

INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
Polskiej Akademii Nauk
ul. Radzikowskiego 152, 31-342 Kraków

www.ifj.edu.pl/publ/reports/2017/

Kraków, luty 2017

Raport Nr 2099/AP

**Opracowanie algorytmów do analizy zdjęć
z mikroskopii fluorescencyjnej**

Konrad Tkocz, Sebastian Bożek, Jakub Bielecki,

Janusz Lekki, Wojciech M. Kwiatek

Abstrakt

Mikroskopia fluorescencyjna jest jedną z najszybszych technik wizualizacji uszkodzeń w materiale DNA wywołanych czynnikami fizycznymi lub chemicznymi. Z tego względu nieustannie rozwija się obszar algorytmów służących do analizy zdjęć z mikroskopii fluorescencyjnej. Raport ten zawiera przedstawienie opracowanych algorytmów służących do oceny względnej liczby uszkodzeń DNA, których wizualizacja odbywa się przy wykorzystaniu barwników fluorescencyjnych Alexa Fluor 488 oraz DAPI. Przedstawione zostały również sposoby określania poziomu szumu na zdjęciach, redukcji szumu z zdjęć, określenia stosunku sygnału pochodzącego od Alexa Fluor 488 do DAPI w komórkach.

Abstract

The fluorescence microscopy is one of the fastest techniques of DNA damage visualisation induced by physical or chemical factors. For this reason, the area of algorithms for images analysis from fluorescence microscopy continually develops. This report contains presentation of algorithms elaborated for the assessment of relative amount of DNA damage, visualised with the fluorescent dyes Alexa Fluor 488 and DAPI. Methods of the determination of the noise level and signal to noise ratio in the images, as well as methods of noise reduction and image quality optimization have been presented.

1. Wprowadzenie

Działanie promieniowania jonizującego na poziomie atomowym oraz molekularnym może doprowadzić do uszkodzeń żywych komórek. Częścią komórki najbardziej wrażliwą na wpływ działania promieniowania jonizującego jest jej materiał genetyczny – DNA. Promieniowanie może indukować w cząsteczkach DNA pojedyncze lub podwójne przerwania helisy łańcuchów polinukleotydowych. W przypadku, gdy mechanizmy naprawcze nie są w stanie naprawić powstałych uszkodzeń może dojść do śmierci komórki lub mutacji w kolejnych jej pokoleniach [1]. Pojedyncze przerwania helisy są sprawniej naprawiane przez mechanizmy naprawy DNA komórki w porównaniu do podwójnych przerwań łańcuchów, co wynika z wzajemnej komplementarności obydwu łańcuchów polinukleotydowych. Częstość występowania podwójnych uszkodzeń łańcuchów DNA w komórce zależy od wielkości dawki promieniowania jonizującego, pochłoniętej przez daną komórkę.

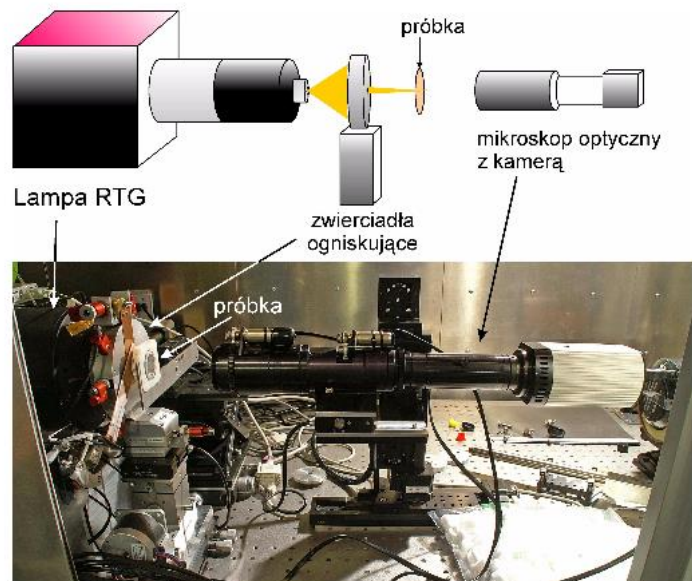
Jedną z technik wizualizacji podwójnych pęknięć DNA jest mikroskopia fluorescencyjna. Technika ta oparta jest na epifluorescencyjnym systemie optycznym, umożliwiającym detekcję i identyfikację sygnału pochodzącego od fluorochromu, po wzbudzeniu światłem o określonej długości fali.

Fluorochromem wykorzystywanym w niniejszej publikacji do detekcji sygnału od podwójnych uszkodzeń łańcucha DNA był barwnik Alexa Fluor 488. Barwnik ten został wykorzystany w oparciu o metodę γ -H2AX test. W metodzie tej Alexa Fluor 488 związany jest z białkiem histonowym H2AX, które bierze udział w tworzeniu kompleksu naprawczego dwuniciowych pęknięć DNA (histon H2AX ulega fosforylacji, dając γ -H2AX) [2]. Barwnik Alexa Fluor 488 wzbudzany światłem o długości fali 488 nm emituje promieniowanie fluorescencyjne o długości fali 519 nm, które jest obserwowane w mikroskopie fluorescencyjnym. Mikroskop fluorescencyjny wyposażony jest w kamerę CCD, która odpowiada za akwizycję zdjęć fluorescencyjnych obrazów komórek. Liczba ognisk γ -H2AX odpowiada liczbie podwójnych uszkodzeń łańcuchów DNA. Jednak w przypadku, kiedy komórka pochłonęła dużą dawkę promieniowania (w niniejszej pracy powyżej 20 Gy), ogniska w komórce przestają być rozpoznawalne. Z tego względu do określenia liczby uszkodzeń DNA opracowano i wykorzystano nową metodę analizy sygnału fluorescencyjnego.

2. Materiały i metody

2.1 Układ mikrowiązki rentgenowskiej do badań radiobiologicznych na poziomie komórkowym

W celu doprowadzenia do uszkodzeń i spowodowania podwójnych przerwań nici DNA, komórki zostały poddane ekspozycji na promieniowanie rentgenowskie przy wykorzystaniu mikrowiązki rentgenowskiej IFJ PAN [3]. Układ mikrowiązki rentgenowskiej do badań radiobiologicznych na poziomie komórkowym został skonfigurowany tak jak przedstawia to Rysunek 1.



Rysunek 1. Schemat oraz fotografia układu mikrowiązki rentgenowskiej do badań radiobiologicznych [4].

Źródłem promieniowania jonizującego w tym układzie jest lampa rentgenowska Hamamatsu L9191 wyposażona w anodę tytanową. Napięcie przyspieszające lampy wynosiło 40 kV, a prąd anodowy lampy 30 μ A. Wiązka rentgenowska ogniskowana była przy wykorzystaniu płasko-eliptycznych zwierciadeł wielowarstwowych (Rigaku), zoptymalizowanych dla energii 4,5 keV (K_{α} Ti). Szerokość połówkowa (FWHM) zogniskowanej wiązki wynosiła 15 μ m. Skolimowana wiązka rentgenowska trafiała na szalkę, w której znajdowały się komórki. Szalka umieszczona była na zautomatyzowanym stoliku, gdzie dwa precyzyjne silniki krokowe umożliwiały pozycjonowanie preparatu w dwóch wzajemnie prostopadłych osiach. Sterowanie silnikami pozwoliło na skanowanie wiązką rentgenowską próbki w wybranych obszarach [5]. Podgląd próbki w czasie jej naświetlania odbywał się przy wykorzystaniu mikroskopu optycznego wyposażonego w kamerę CCD.

2.2 Hodowla komórkowa oraz preparatyka próbek

Eksperyment przeprowadzano na hodowlanej linii komórkowej raka gruczołu krokowego PC-3 [6]. Po okresie inkubacji komórki były pasażowane na folię Mylarową, wyłożoną na dnie szalki Perttiego, w której znajdował się otwór o średnicy 10 mm, tak jak zostało to pokazane na Rysunku 2.



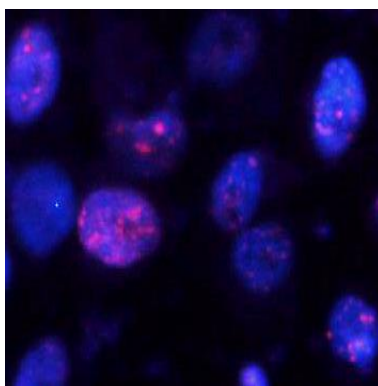
Rysunek 2. Szalka Perttiego z 10 mm otworem w dnie, pokryta folią Mylarową i wypełniona pożywką komórkową [4].

