

3D-Deconvolution

Το λογισμικό **3D deconvolution** είναι μία μέθοδος ανάλυσης ψηφιακής εικόνας με την οποία απομακρύνεται σήμα που οφείλεται σε φθορισμό εκτός εστίασης (out-of-focus light) από εικόνες που έχουν συλλεχθεί με μικροσκοπία ευρέως πεδίου και βελτιώνεται η ευκρίνεια τους.

Πριν την εφαρμογή του λογισμικού για 3D deconvolution:

1. Λήψη της εικόνας

Για να εφαρμοσθεί αποτελεσματικά η τεχνική του 3D deconvolution, έχει μεγάλη σημασία ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η λήψη της εικόνας.

Αρχικά, αφού επιλέξουμε το πεδίο που θέλουμε να φωτογραφίσουμε, θα πρέπει με μετακίνηση στον Z άξονα πάνω και κάτω από το επίπεδο εστίασης να βρούμε τα όρια του δείγματος (επιλογή του πάχους).

Στη συνέχεια, παίρνουμε μια σειρά από εικόνες που αντιστοιχούν σε οπτικές τομές που ξεκινούν από $\frac{1}{2}$ του πάχους του δείγματος από το πάνω όριο και $\frac{1}{2}$ του πάχους του δείγματος από το κάτω όριο. Δηλαδή, πρακτικά, εάν το δείγμα μας έχει πάχος 20 μm , τότε για το Z-stacking θα πάρουμε +10 μm από την τομή που αποτελεί το πάνω όριο του δείγματος και +10 μm από τη τομή που αποτελεί το κάτω όριο του δείγματος. Συνολικά δηλαδή θα κάνουμε Z-stacking σε 40 μm . Οι οπτικές τομές που απεικονίζουμε πρέπει προσεγγιστικά να έχουν πάχος ίσο με το $\frac{1}{2}$ του μήκους κύματος με το οποίο διεγείρουμε το δείγμα. Π.χ. αν διεγείρουμε με φως 500 nm, τότε καλό είναι οι τομές μας να έχουν πάχος ~ 250 nm.

2. Z-STACK CALCULATOR

Στο Cell R, υπάρχει η επιλογή **Z-stack calculator**, για να υπολογίζουμε το πάχος των τομών που πρέπει να παίρνουμε στο Z-stacking. Επιλέγουμε **Z-stack calculator**, οπότε ανοίγει το παράθυρο “**Z-increment and number of frames**”. Εκεί υπάρχουν οι εξής επιλογές:

-**Z-distance (μm)**: συμπληρώνουμε με το ύψος (height) του δείγματος

-**emission wavelength (nm)**: συμπληρώνουμε με το μήκος κύματος εκπομπής του φθοριοχρώματος που χρησιμοποιούμε

- **refractive index of immersion medium**: π.χ. στην περίπτωση που χρησιμοποιούμε oil, είναι 1.514

- **numerical aperture**: συμπληρώνουμε με το αριθμητικό άνοιγμα φακού

Στη συνέχεια, επιλέγουμε “**calculate count/Z-increment (μm)**”, για να γίνει ο υπολογισμός του πάχους των τομών.

3. Αφαίρεση/διόρθωση του background

Πριν την εφαρμογή του Deconvolution, καλό είναι να κάνουμε αφαίρεση/διόρθωση του background στις ψηφιακές εικόνες που έχουμε συλλέξει.

Αρχικά, στην εικόνα που θέλουμε να κάνουμε αφαίρεση/διόρθωση του background επιλέγουμε **‘define ROIs’**. Ορίζουμε μία περιοχή στην εικόνα που είναι το background. Στη συνέχεια, επιλέγουμε το εικονίδιο **background subtraction**, οπότε ανοίγει το παράθυρο και εκεί στην επιλογή: **‘select ROIs from image’** βάζουμε την εικόνα που θέλουμε, **select ROI**, βάζουμε το ROI που είχαμε δημιουργήσει με το **‘define ROIs’** → **ok**.

Μετά, στην καινούρια εικόνα που εμφανίζεται στο image buffer box, επιλέγουμε **‘Image’** → **‘auto adjust display’**.

ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ DECONVOLUTION

1. NO NEIGHBOR

Είναι ο πιο γρήγορος και ο λιγότερο ακριβής αλγόριθμος. Με τον αλγόριθμο αυτό αφαιρούνται τα μη ευκρινή περιεχόμενα της εικόνας και παραμένουν τα ευκρινή. Ο αλγόριθμος χρησιμοποιείται σε μονοχρωματικές ή πολυχρωματικές εικόνες, σε time-lapse series, σε Z-stacks καθώς και σε 3D time-lapse series.

