

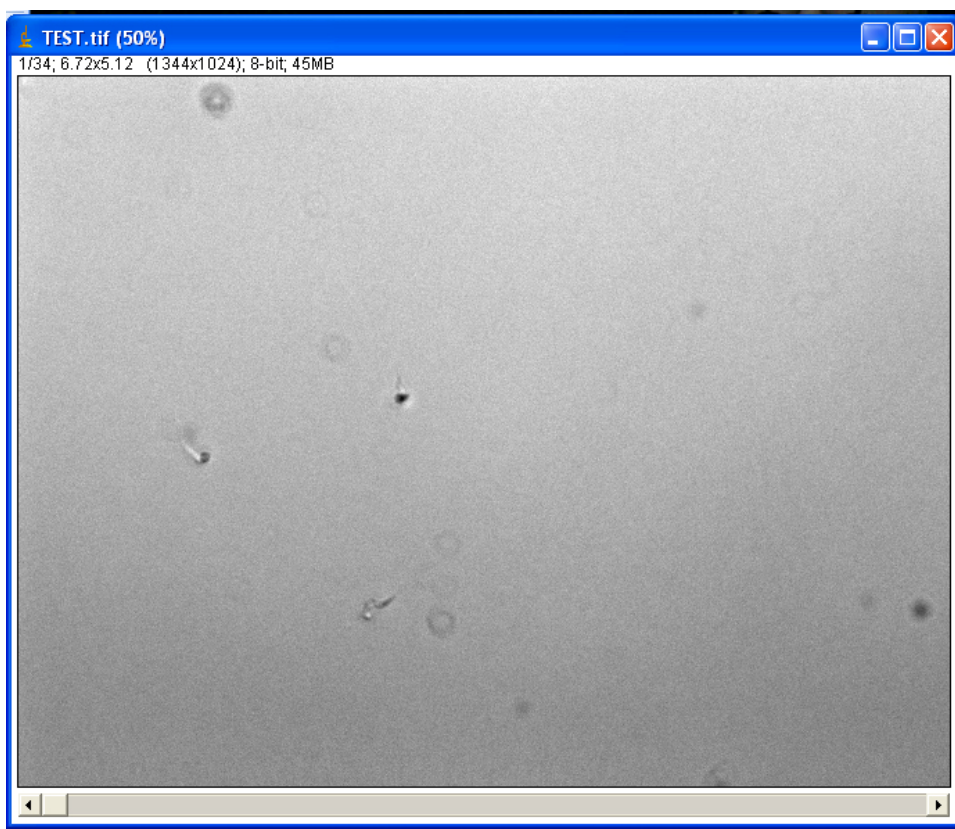
Image J

Plugin MTrackJ- Manual Object Tracker για παρακολούθηση της κίνησης σωματιδίων

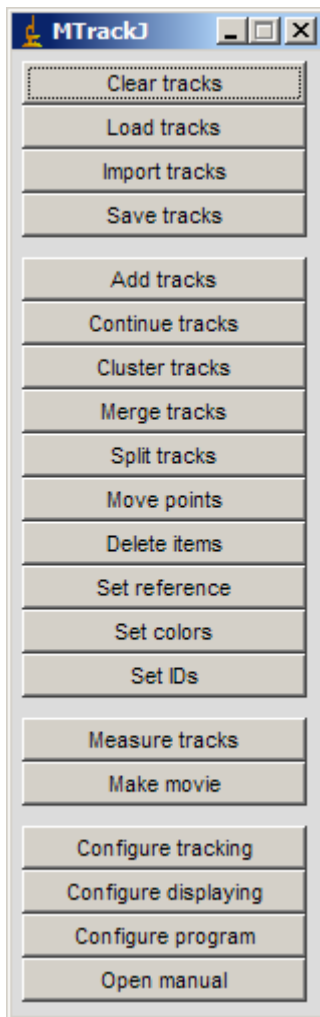
(<http://www.imagescience.org/meijering/software/mtrackj/>)

Το MTrackJ είναι ένα plugin του ImageJ με το οποίο μπορούμε να παρακολουθήσουμε την κίνηση σωματιδίων σε ακολουθίες εικόνων και να μετρήσουμε στατιστικές παραμέτρους των διαδρομών που διανύουν. Με το MTrackJ μπορούμε να επεξεργαστούμε και εικόνες 5D.