Po czasie 16-18 godzin inkubacji, kiedy stwierdzono, że komórki dobrze przylegają do dna szalki, była ona umieszczana w układzie mikrowiązki rentgenowskiej i poddawana ekspozycji na promieniowanie rentgenowskie.

Po napromienieniu komórki były inkubowane, a następnie płukane w soli fizjologicznej - PBS i utrwalane w 1,5% roztworze paraformaldehydu - PFA. Po odciążeniu utrwalacza PFA, komórki zalewane były 70% roztworem etanolu i przechowywane w temperaturze -20°C przez okres od 2 dni do 2 tygodni. Immunowybarwienie podwójnych pęknięć łańcuchów DNA rozpoczęto od permabilizacji błon komórek roztworem Triton-X. Po kolejnym płukaniu PBS, komórki inkubowane były w roztworze zawierającym przeciwciała anty-histonowe γ -H2AX [8]. Przeciwciała anty-histonowe γ -H2AX łączą się z fosforylowanymi histonami H2AX w miejscach, gdzie nastąpiły podwójne uszkodzenia łańcuchów DNA. Po płukaniu w TBP (0,2% Triton X, 1% albuminy surowicy bydlęcej (BSA) w PBS), komórki zanurzano w roztworze zawierającym barwnik fluorescencyjny Alexa Fluor 488. Następnie komórki poddawano kolejnemu płukaniu w roztworze TBP zawierającym barwnik fluorescencyjny DAPI (4', 6-diamidyno-2-fenylindol), który wiąże się z DNA, co pozwala na wizualizację całych łańcuchów DNA [4].

2.3 Wizualizacja podwójnych uszkodzeń DNA

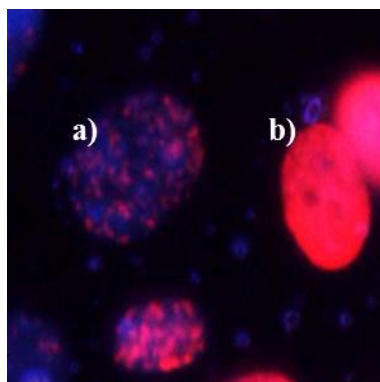
Dzięki zastosowanym do preparatyki próbek barwnikom fluorescencyjnym DAPI oraz Alexa Fluor 488 możliwa była identyfikacja łańcuchów DNA oraz podwójnych uszkodzeń łańcuchów DNA indukowanych promieniowaniem rentgenowskim. Maksimum absorpcji przypada na światło o długość fali 358 nm i 488 nm, z kolei maksimum emisji występuje dla światła o długości fali 461 nm i 519 nm odpowiednio dla DAPI i Alexa Fluor 488 [2]. Fluorescencyjne zdjęcia obrazów komórek były pozyskiwane przy wykorzystaniu mikroskopu epifluorescencyjnego Olympus BX51, wyposażonego w lampę rtęciową Olympus U-RLF-T oraz kolorową kamerę CCD QImagingm. Akwizycja zdjęć odbywała się przy użyciu dwóch filtrów U-MNU2 (360 nm – 370 nm) oraz U-MNG2 (530 nm – 550 nm). Zastosowanie kombinacji tych filtrów pozwoliło na uzyskanie wizualizacji podwójnych pęknięć w łańcuchach DNA tak jak przedstawiono to poniżej (Rysunek 3).



Rysunek 3. Nałożenie wybarwień komórek otrzymanych przy użyciu DAPI i Alexa Fluor 488

W wyniku nałożenia dwóch wybarwień łańcuchy DNA widoczne są na pozyskiwanych obrazach fluorescencyjnych jako obszary świecące barwą niebieską, natomiast ogniska podwójnych pęknięć DNA odpowiadają czerwonym punktom.

Liczba ognisk podwójnych uszkodzeń DNA zależna jest od dawki promieniowania jonizującego – im większa dawka, tym większa liczba podwójnych uszkodzeń. Jednak w przypadku kiedy komórki otrzymały dawkę powyżej 20 Gy (tak jak dla potrzeb powyższego eksperymentu), liczba ognisk podwójnych przerwań DNA była tak duża, że ich identyfikacja w komórce stała się niemożliwa. Przypadek taki został przedstawiony poniżej (Rysunek 4).



Rysunek 4. Ogniska podwójnych przerwań nici DNA: a) ogniska rozróżnialne b) ogniska nie rozróżnialne.

3. Określenie sygnału fluorescencyjnego od podwójnych uszkodzeń DNA

W sytuacji, kiedy w komórce nie można określić w sposób ilościowy podwójnych uszkodzeń DNA powstałych w wyniku ekspozycji na promieniowanie rentgenowskie, należy wybrać inną metodę określającą zależność intensywności sygnału fluorescencyjnego od dawki pochłoniętego promieniowania jonizującego.

Metoda, która została zaproponowana w niniejszej pracy polega na określeniu stosunku intensywności barwy czerwonej w komórce (podwójne uszkodzenia DNA) do intensywności barwy niebieskiej (DNA). Im większa liczba podwójnych uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem rentgenowskim tym większy stosunek tych dwóch barw, co można wyrazić ogólną zależnością:

$$K = \frac{R}{B} \quad (1)$$

gdzie:

K – względna liczba podwójnych uszkodzeń DNA,

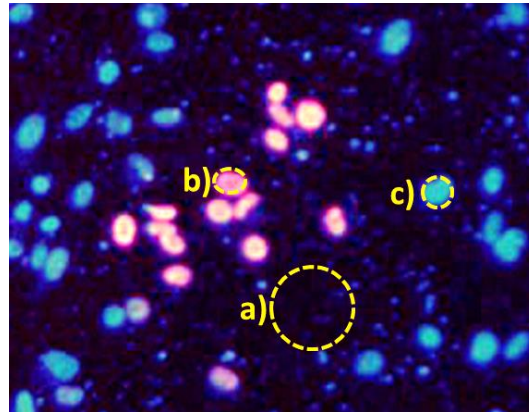
R – intensywność barwy czerwonej sygnału fluorescencyjnego,

B – intensywność barwy niebieskiej sygnału fluorescencyjnego.

W celu określenia stosunku dwóch barw znajdujących się na zdjęciach obrazów komórek zastosowano algorytm, którego zasadę działania opisano w dalszej części pracy.

3.1 Ogólna charakterystyka zdjęć z mikroskopii fluorescencyjnej

Na zdjęciach fluorescencyjnych pozyskanych z mikroskopu można wyróżnić trzy obszary: szum, sygnał fluorescencyjny od komórki naświetlonej oraz sygnał fluorescencyjny od komórki nienaświetlonej (Rysunek 5).



Rysunek 5. Zdjęcie fluorescencyjne obrazu komórek z wyróżnionymi obszarami: a) szum, b) sygnał fluorescencyjny od komórki naświetlonej, c) oraz sygnał fluorescencyjny od komórki nienaświetlonej.

Szum na powyższych obrazach powstaje w wyniku rejestracji przez kamerę światła, które emituje lampa rtęciowa, otoczenie (laboratoryjne warunki zewnętrzne) oraz medium, w którym umieszczone są komórki oraz poprzez niedoskonałość użytej elektroniki (tzw. prąd ciemny). Poziom świecenia szumu jest taki sam zarówno dla obszarów, w których występują komórki jak i poza nimi. W idealnym przypadku tło (obszar, w którym nie zaobserwowano komórek) powinno być całkowicie czarne, ale stan taki w praktyce jest nieosiągalny. Sygnał fluorescencyjny od komórki naświetlonej powstaje w wyniku nałożenia na siebie dwóch barw, czerwonej oraz niebieskiej, emitowanych przez zastosowane barwniki odpowiednio Alexa Fluor 488 oraz DAPI. W zależności od liczby uszkodzeń powstałych w komórce udział barwy czerwonej w tych obszarach będzie posiadał odpowiednią wartość.

Sygnał fluorescencyjny od komórki nienaświetlonej składający się głównie z niebieskiej komponenty barwy powstaje w wyniku barwienia DAPI. Komórki nienaświetlone znajdują się poza zasięgiem wiązki promieniowania rentgenowskiego.

