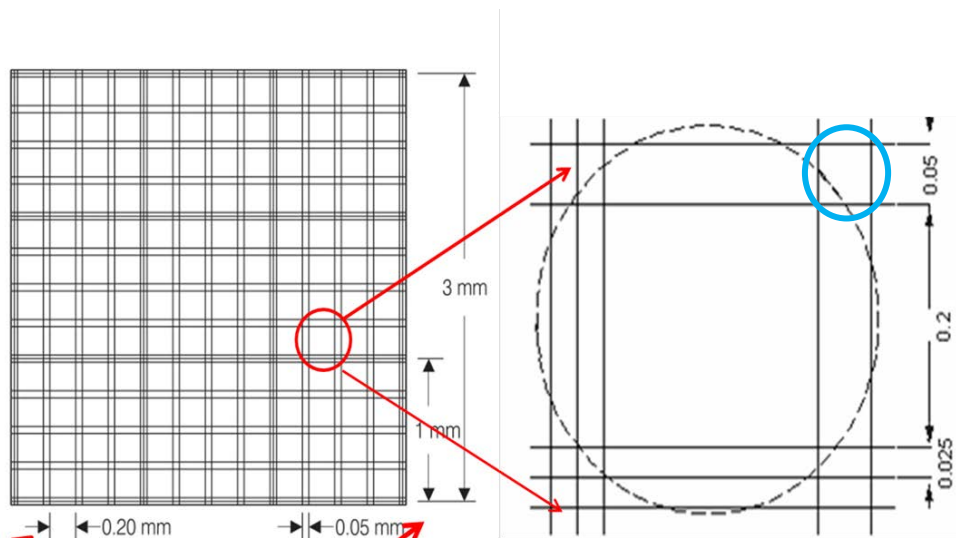
## Sejtosztódási mérések:

NIH Fiji (<https://fiji.sc/>)

### 1. Kalibráció Bürker kamrával:

Kezdő lépésként megnyitunk egy Bürker kamráról készült time lapse mikroszkóppal (Ugyanazon objektív és képfelbontás, mint a vizsgált képszekvenciánál!) rögzített képet:

File → Open



A Bürker kamra kis négyzetének (kék körben jelölve, oldalhosszúság: 50  $\mu\text{m}$ ) mindegyik oldalát többször lemérjük, az egyenes kijelölés „Straight” és az **Analyze → Measure (Ctrl+m)** segítségével. A felugró „Results” ablakban a „Length” oszlop tartalmazza a méréseink eredményét. A lemért oldalak pixel értékeinek átlagolásával megkapjuk az átlagos oldalhosszúságot ezt osztva 50-nel pedig megkapjuk azt, hogy 1  $\mu\text{m}$  hány pixelnek felel meg.

### 2. Osztódási mérések:

Kezdő lépésként betöltjük a vizsgálni kívánt képszekvenciát: **File → Import → Image Sequence**

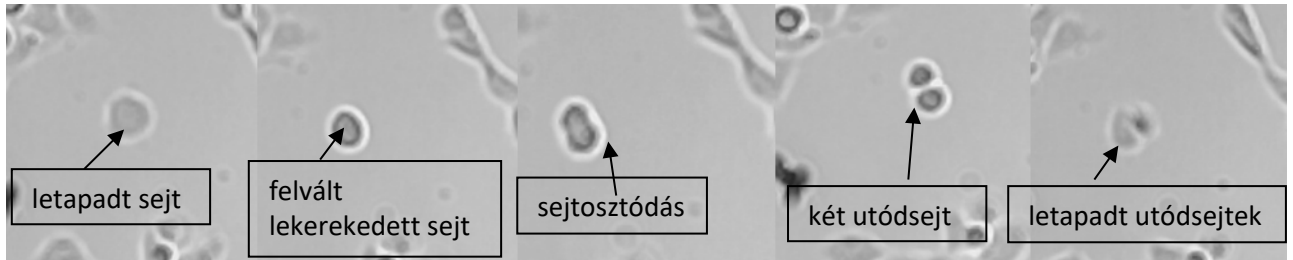
#### Képek előkészítése:

1. Az RGB csatornákat egyesítve és 8 bit formátumú szürkeárnyaltos képformátumra konvertáljuk a felvételeket. **Image → Type → 8 bit**

2. A képkészítési hibákból fakadó villódzást a **Plugins → Stack Deflicker** plugin alkalmazásával küszöböljük ki.
3. Az háttér egységesítését és a jel kiemelését gyors Fourier transzformációval végezzük **Process→FFT→Bandpass Filter**

### ROI létrehozása

Az első lépésként keresünk egy osztódó sejtet. A sejtek az osztódás során felválnak, lekerekednek, ekkor a kontrasztjuk megnövekszik. Osztódáskor a lekerekedett sejt megkötözőik, a két utódsejt szétválik majd letapad.