Εάν θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε τον αλγόριθμο αυτό, ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- Ανοίγουμε την εικόνα στην οποία θα δουλέψουμε.
- Επιλέγουμε **‘Process’** → **‘3D-images’** → **‘3D-deconvolution’**
- Στο **‘3D-deconvolution’**, έχουμε τις εξής επιλογές
 - Filter selection: **‘no neighbor’**
 - Filter parameters: **‘Haze Removal Factor (%)’** -είναι ένας παράγοντας, που καθορίζει το βαθμό της ευκρίνειας που θέλουμε να εφαρμόσουμε. Όσο υψηλότερος ο παράγοντας αυτός, τόσο περισσότερο ευκρινής θα είναι η εικόνα. Συνήθως χρησιμοποιείται μία τιμή γύρω στο 85%.
 - Microscope: transmitted brightfield / phase object

Επιλέγουμε **‘Execute’**, οπότε αρχίζει η λειτουργία του αλγόριθμου.

2. NEAREST NEIGHBORS

Ο αλγόριθμος nearest neighbors είναι παρόμοιος με τον αλγόριθμο no neighbor για αφαίρεση του φθορισμού εκτός επιπέδου εστίασης και θεωρείται πιο ακριβής μέθοδος από την προηγούμενη. Ο αλγόριθμος αυτός χρησιμοποιείται σε μονοχρωματικές ή πολυχρωματικές εικόνες, σε time-lapse series, σε Z-stacks καθώς και σε 3D time-lapse series. Εάν θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε τον αλγόριθμο αυτό, εφαρμόζουμε τα ίδια settings με τον αλγόριθμο no neighbor.

3. INVERSE FILTER

Ο αλγόριθμος inverse filter είναι απλός, ενός βήματος, χωρίς επαναλήψεις. Χρησιμοποιείται για γρήγορα αποτελέσματα, και δεν είναι τόσο ακριβής όσο η μέθοδος **3-D blind deconvolution**. Χρησιμοποιείται σε μονοχρωματικές ή πολυχρωματικές εικόνες, σε Z-stacks καθώς και σε 3D time-lapse series.

Εάν θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε τον αλγόριθμο αυτό, ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- Ανοίγουμε την εικόνα στην οποία θα δουλέψουμε.
- Επιλέγουμε **“Process”** → **“3D-images”** → **“3D-deconvolution”**
- Στο **“3D-deconvolution”**, έχουμε τις εξής επιλογές
 - Filter selection: **‘Inverse filter’**
 - Filter parameters:
 1. **“noise level”**
Υπάρχουν οι επιλογές: auto, low, medium, high. Η επιλογή γίνεται ανάλογα με το επίπεδο του θορύβου στην εικόνα μας. Συνήθως, η επιλογή **“auto”**, δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα.
 2. **“Sub-Volume Overlap (Pixels)”**
Η επιλογή αυτή, καθορίζει τον αριθμό των pixels. Συνήθως χρησιμοποιείται μία τιμή από 10-25 pixels.

4. 3-D BLIND DECONVOLUTION

Ο αλγόριθμος **3D blind deconvolution** θεωρείται η καλύτερη μέθοδος deconvolution. Ο αλγόριθμος αυτός αφαιρεί τον εκτός επιπέδου εστίασης φθορισμό από κάθε επίπεδο εστίασης στον Z-άξονα και τον προσθέτει στο επίπεδο εστίασης από το οποίο προέρχεται (intensity-restoring). Συνεπώς, η ανάλυση της εικόνας ενισχύεται σημαντικά και η συνολική ένταση του φθορισμού στο Z-stack διατηρείται. Επιπλέον, βελτιώνεται ο λόγος signal/background. Οι εικόνες που προέρχονται από 3D blind deconvolution είναι ιδανικές για αναλύσεις ποσοτικοποίησης της έντασης φθορισμού.

Ο αλγόριθμος αυτός χρησιμοποιείται σε μονοχρωματικά ή πολυχρωματικά Z-stacks.