3.2 Określenie poziomu intensywności szumu na zdjęciach fluorescencyjnych

Zdjęcia pozyskiwane z mikroskopu fluorescencyjnego są zapisywane w 8 bitowym formacie JPG. Oznacza to, że barwa odpowiadająca danemu pikselowi zdjęcia jest kombinacją liniową trzech podstawowych barw: czerwonej, zielonej oraz niebieskiej, co można zapisać w następujący sposób:

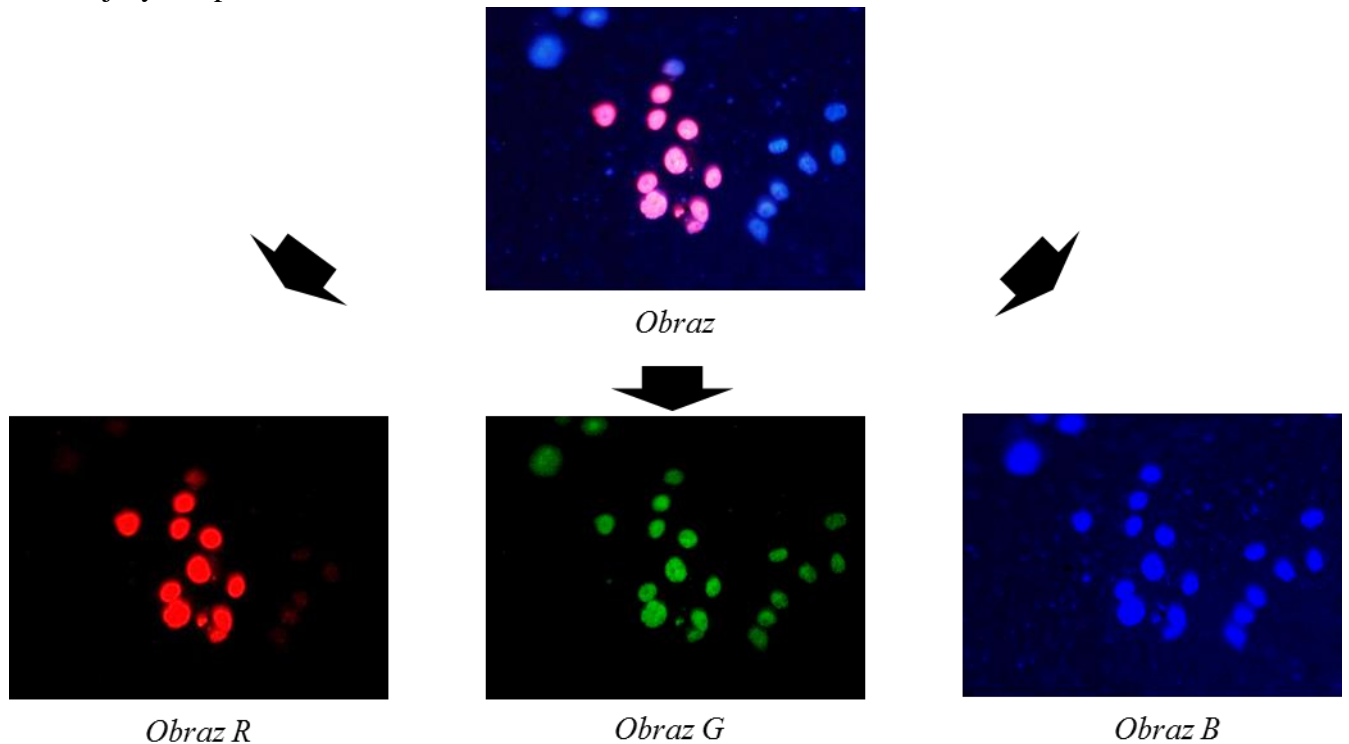
$$\text{barwa}_{ij} = R_{ij} + G_{ij} + B_{ij} \quad (2)$$

gdzie:

barwa_{ij} – barwa piksela (ij),

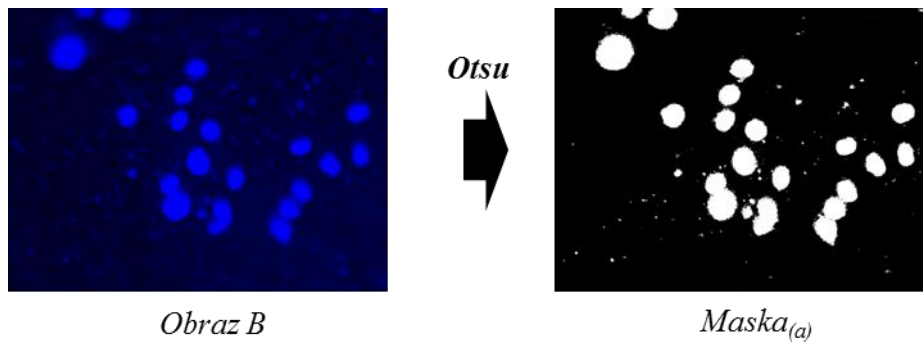
R_{ij} – wartość barwy czerwonej piksela ij ,
 G_{ij} – wartość barwy niebieskiej piksela ij ,
 B_{ij} – wartość barwy zielonej piksela ij .

Składowe R_{ij} , G_{ij} , B_{ij} przyjmują wartości od 0 do 255. Z tego względu istnieje możliwość odczytu zdjęcia w trzech składowych barwach osobno. Operacja ta została pokazana na przykładowym zdjęciu komórek – Rysunek 6. Zdjęcie to, zwane dalej *Obraz*, zostało użyte do przedstawienia metody określenia sygnału fluorescencyjnego od podwójnych uszkodzeń DNA w niniejszym raporcie.



Rysunek 6. Zdjęcie fluorescencyjne obrazu komórek i jego odczyt w trzech składowych barwach osobno

Do analizy poszczególnych obszarów wymienionych wcześniej użyto zdjęć z kanału czerwonego (R) oraz niebieskiego (B). Zielony kanał (G) nie był brany w tym przypadku pod uwagę. Aby uzyskać Obraz R i Obraz B pozbawiony szumu, należy znaleźć średnią wartość barwy czerwonej oraz niebieskiej piksela tła - $\bar{sr}R_{ij(a)}$, $\bar{sr}B_{ij(a)}$. W tym celu z zdjęć *Obraz R* i *Obraz B* należy wyciąć obszary, w których znajdują się komórki. Wycinanie obszarów, w których znajdowały się komórki (wszystkie!) odbywało się przy wykorzystaniu obrazu binarnego - $Maska_{(a)}$. Obraz ten powstawał przez binaryzację zdjęcia *Obraz B* metodą Otsu [8] – Rysunek 7.



Rysunek 7. Zdjęcie binarne wszystkich komórek - $Maska_{(a)}$ powstałe w wyniku użycia metody binaryzacji Otsu na $Obraz B$

Białe piksele obrazu binarnego reprezentujące komórki posiadają wartość 255, natomiast czarne piksele z obszaru tła wartość 0. Wycinanie z obrazów obszarów, w których znajdowały się komórki odbywa się poprzez odejmowanie od zdjęć obrazu maski, co można zapisać:

$$Obraz R - Maska_{(a)} = Obraz R_{(a)} \quad (3)$$

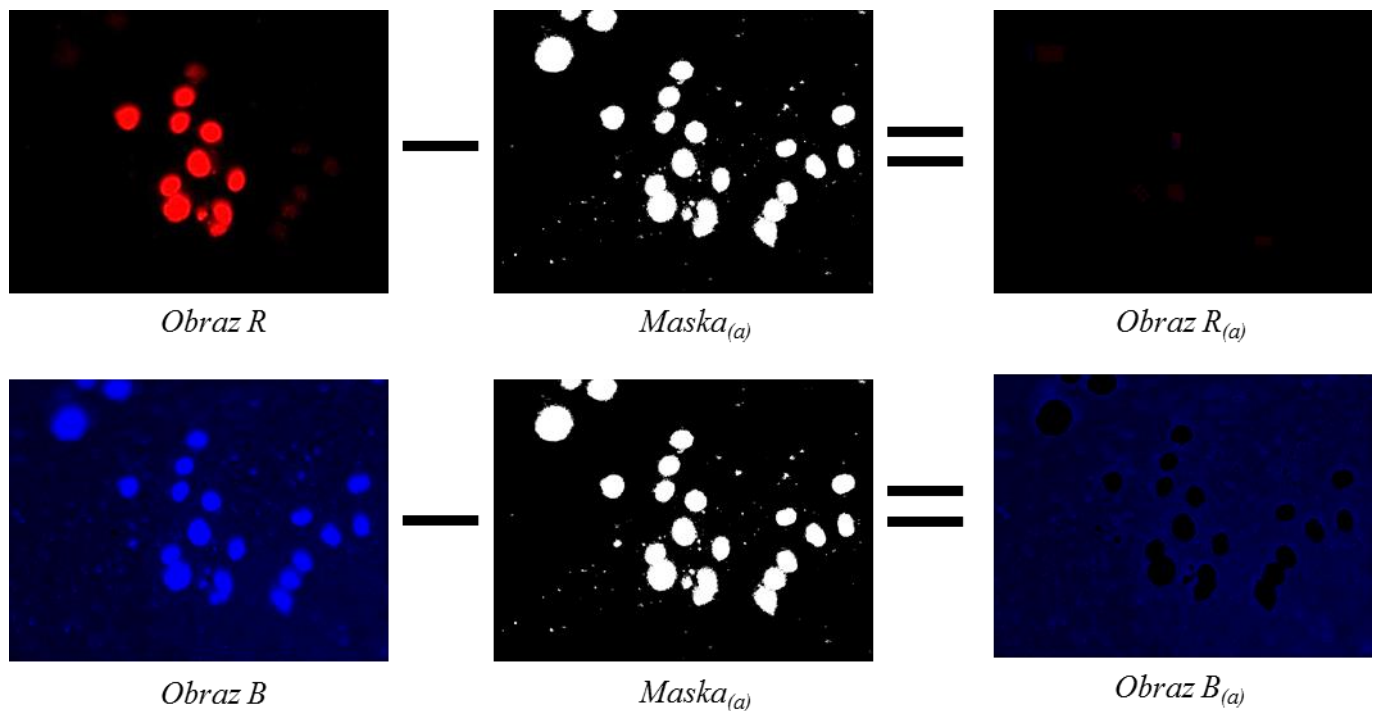
$$Obraz B - Maska_{(a)} = Obraz B_{(a)} \quad (4)$$

gdzie:

$Obraz R_{(a)}$ – $Obraz R$ bez komórek,

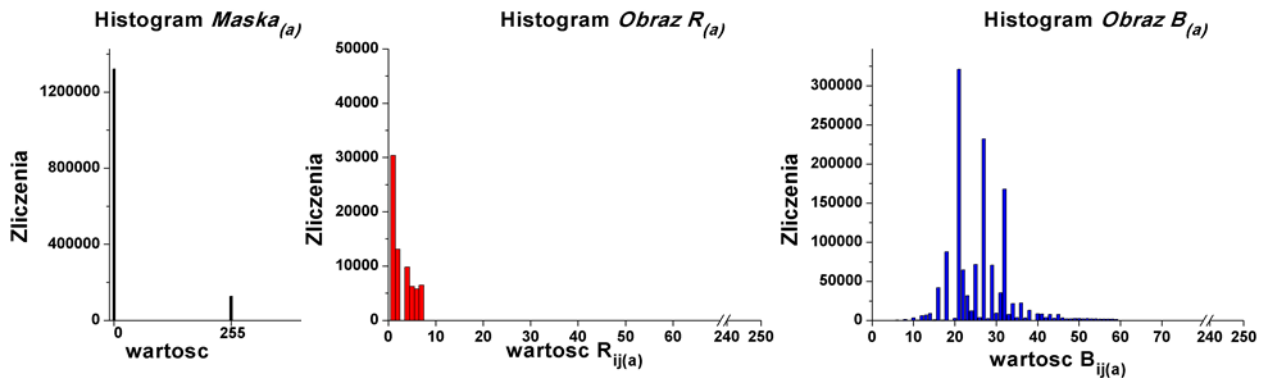
$Obraz B_{(a)}$ – $Obraz B$ bez komórek.

Wynik przedstawionego odejmowania zdjęć od siebie został zaprezentowany poniżej.



Rysunek 8. Graficzne przedstawienie operacji odejmowania zdjęć

Na podstawie $Maska_{(a)}$, $Obraz R_{(a)}$ oraz $Obraz B_{(a)}$ uzyskano histogramy wartości pikseli tych obrazów – Rysunek 9.



Rysunek 9. Rozkład wartości pikseli dla obrazów: $Maska_{(a)}$, $Obraz R_{(a)}$ oraz $Obraz B_{(a)}$

Z otrzymanych histogramów uzyskano informację o liczbie pikseli znajdujących się w obszarze komórek – n (piksele o wartości 255 $Maska_{(a)}$), iliczba pikseli w obszarze tła – $n_{(a)}$ (piksele o wartości 0 $Maska_{(a)}$), oraz obliczono średnią wartość barwy czerwonej oraz niebieskiej piksela tła – $\acute{s}rR_{ij(a)}$, $\acute{s}rB_{ij(a)}$ według równań:

$$\acute{s}rR_{ij(a)} = \frac{\sum_{ij} R_{ij(a)}}{n_{(a)}} \quad (5)$$

$$\acute{s}rB_{ij(a)} = \frac{\sum_{ij} B_{ij(a)}}{n_{(a)}} \quad (6)$$

gdzie:

$R_{ij(a)}$ – wartość barwy czerwonej piksela z obszaru tła,

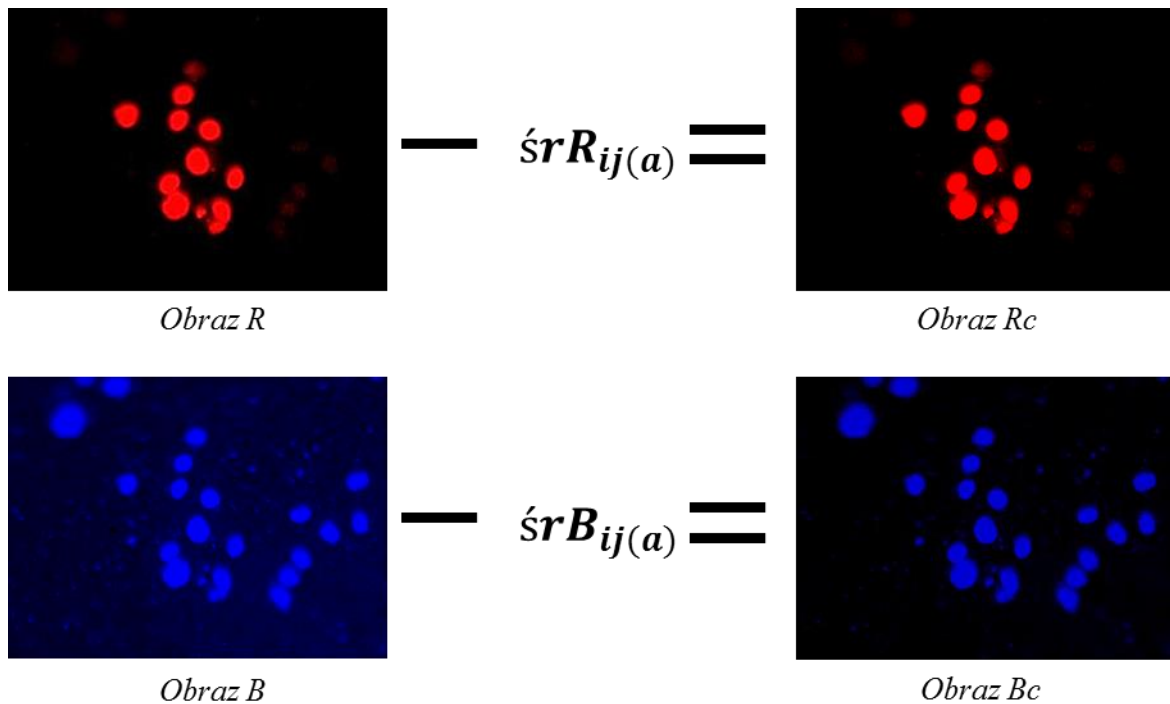
$B_{ij(a)}$ – wartość barwy niebieskiej piksela z obszaru tła.

Odejmując otrzymane wartości $\acute{s}rR_{ij(a)}$, $\acute{s}rB_{ij(a)}$ od obrazów otrzymano obrazy „czyste” – pozbawione szumu – $Obraz Rc$ i $Obraz Bc$, co można zapisać:

$$Obraz R - \acute{s}rR_{ij(a)} = Obraz Rc \quad (7)$$

$$Obraz B - \acute{s}rB_{ij(a)} = Obraz Bc \quad (8).$$

Wynik przedstawionego odejmowania wartości średnich od obrazów został zaprezentowany poniżej – Rysunek 10.