A betöltött szekvencián kiválasztjuk az osztódás előtt álló lekerekedett sejtet és négyzet alakú kijelölést használva kijelöljük az anyasejt körül akkora területet, amelyben a két utódsejt is befér az osztódást és a letapadásukat követően. A kijelölt területre **jobb egérgombbal** kattintva a „**Duplicate**” parancsot választjuk. A feljövő kis ablakban bejelöljük a „**Duplicate Stack**” -et és **OK**. Ekkor egy új ablakban a kivágott terület képszekvenciáját kapjuk. A kivágott szekvencia teljes képsorozatából kiválasztjuk azt a szakaszt, ahol az osztódás történik: Ezt a szakaszt kivágjuk az egész szekvenciából, az **Image→Stacks→Tools → Make Substack**. parancsot használva. Ekkor a „**Substack Maker**” ablakot kapjuk, ide beírjuk azt az intervallumot, amit szeretnénk kivágni, amely egy új ablakban jelenik meg.

Egyszerűbb módon: a duplikálás során a „**Range:**” résznél írjuk be a kívánt intervallumot, képszám-tartományt, -tól-ig, és így azonnal meglapjuk a kivágott kép részlet intervallumot.

A további méréseket ezen a kivágott szekvencián végezzük, minden egyes osztódás méréseihez ugyanígy végezzük a szekvencia-kivágást.

### Az elemzés

#### *a) Anyasejt és a leánysejtek területének mérése*

A lekerekedett anyasejten beállítjuk a küszöbértéket, szegmentáljuk a képi információt **Image→Adjust → Threshold (Ctrl+Shift+T)**

A mérés célja sejt területe, ezért úgy állítjuk be a küszöbértéket a görgető sávon, hogy a belső terület teljesen (zárt vonallal) legyen körül határolva, majd megnézzük, hogy az utódsejteknél is jó-e a Threshold beállítás. Ha igen akkor **Apply** és **OK**. A feljövő ablakban nem engedélyezzük a „**Calculate Threshold For Each Image**” opciót.

**Mérés:** A menüsorban **Analyze → Analyze particles**

A felugró ablakban a legördülő menüből kiválasztjuk a **SHOW→Outlines** lehetőséget, további beállítások: **Display results** (listázza az egyes objektumok mért értékeit), **Clear results**, **Include holes** (az objektumokban lévő hiátusokat, lyukakat ne vegye figyelembe).

A felugró „**Drawing of Substack**” szekvenciában, ami a **Show: Outlines** parancs révén jelenik meg, a lemért objektumok körvonalát tudjuk majd beazonosítani a számozásuk alapján. Megkeressük a lekerekedett anyasejtet, az ezt jelölő számot megkeressük az eredmények listában: **Results ablak**, és a területének, **Area**, pixel értékét feljegyezzük excelben.

- Pl.: az anyasejt száma 18. A „**Results**” ablakban a 18-as szám mellett megkapjuk a területét (**Area**). Ezt az adatot bevisszük az excelbe. Ez lesz az anyasejt területe négyzetpixelben.

Ugyan ez vonatkozik az utódsejtekre is. Tovább pörgetve a szekvenciát a „**Drawing of Substack**” ablakban és a két utódsejt szintén meg fog jelenni számokkal jelölve. Ezt a számot a „**Results**” ablakban ismét megkeressük és beírjuk a területét az excelbe.