Αρχικά ανοίγουμε το ImageJ με διπλό κλικ → file → open → Image Sequence με τη μορφή tif. Το παράδειγμα που ακολουθεί είναι ένα πείραμα live-cell imaging με το μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου OLYMPUS Time lapse Cell R IX-81, στο οποίο θέλουμε να μελετήσουμε την κίνηση των παρασίτων:



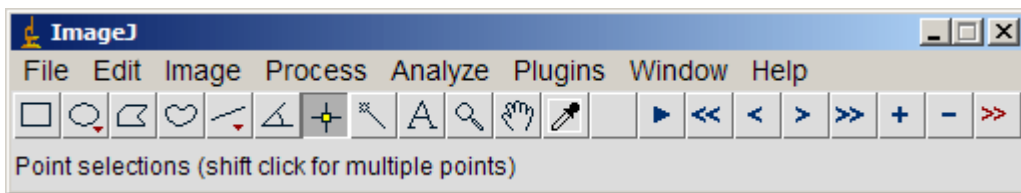
Στη συνέχεια, πηγαίνουμε plugin → MTrackJ, οπότε ανοίγει το παράθυρο MTrackJ:



Περιγραφή

Οι τέσσερις πρώτες επιλογές είναι για να αφαιρέσουμε (clear tracks), να εισάγουμε (load/import tracks) και να σώσουμε τις τροχιές/διαδρομές (save tracks).

Οι επόμενες επιλογές έχουν σχέση με τη δημιουργία και την τροποποίηση των τροχιών. Για να λειτουργήσουν οι επιλογές αυτές πρέπει να είναι ενεργό το '**Point selections tool**' του ImageJ, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Το εργαλείο αυτό ενεργοποιείται αυτόματα.



Add tracks

Τρόπος για να προσθέσουμε τροχιές. Η προσθήκη των τροχιών ξεκινάει με επιλογή του σημείου που μας ενδιαφέρει και κλικ. Το σημείο μαρκάρεται και το πρόγραμμα αυτόματα δείχνει το επόμενο frame της ακολουθίας εικόνων. Η τροχιά δημιουργείται κάνοντας κλικ στο σημείο που μας ενδιαφέρει στα διαδοχικά frames. Η τροχιά ολοκληρώνεται με διπλό κλικ ή με το **Esc**. Στη συνέχεια, μπορούμε να ξεκινήσουμε μία νέα τροχιά, τοποθετώντας το ποντίκι σε νέο σημείο και επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία.

Continue tracks

Τρόπος για να συνεχίσουμε τροχιές που ήδη υπάρχουν. Επιλέγουμε την τροχιά που θέλουμε να συνεχίσουμε, οπότε ενεργοποιείται αυτόματα η επιλογή 'add tracks'.

Cluster tracks

Τρόπος για ομαδοποίηση των τροχιών που υπάρχουν. By default, όλες οι τροχιές τοποθετούνται στο default cluster (cluster 1).

Merge tracks

Τρόπος για να γίνει συγχώνευση δύο τροχιών. Επιλέγουμε με το ποντίκι την πρώτη τροχιά και στη συνέχεια τη δεύτερη τροχιά που θα συγχωνευτεί με την πρώτη.

Split tracks

Τρόπος για να διαιρεθεί μία τροχιά σε δύο σε κάποιο συγκεκριμένο σημείο. Επιλέγουμε με το ποντίκι το σημείο στο οποίο θέλουμε η τροχιά να διαιρεθεί.

Move points

Τρόπος για να μετακινηθούν σημεία μιας ήδη υπάρχουσας τροχιάς. Επιλέγουμε με το ποντίκι το σημείο και το μετακινούμε σέρνοντας το ποντίκι. Μπορούν να αλλάξουν μόνο οι παράμετροι στον x-, y-, και z-άξονα, ενώ ο χρόνος και το κανάλι θα παραμείνουν ίδια.

Delete items

Τρόπος για να διαγραφούν σημεία των τροχιών, τροχιές ή και ομάδες τροχιών (clusters). Επιλέγουμε με το ποντίκι το σημείο, την τροχιά ή το cluster και στη συνέχεια τα διαγράφουμε με το 'delete items'.

Set reference

Τρόπος για να εισάγουμε ένα σημείο αναφοράς στην ακολουθία των εικόνων.