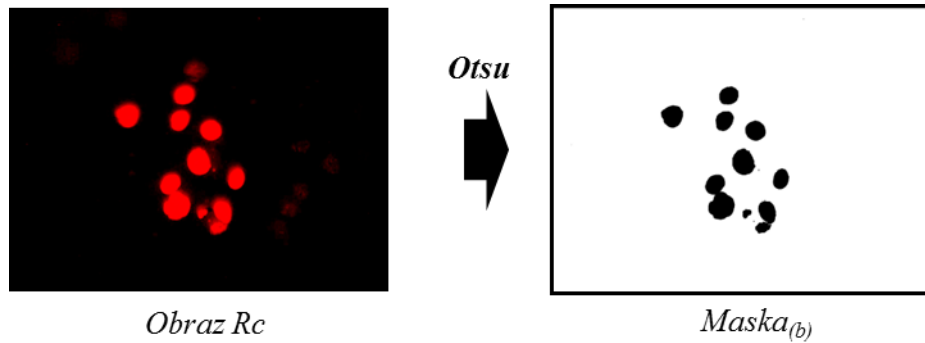


Rysunek 10. Zdjęcia obrazów komórek z szumem oraz zdjęcia obrazów komórek po odjęciu szumu.

Pod odjęciu od zdjęć *Obraz R* i *Obraz B* średniej wartości szumu otrzymane zdjęcia posiadają mniejszą intensywność barwy czerwonej i niebieskiej w obszarze tła, ale również w obszarze występowania komórek. Szum występuje na obszarze całego zdjęcia, ale określenie jego średniej wartości jest możliwe tylko z odczytu wartości pikseli występujących w obszarach tła. Kolejne operacje, czyli określanie sygnału od komórek naświetlonych oraz nienaświetlonych są przeprowadzane na zdjęciach pozbawionych szumu – *Obraz Rc* i *Obraz Bc*.

3.3 Określenie poziomu intensywności sygnału komórek naświetlonych na zdjęciach fluorescencyjnych

W celu wyznaczenia względnej liczby uszkodzeń w komórkach naświetlonych zgodnie z ogólnym równaniem (1), należy wyznaczyć stosunek średniej wartości barwy czerwonej - $\hat{sr}R_{ij(b)}$ do średniej wartości barwy niebieskiej - $\hat{sr}B_{ij(b)}$ w pikselach reprezentujących obszar naświetlonych komórek. Aby móc wyznaczyć średnie wartości barw należy z zdjęć *Obraz Rc* i *Obraz Bc* wyciąć wszystkie komórki nienaświetlone (niebieskie), w ten sposób by na zdjęciach pozostały tylko komórki naświetlone (czerwone). Pozyskiwanie zdjęć na których znajdowały się tylko komórki naświetlone, wykonywane było przy wykorzystaniu obrazu binarnego – $Maska_{(b)}$. Obraz ten powstawał przez binaryzację zdjęcia *Obraz Rc* metodą Otsu [8] – Rysunek 11.



Rysunek 11. Zdjęcie binarne naświetlonych komórek - $Maska_{(b)}$ powstałe w wyniku użycia metody binaryzacji Otsu na $Obraz Rc$

Czarne piksele obrazu binarnego reprezentujące komórki naświetlone posiadają wartość 0, natomiast białe piksele z obszaru tła oraz komórek nienaświetlonych, posiadają wartość 255. Wycinanie z obrazów obszarów z komórkami nienaświetlone oraz tłem odbywa się poprzez odejmowanie od zdjęć ($Obraz Rc$, $Obraz Bc$) obrazu maski ($Maska_{(b)}$), co można zapisać:

$$Obraz Rc - Maska_{(b)} = Obraz Rc_{(b)} \quad (9)$$

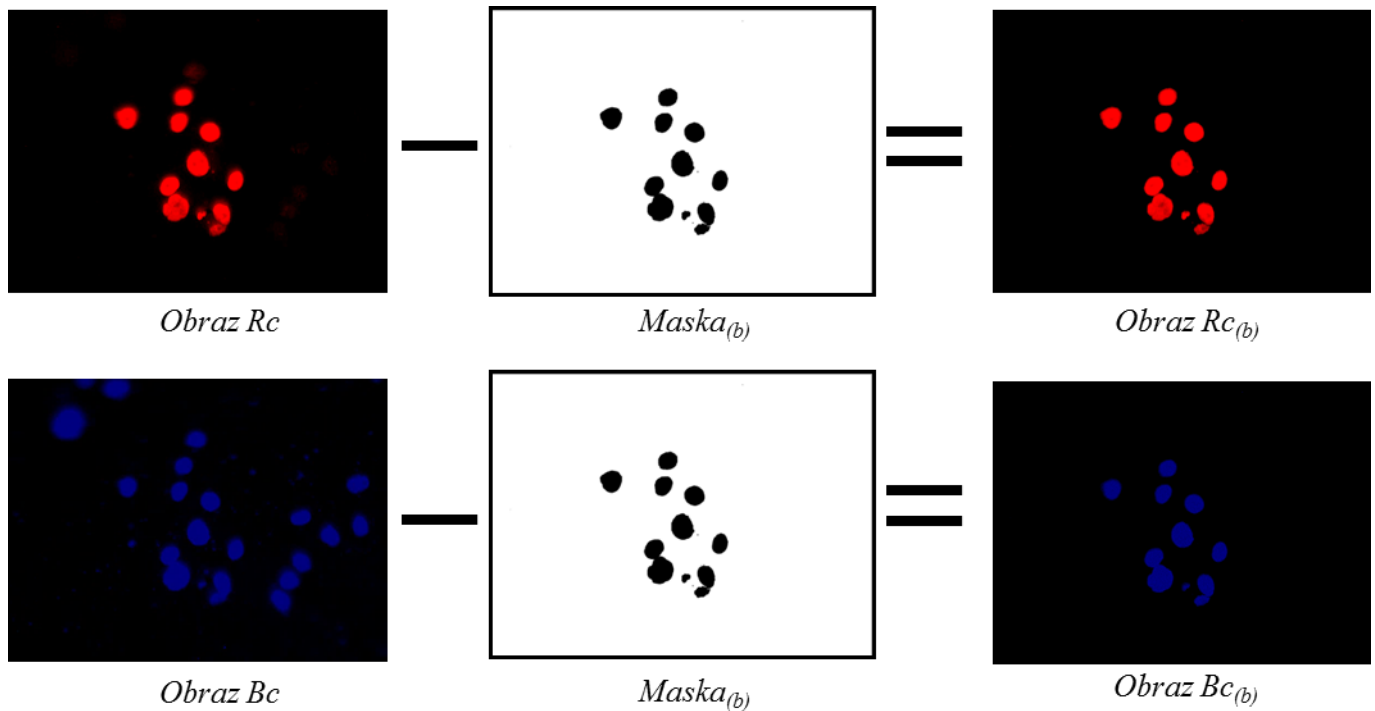
$$Obraz Bc - Maska_{(b)} = Obraz Bc_{(b)} \quad (10)$$

gdzie:

$Obraz Rc_{(b)}$ – $Obraz Rc$ bez komórek nienaświetlonych i tła,

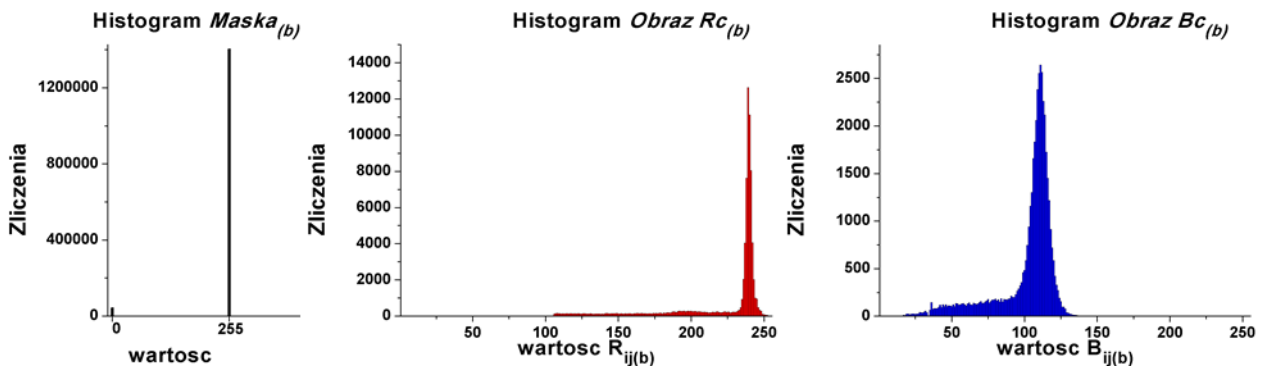
$Obraz Bc_{(b)}$ – $Obraz Bc$ bez komórek bez komórek nienaświetlonych i tła.