Εάν θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε τον αλγόριθμο αυτό, κάνουμε ως εξής:

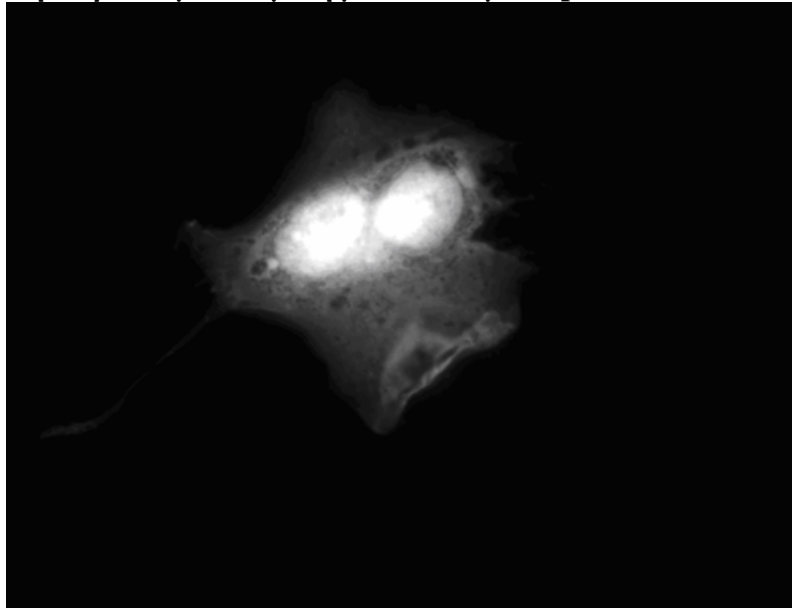
- Ανοίγουμε την εικόνα στην οποία θα δουλέψουμε.
- Επιλέγουμε **‘Process’** → **‘3D-images’** → **‘3D-deconvolution’**
- Στο **‘3D-deconvolution’**, έχουμε τις εξής επιλογές
 - Filter selection: **‘3-D blind deconvolution’**
 - Filter parameters:
 1. **“iterations”**
Όσο περισσότερες επαναλήψεις βάλουμε, τόσο καλύτερο το αποτέλεσμα. 10 επαναλήψεις είναι μία αρχική τιμή, συνήθως χρειάζονται 50-100 επαναλήψεις.
 2. **“Sub-Volume Overlap (Pixels)”**
Η επιλογή αυτή, καθορίζει τον αριθμό των pixels. Συνήθως χρησιμοποιείται μια τιμή από 10-25 pixels.

Microscope:

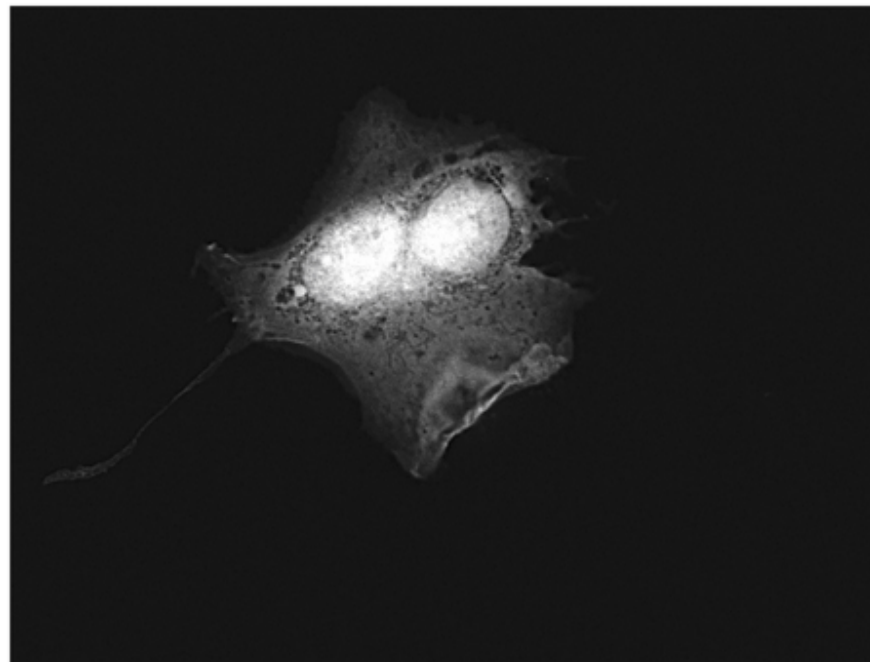
Ανάλογα με την εικόνα που έχουμε, επιλέγουμε είτε 'Widefield fluorescence', είτε 'Transmitted light brightfield'.

Παραδείγματα εικόνων πριν και μετά την επεξεργασία τους με τους αλγόριθμους για deconvolution.