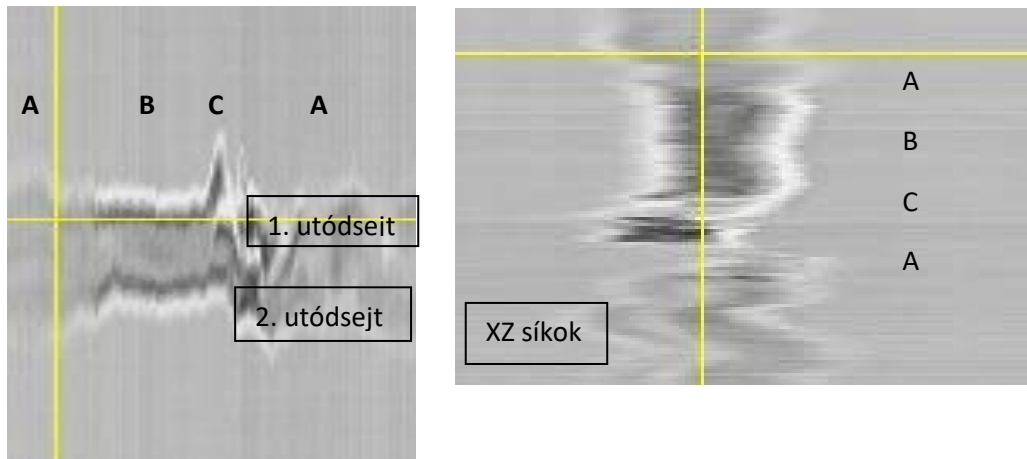
**FONTOS** lejegyezni, melyik utódsejtet mértük előbb (pl.: a bal oldalt, vagy a fentebb lévő, vagy a jobb oldalt stb....) mert később az utódsejtek letapadási idejének meghatározásakor a megfelelő letapadási időt a megfelelő utódsejt mellé írjuk.

#### *b) Felválási osztódási és letapadási idő meghatározása:*

A következő mérések a felválási (az anyasejt felválásától az osztódásig), az osztódási idő (legkerekébb állapottól az utódsejtek megjelenéséig vett idő) és az utódsejtek letapadási idejének (a két utódsejt megjelenésétől, tehát az osztódástól a letapadásukig vett idő) a meghatározása.

Ezekhez a lépésekhez **Image -> Stacks -> Orthogonal Views (Ctrl+Shift+H)** parancsot használjuk.

- Az Ortozonális nézet: a képszekvencia  $90^\circ$ -kal történő térbeli elforgatása és tetszőleges síkban történő metszése, amely arra szolgál, hogy a kiválasztott pontban megjelenítsük az XZ és YZ síkokat. A Z tengely esetünkben az idősíki lesz. Amikor az ortogonális nézetet megnyitjuk az eredeti kép mellett a síkokat tartalmazó ablakok megnyílnak, és a sárga vonalak metszéspontja az eredeti képszekvencián jelzi az elemezni kívánt pontot. A sejtek körvonalai oldalnézetből látszanak síkban metszve, így jól látható a területük és kontrasztjuk változása felváláskor és visszatapadáskor.



- A. letapadt sejtre jellemző körvonal (nem erősen körül határolt nagyobb kiterjedésű szélesebb)
- B. lekerekedett, felvált sejt (erősen körül határolt kisebb kiterjedésű, keskenyebb)
- C. osztódó sejt (körül határolt, nagy kiterjedésű -jellemző villás rajzolat)

A képszekvenciát beállítjuk arra a pontra, ahol a sejt osztódik (az XY, és YZ síkok metszéspontjában legyen a sejt) majd kiválasztjuk, hogy melyik síkban látszik jobban az anyasejt felválása és a két utódsejt megjelenése, letapadása. A méréshez duplikáljuk a kiválasztott képet: Jobb gomb → **Duplicate (Shift+D)**. Az új ablakban megjelenő képen a „**Straight**” paranccsal egyenest állítunk vizsgált szakaszokra majd lemérjük azok hosszát **Ctrl+m** és a „**Length**” érték, ami a percenkénti fotózás/betöltés esetében 1pixel=1perc. Ezt az adatot bevisszük az excel táblázatba.

Excel táblázat fejléce:

Anyasejt					Leánysejt 1				Leánysejt 2				Átmérők		
Osztódási idő (min)	Felválási idő (min)	Osztódás	Terület (pixel)	Terület ( $\mu\text{m}^2$ )	Letapadási idő (min)	Terület (pixel)	Terület ( $\mu\text{m}^2$ )	Arány	Letapadási idő (min)	Terület (pixel)	Terület ( $\mu\text{m}^2$ )	Arány	anyasejt	leánysejt1	leánysejt2

Hasznos információk:

Kalibrációs váltószám:=(oldalhossz (Length) átlaga pixelben/oldalhossz  $\mu\text{m}$  (50  $\mu\text{m}$ ))

Terület átszámítása pixelből: =(sejt területe pixelben/ kalibrációval kapott váltószám)

Átmérő kiszámítása: =(GYÖK(sejt területe  $\mu\text{m}^2$ -ben)/3,14)\*2