Wynik przedstawionego odejmowania zdjęć i maski komórek naświetlonych został zaprezentowany poniżej.



Rysunek 11 Graficzne przedstawienie operacji odejmowania maski komórek naświetlonych od zdjęć

Z otrzymanych $Maska_{(b)}$, $Obraz Rc_{(b)}$ oraz $Obraz Bc_{(b)}$ wyznaczono histogramy wartości pikseli tych obrazów – Rysunek 12.



Rysunek 12. Rozkład wartości pikseli dla obrazów: $Maska_{(b)}$, $Obraz Rc_{(b)}$ oraz $Obraz Bc_{(b)}$

Na podstawie otrzymanych histogramów uzyskano informację o liczbie pikseli znajdujących się w obszarze komórek naświetlonych – $n_{(b)}$ (piksele o wartości 0 $Maska_{(b)}$), oraz obliczono średnią wartość barwy czerwonej i niebieskiej piksela znajdującego się w obszarze komórki naświetlonej - $\bar{sr}R_{ij(b)}$, $\bar{sr}B_{ij(b)}$ według równań:

$$\bar{sr}R_{ij(b)} = \frac{\sum_{ij} R_{ij(b)}}{n_{(b)}} \quad (11)$$

$$\bar{sr}B_{ij(b)} = \frac{\sum_{ij} B_{ij(b)}}{n_{(b)}} \quad (12)$$

gdzie:

$R_{ij(b)}$ – wartość barwy czerwonej piksela z obszaru komórki naświetlonej,

$B_{ij(b)}$ – wartość barwy czerwonej piksela z obszaru komórki naświetlonej.

Za niepewność wyznaczonych wielkości przyjęto ich odchylenia standardowe, które zostały obliczone wg równań:

$$u(R_{ij(b)}) = \sqrt{\frac{\sum_{ij}(R_{ij(b)} - \bar{r}R_{ij(b)})^2}{n_{(b)} - 1}} \quad (13)$$

$$u(B_{ij(b)}) = \sqrt{\frac{\sum_{ij}(B_{ij(b)} - \bar{r}B_{ij(b)})^2}{n_{(b)} - 1}} \quad (14)$$

gdzie:

$u(R_{ij(b)})$ – odchylenie standardowe od średniej wartości barwy czerwonej piksela w obszarze komórki naświetlonej,

$u(B_{ij(b)})$ – odchylenie standardowe od średniej wartości barwy niebieskiej piksela w obszarze komórki naświetlonej.

Niepewność stosunku – $u(K_{(b)})$, średniej wartości czerwonej piksela ($\bar{r}R_{ij(b)}$) do średniej wartości niebieskiej piksela ($\bar{r}B_{ij(b)}$) w obszarze komórki naświetlonej wyznaczono z niepewności złożonej określonej równaniem:

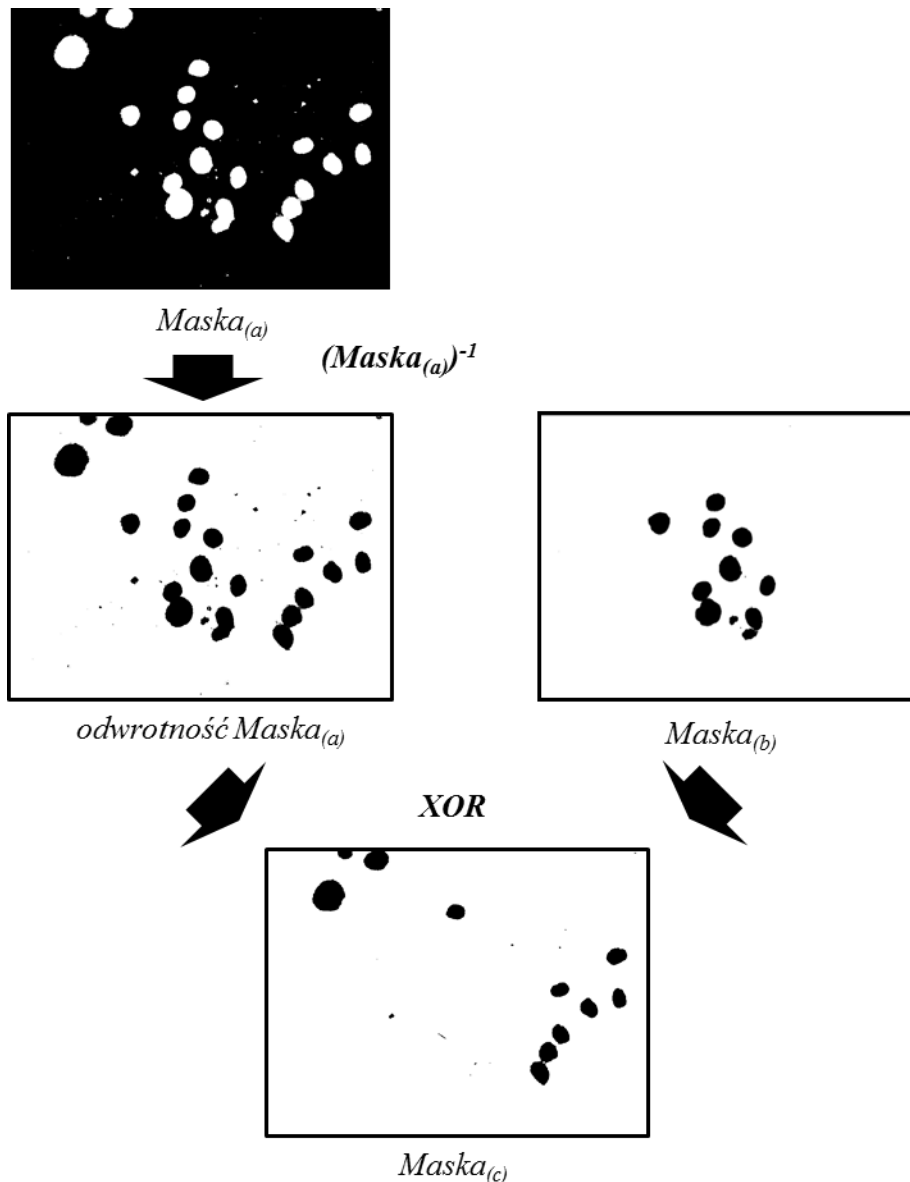
$$u(K_{(b)}) = \sqrt{\frac{(\bar{r}B_{ij(b)})^2 u^2(R_{ij(b)}) + (\bar{r}R_{ij(b)})^2 u^2(B_{ij(b)})}{(\bar{r}B_{ij(b)})^4}} \quad (15)$$

Względną liczbę uszkodzeń w komórkach naświetlonych, opisaną równaniem ogólnym (1), można więc przedstawić jako:

$$K_{(b)} = \frac{\bar{r}R_{ij(b)}}{\bar{r}B_{ij(b)}} \pm u(K_{(b)}) \quad (16).$$

3.4 Określenie poziomu intensywności sygnału komórek nienaświetlonych na zdjęciach fluorescencyjnych

W celu wyznaczenia względnej liczby uszkodzeń w komórkach nienaświetlonych zgodnie z ogólnym równaniem (1), wykonane zostały analogiczne operacje jak w przypadku komórek naświetlonych. Zasadnicza różnica w tym przypadku polegała na tym, że aby móc wyznaczyć stosunek średniej wartości barwy czerwonej - $\bar{r}R_{ij(c)}$ do średniej wartości barwy niebieskiej - $\bar{r}B_{ij(c)}$ w pikselach reprezentujących obszar nienaświetlonych komórek posłużono się innym rodzajem maski wycinającej wszystkie komórki naświetlone (czerwone) oraz tło z zdjęć *Obraz Rc* i *Obraz Bc*. Pozyskiwanie takich zdjęć wykonywane było przy wykorzystaniu obrazu binarnego – *Maska_(c)*. Obraz ten powstawał przez kombinację dwóch obrazów binarnych [9]: odwrotności obrazu *Maska_(a)* i obrazu *Maska_(b)* – Rysunek 13.