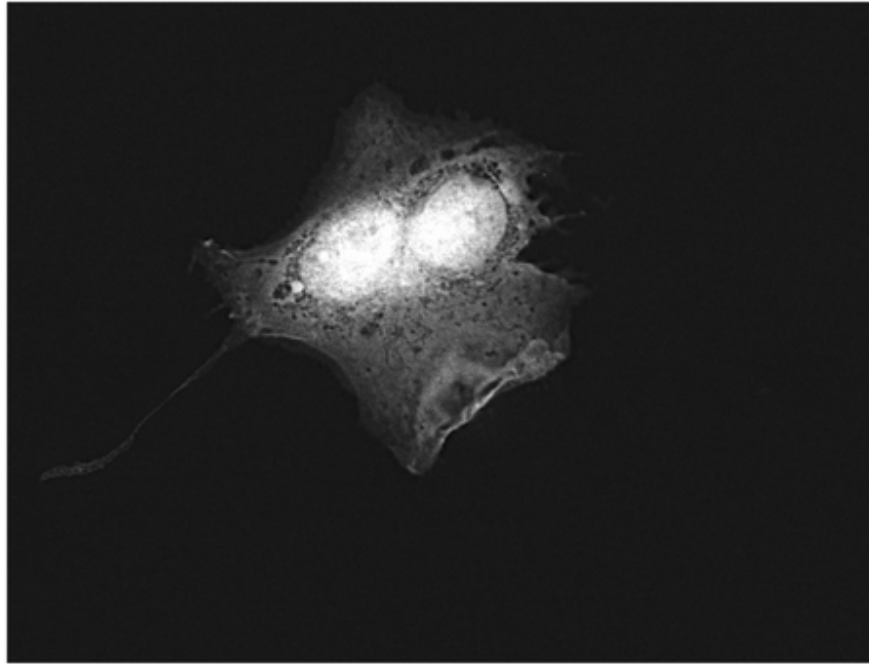
1. Κυτταρική σειρά επιμολυνσμένη με το πλασμίδιο pEYFP-N1



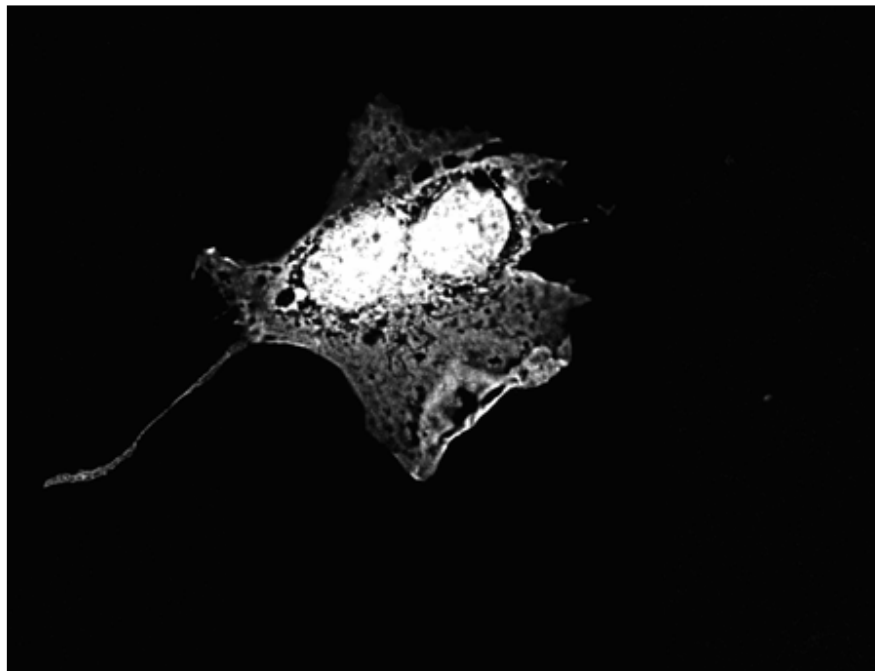
Εικόνα 1. Πριν την εφαρμογή αλγόριθμου για deconvolution



Εικόνα 2. Μετά την εφαρμογή του αλγόριθμου No Neighbor.



Εικόνα 3. Μετά την εφαρμογή του αλγόριθμου Nearest Neighbors.



Εικόνα 4. Μετά την εφαρμογή του αλγόριθμου 3D blind deconvolution.

3. RAW PX-GFP murine mouse macrophages incubated with latex beads (4,5 μm diameter)