Rysunek 13. Otrzymywanie obrazu $Mask_{(c)}$ przy użyciu funkcji XOR na odwrotności obrazu $Mask_{(a)}$ i obrazie $Mask_{(b)}$

Dzięki zastosowaniu operatora XOR – alternatywy wzajemnie wykluczającej się uzyskano obraz binarny $Mask_{(c)}$. Czarne piksele obrazu binarnego reprezentujące komórki nienaświetlone posiadają wartość 0, natomiast białe piksele z obszaru tła oraz komórek naświetlonych, posiadają wartość 255. Wycinanie z obrazów obszarów z komórkami naświetlonymi oraz tłem odbywa się poprzez odejmowanie od zdjęć (*Obraz Rc*, *Obraz Bc*) obrazu maski ($Mask_{(c)}$), co można zapisać:

$$\text{Obraz Rc} - Mask_{(c)} = \text{Obraz Rc}_{(c)} \quad (17)$$

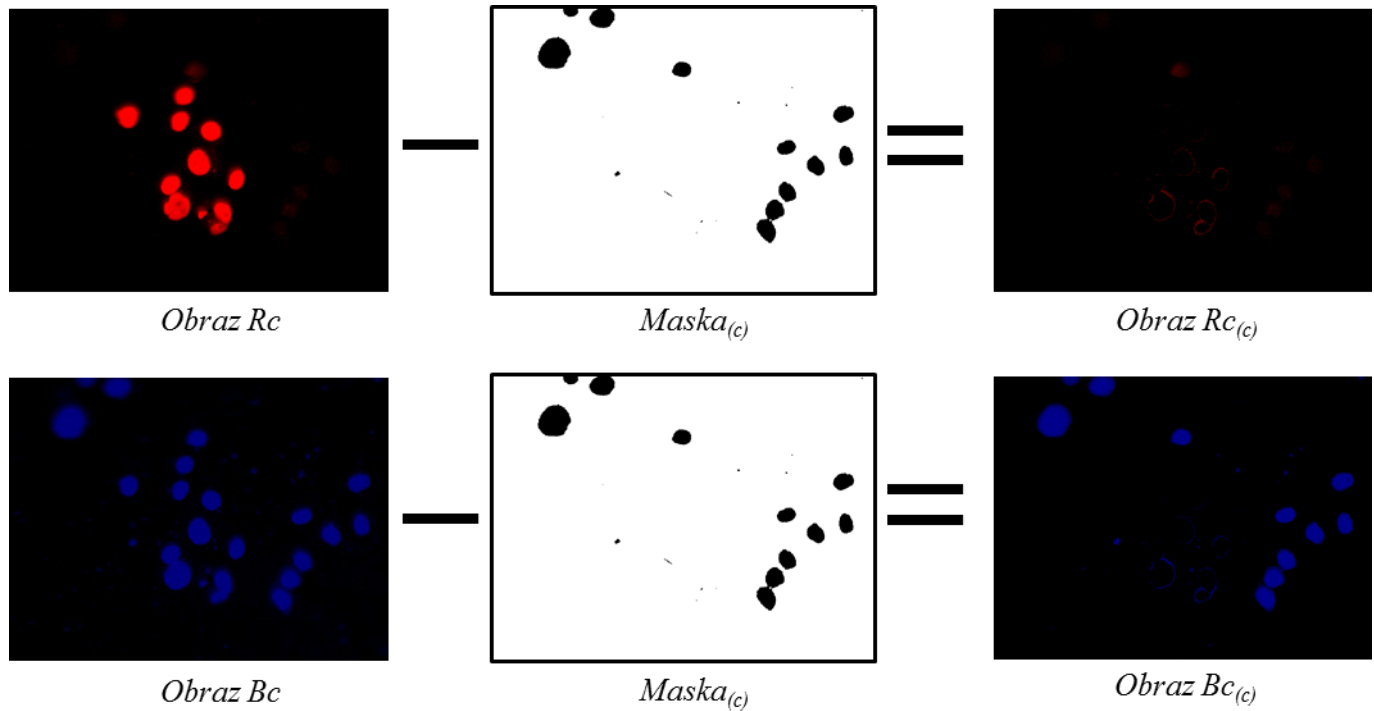
$$\text{Obraz Bc} - Mask_{(c)} = \text{Obraz Bc}_{(c)} \quad (18)$$

gdzie:

$\text{Obraz Rc}_{(c)}$ – *Obraz Rc* bez komórek naświetlonych i tła,

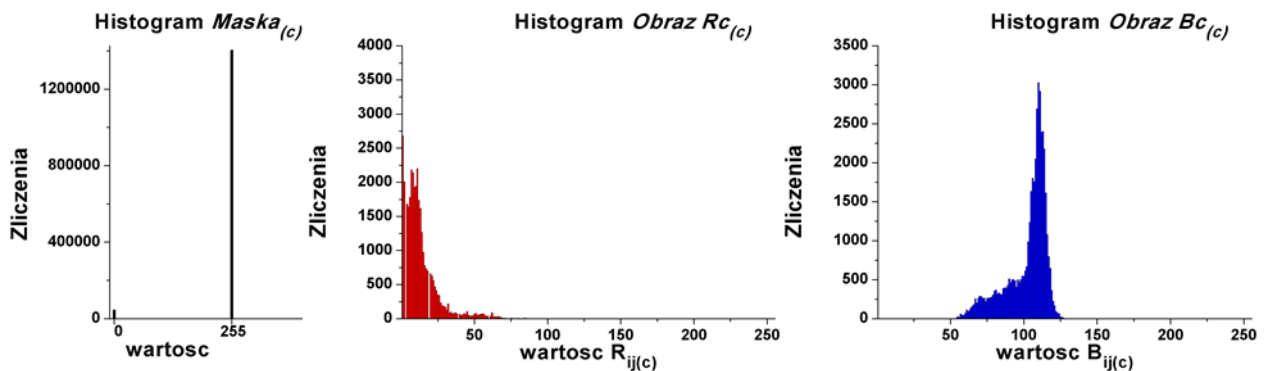
$\text{Obraz Bc}_{(c)}$ – *Obraz Bc* bez komórek bez komórek naświetlonych i tła.

Wynik odejmowania zdjęć od maski komórek nienaświetlonych został zaprezentowany poniżej.



Rysunek 14. Graficzne przedstawienie operacji odejmowania maski komórek nienaświetlonych od zdjęć

Z otrzymanych $Maska_{(c)}$, $Obraz Rc_{(c)}$ oraz $Obraz Bc_{(c)}$ wyznaczono histogramy wartości pikseli tych obrazów – Rysunek 15.



Rysunek 15. Rozkład wartości pikseli dla obrazów: $Maska_{(c)}$, $Obraz Rc_{(c)}$ oraz $Obraz Bc_{(c)}$

Na podstawie otrzymanych histogramów uzyskano informację o liczbie pikseli znajdujących się w obszarze komórek nienaświetlonych – $n_{(c)}$ (piksele o wartości 0 $Maska_{(c)}$), oraz obliczono średnią wartość barwy czerwonej i niebieskiej piksela znajdującego się w obszarze komórki nienaświetlonej - $\bar{sr}R_{ij(c)}$, $\bar{sr}B_{ij(c)}$ według równań:

$$\bar{sr}R_{ij(c)} = \frac{\sum_{ij} R_{ij(c)}}{n_{(c)}} \quad (19)$$

$$\acute{s}rB_{ij(c)} = \frac{\sum_{ij} B_{ij(c)}}{n_{(c)}} \quad (20)$$

gdzie:

$R_{ij(c)}$ – wartość barwy czerwonej piksela z obszaru komórki nienaświetlonej,

$B_{ij(c)}$ – wartość barwy czerwonej piksela z obszaru komórki nienaświetlonej.

Podobnie jak w przypadku określania niepewności wyznaczanych wielkości dla obszarów komórek napromienionych, za niepewność wyznaczonych wielkości przyjęto ich odchylenia standardowe, które zostały obliczone wg równań:

$$u(R_{ij(c)}) = \sqrt{\frac{\sum_{ij} (R_{ij(c)} - \acute{s}rR_{ij(c)})^2}{n_{(c)} - 1}} \quad (21)$$

$$u(B_{ij(c)}) = \sqrt{\frac{\sum_{ij} (B_{ij(c)} - \acute{s}rB_{ij(c)})^2}{n_{(c)} - 1}} \quad (22)$$

gdzie:

$u(R_{ij(c)})$ – odchylenie standardowe od średniej wartości barwy czerwonej piksela w obszarze komórki nienaświetlonej,

$u(B_{ij(c)})$ – odchylenie standardowe od średniej wartości barwy niebieskiej piksela w obszarze komórki nienaświetlonej.

Niepewność stosunku – $u(K_{(c)})$, średniej wartości czerwonej piksela ($\acute{s}rR_{ij(c)}$) do średniej wartości niebieskiej piksela ($\acute{s}rB_{ij(c)}$) w obszarze komórki nienaświetlonej wyznaczono z niepewności złożonej określonej równaniem:

$$u(K_{(c)}) = \sqrt{\frac{(\acute{s}rB_{ij(c)})^2 u^2(R_{ij(c)}) + (\acute{s}rR_{ij(c)})^2 u^2(B_{ij(c)})}{(\acute{s}rB_{ij(c)})^4}} \quad (23)$$

Względną liczbę uszkodzeń w komórkach nienaświetlonych, opisaną ogólnym równaniem (1), można więc przedstawić jako:

$$K_{(c)} = \frac{\acute{s}rR_{ij(c)}}{\acute{s}rB_{ij(c)}} \pm u(K_{(c)}) \quad (24).$$

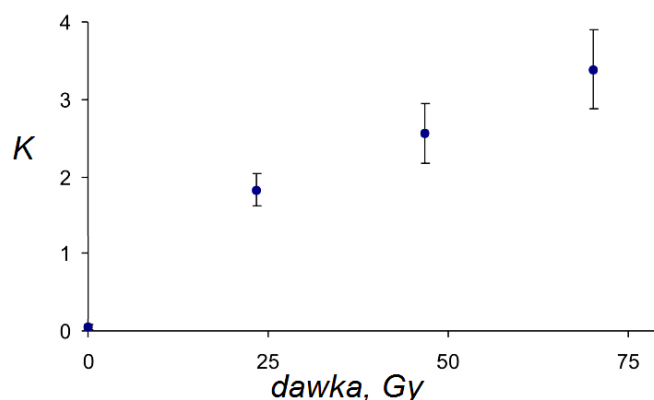
Wyniki uzyskane przy wykorzystaniu wyżej opisanych algorytmów, dla zdjęcia *Obraz* zostały przedstawione w tabeli poniżej.

Tabela 1 Średnia wartość piksela barwy czerwonej i niebieskiej z obszaru tła (obszar a))	
$R_{ij(a)}$	$\acute{s}rB_{ij(a)}$
0,16	26,08

Tabela 2 Średnia wartość piksela barwy czerwonej i niebieskiej z obszaru komórki naświetlonej (obszar b))					
$\bar{sr}R_{ij(b)}$	$u(R_{ij(b)})$	$\bar{sr}B_{ij(b)}$	$u(B_{ij(b)})$	$K_{(b)}$	$u(K_{(b)})$
239,49	1,72	110,65	5,39	2,16	0,11

Tabela 3 Średnia wartość piksela barwy czerwonej i niebieskiej z obszaru komórki nienaświetlonej (obszar c))					
$\bar{sr}R_{ij(c)}$	$u(R_{ij(c)})$	$\bar{sr}B_{ij(c)}$	$u(B_{ij(c)})$	$K_{(c)}$	$u(K_{(c)})$
10,09	11,05	110,09	4,76	0,09	0,10

Przy wykorzystaniu prezentowanych algorytmów została dokonana analiza względnej liczby uszkodzeń DNA w komórkach, poddanych na ekspozycję promieniowania rentgenowskiego, którego dawka wynosiła: 23,5; 47,0 oraz 70,0 Gy. Wyniki uzyskane z tego eksperymentu zostały opublikowane [10], a zależność względnej liczby uszkodzeń DNA od pochłoniętej dawki została pokazana poniżej (Rysunek 16).



Rysunek 16. Względna liczba uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem rentgenowskim w zależności od dawki dla linii komórkowej PC-3

4. Wnioski

W niniejszym raporcie przedstawiona została w sposób ogólny metoda określania intensywności oraz zależności między intensywnością dwóch różnych barw sygnału fluorescencyjnego. Sygnał fluorescencyjny pochodził od dwóch różnych specyficznych barwników fluorescencyjnych: Alexa Fluor (czerwony) oraz DAPI (niebieski).

W przedstawionej pracy udało się określić i otrzymać:

1. poziom szumu występujący na zdjęciach mikroskopii fluorescencyjnej, tak jak zostało opisane to równaniami (5) i (6);
2. zdjęcia fluorescencyjne zredukowane o poziom szumu (Rysunek 10);
3. zdjęcia fluorescencyjne z obszarami, na których występują tylko komórki danego rodzaju: naświetlone lub nienaświetlone (Rysunek 11, Rysunek 14);
4. względną ilość uszkodzeń występującą w komórkach naświetlonych i nienaświetlonych, tak jak zostało osiane to równaniami (16) i (24);

5. niepewność wyznaczania względnej liczby uszkodzeń zgodnie z równaniami (15) i (23).

Zastosowane rozwiązania oraz przedstawiony sposób obliczeń można zaimplementować do skryptu działającego w środowisku różnych programów graficznych np.: ImageJ, ImagePro lub Matlab. W celu poprawnego działania zaproponowanych algorytmów powinny być zachowane takie same warunki akwizycji zdjęć takie jak np. intensywność świecenia źródła światła mikroskopu fluorescencyjnego, czas akwizycji kamery, czułość kamery, oświetlenie zewnętrzne (laboratorium), powiększenie optyczne.

Podziękowania

Badania zostały wykonane z wykorzystaniem aparatury zakupionej w ramach projektu współfinansowanego ze środków Małopolskiego Regionalnego Programu Operacyjnego Działanie 5.1 Krakowski Obszar Metropolitalny jako ważny węzeł europejskiej przestrzeni badawczej na lata 2007-2013, projekt nr MRPO.05.01.00-12-013/15.

Acknowledgements

The research was performed using equipment in the frame as part of the project co-funded by the Małopolska Regional Operational Programme Measure 5.1 Krakow Metropolitan Area as an important hub of the European Research Area for 2007- 2013, project No. MRPO.05.01.00-12-013/15

Literatura:

- [1] *Biologiczne podstawy radioterapii*, A. Gasińska, AGH Ośrodek Edukacji Niestacjonarnej, 2001
- [2] *γ H2AX jako marker dwuniciowych pęknięć DNA*, Monika Podhorecka, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2009; 63: 92-98,
- [3] *Application of focused X-ray beams in radiation biology*, J. Lekki, Z Stachura, S. Bożek, J. Bielecki, *Handbook of short wavelength laboratory sources: Principles & Practices*, 2014
- [4] *Konstrukcja i wykorzystanie mikrowiązki promieniowania X do badań radiobiologicznych na poziomie komórkowym*, Sebastian Bożek, rozprawa doktorska, IFJ PAN, 2012
- [5] *Multipurpose X-ray microprobe in the IFJ PAN. Technical description*, J. Bielecki, S. Bożek, A. Banaś, J. Baszak, H. Doruch, R. Hajduk, J. Kowalska, T. Pieprzyca, Z. Szklarz, J. Lekki, Z. Stachura, W. M. Kwiatek, Raport IFJ PAN nr 2025/AP,
- [6] *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*, M. E. Kaighn i inni., 1979. *Invest. Urol.* 17. 16-23
- [7] *Dose response and kinetics of foci disappearance following exposure to high- and low-LET ionizing radiation*, R. Ugenskiene, R. i inni, 2009. *Int. J. of Rad. Biol.* 85. 872-82
- [8] Imagej, http://imagej.net/Auto_Threshold, 14.11.2016
- [9] Imagej User Guide, <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-30.html> , 14.11.2016

[10] *X-ray microbeam stand-alone facility for cultured cells irradiation*, S. Bożek, J. Bielecki, A. Wiecheć, Z. Stachura, K. Pogoda, J. Lekki, E. Lipiec, K. Tkocz, W. M. Kwiatek, Nuclear Instruments and Methods B (accepted), 2016