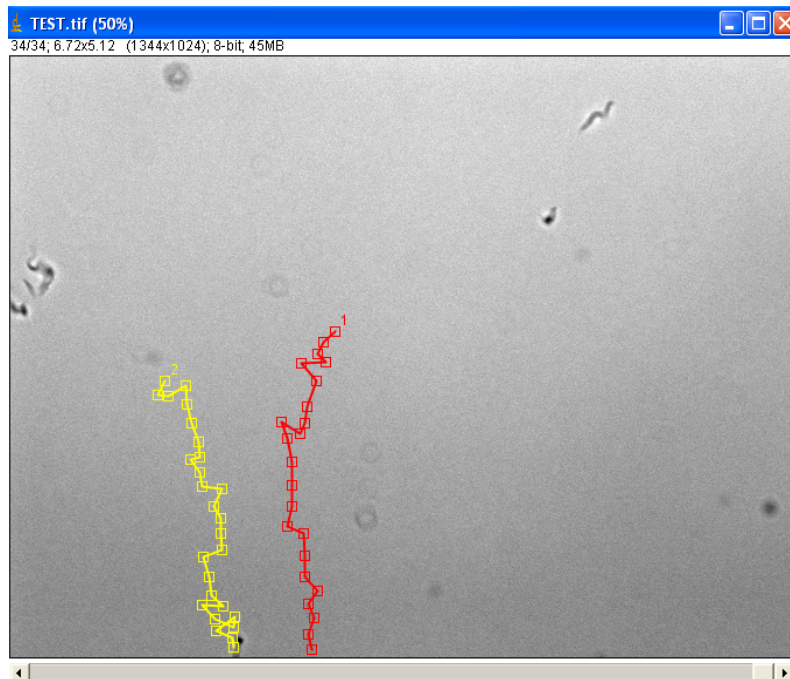
Set colors

Τρόπος για αλλαγή των χρωμάτων των τροχιών. Μετακινώντας το ποντίκι σε μια τροχιά, και επιλέγοντας το 'set colors', επιλέγουμε με ποιο χρώμα θέλουμε να εμφανίζεται η τροχιά.

Set IDs

Τρόπος για αλλαγή των αριθμών ID των σημείων, των τροχιών ή των clusters, καθώς μερικές εφαρμογές μπορεί να εισάγουν κενά στην αρίθμηση, π.χ. η διαγραφή. Μπορούμε να διορθώσουμε την αρίθμηση αυτόματα, επιλέγοντας 'set IDs' και ταυτόχρονα πιέζοντας το **Ctrl**.

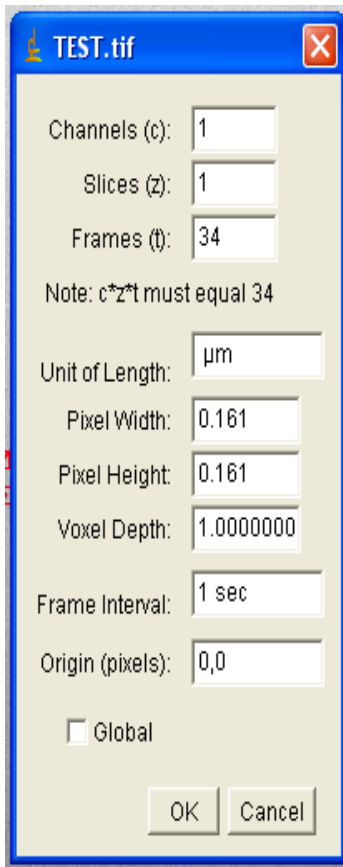
Στο παράδειγμα, σχεδιάσαμε τις τροχιές που διαγράφουν δύο παράσιτα ως εξής:



ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΩΝ ΤΡΟΧΙΩΝ

Measure tracks

Πριν γίνει ο υπολογισμός των διάφορων παραμέτρων των τροχιών, θα πρέπει να γίνει σωστή βαθμονόμηση των εικόνων. Αυτό γίνεται ανοίγοντας το: **Image** → **Properties**, οπότε ανοίγει το παράθυρο, στο οποίο συμπληρώνουμε τα πεδία:



- **channels:** τον αριθμό των καναλιών που έχει η ακολουθία των εικόνων που μελετάμε
- **slices:** τον αριθμό των οπτικών τομών στον Z-άξονα
- **frames:** αριθμό των frames του χρόνου.
- **Unit of Length:** μονάδα μήκους (συνήθως επιλέγουμε µm)

Για να υπολογίσουμε τις υπόλοιπες παραμέτρους, εφόσον έχουμε χρησιμοποιήσει το μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου OLYMPUS Time lapse Cell R IX-81, κάνουμε ως εξής: Δεξί κλικ στην εικόνα που υπάρχει στο viewport → image information. Ανοίγει

το παράθυρο αυτό, στο οποίο φαίνονται οι πληροφορίες για την εικόνα. Στο παράδειγμα μας:

- **Resolution (pixels):** 1344 x 1024 (width x height)

- **Width:** 216,4 μm . Δηλαδή τα 1344 pixels αντιστοιχούν σε 216,4 μm . Συνεπώς το pixel width είναι 0,161 μm .

- **Height:** 164,9 μm . Δηλαδή τα 1024 pixels αντιστοιχούν σε 164,9 μm . Συνεπώς το pixel width είναι 0,161 μm .

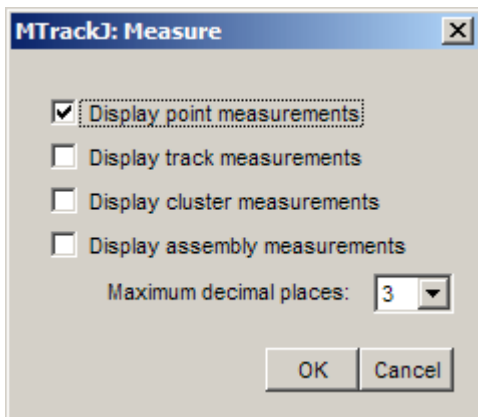
Με βάση αυτά τα στοιχεία, μπορούμε να συμπληρώσουμε τα υπόλοιπα πεδία:

- **Pixel Width:** 0,161 μm

- **Pixel Height:** 0,161 μm

- **Frame Interval:** χρονικό διάστημα που μεσολαβεί ανάμεσα σε δύο λήψεις (είναι η τιμή που έχουμε δώσει στο 'cycle time' σε πείραμα time-lapse).

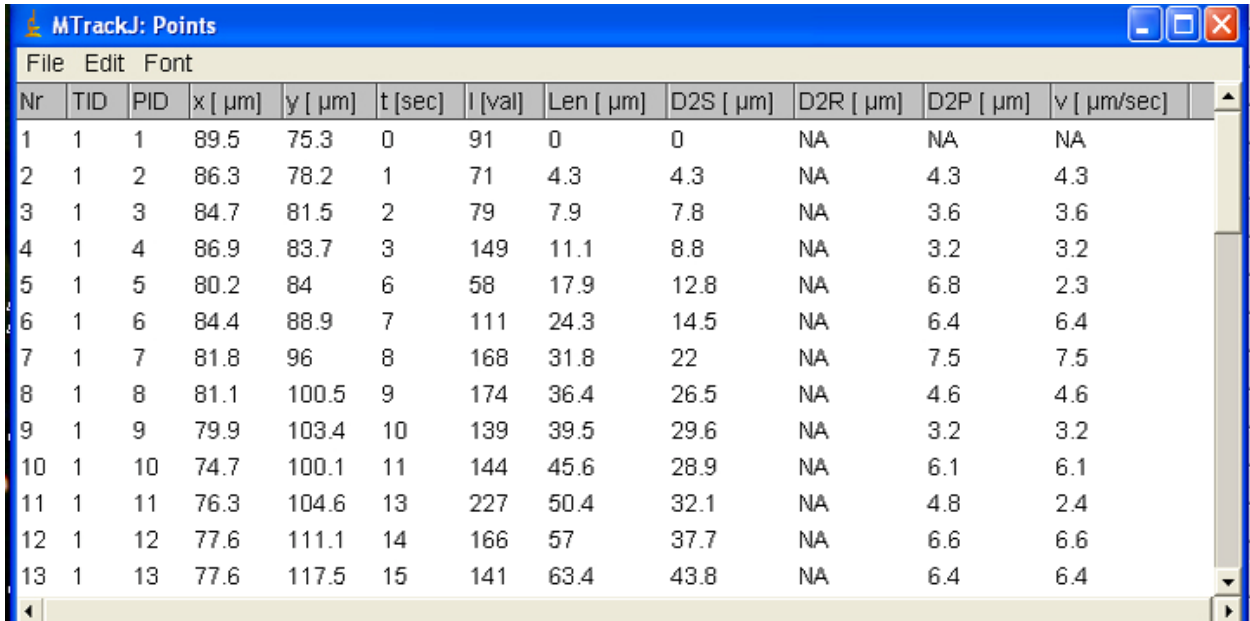
Επιλέγοντας το 'measure tracks', ανοίγει ένα παράθυρο στο οποίο μπορούμε να επιλέξουμε ποια είδη μετρήσεων θα εμφανιστούν:



- **Display point measurements:** για να εμφανίζονται οι μετρήσεις για κάθε σημείο της τροχιάς.
- **Display track measurements:** για να εμφανίζονται οι μετρήσεις για κάθε τροχιά. Στα αποτελέσματα εμφανίζονται η ελάχιστη, η μέγιστη, η μέση και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων για κάθε σημείο της τροχιάς. Επίσης, εμφανίζεται ο αριθμός των σημείων, η ολική διάρκεια και το ολικό μήκος για κάθε τροχιά.
- **Display cluster measurements:** για να εμφανίζονται οι μετρήσεις για κάθε cluster. Στα αποτελέσματα εμφανίζονται για κάθε cluster η ελάχιστη, η μέγιστη, η μέση, και η τυπική απόκλιση όλων των μετρήσεων. Επιπλέον, εμφανίζεται ο αριθμός των τροχιών και των σημείων σε κάθε cluster, καθώς και η ελάχιστη, η

μέγιστη, η μέση, και η τυπική απόκλιση της διάρκειας και των μηκών των τροχιών στο cluster.

Στη συνέχεια, επιλέγουμε OK, οπότε εμφανίζεται ο πίνακας με τα αποτελέσματα. Ο πίνακας μπορεί να σωθεί (File → Save As σε μορφή Excel).



The screenshot shows a window titled "MTrackJ: Points" with a menu bar (File, Edit, Font) and a table of data. The table has 13 columns: Nr, TID, PID, x [μm], y [μm], t [sec], l [val], Len [μm], D2S [μm], D2R [μm], D2P [μm], and v [μm/sec]. The data is organized into 13 rows, each representing a point in a track. The first column (Nr) ranges from 1 to 13. The second column (TID) is constant at 1. The third column (PID) ranges from 1 to 13. The remaining columns contain numerical values, with some cells containing "NA" (Not Available).

Nr	TID	PID	x [μm]	y [μm]	t [sec]	l [val]	Len [μm]	D2S [μm]	D2R [μm]	D2P [μm]	v [μm/sec]
1	1	1	89.5	75.3	0	91	0	0	NA	NA	NA
2	1	2	86.3	78.2	1	71	4.3	4.3	NA	4.3	4.3
3	1	3	84.7	81.5	2	79	7.9	7.8	NA	3.6	3.6
4	1	4	86.9	83.7	3	149	11.1	8.8	NA	3.2	3.2
5	1	5	80.2	84	6	58	17.9	12.8	NA	6.8	2.3
6	1	6	84.4	88.9	7	111	24.3	14.5	NA	6.4	6.4
7	1	7	81.8	96	8	168	31.8	22	NA	7.5	7.5
8	1	8	81.1	100.5	9	174	36.4	26.5	NA	4.6	4.6
9	1	9	79.9	103.4	10	139	39.5	29.6	NA	3.2	3.2
10	1	10	74.7	100.1	11	144	45.6	28.9	NA	6.1	6.1
11	1	11	76.3	104.6	13	227	50.4	32.1	NA	4.8	2.4
12	1	12	77.6	111.1	14	166	57	37.7	NA	6.6	6.6
13	1	13	77.6	117.5	15	141	63.4	43.8	NA	6.4	6.4

Περιγραφή των παραμέτρων του πίνακα

- **Nr:** ο αριθμός των σημείων που επιλέξαμε και αποτελούν την τροχιά.
- **TID:** ο αριθμός της τροχιάς στην οποία ανήκει το κάθε σημείο.
- **PID:** ο αριθμός του κάθε σημείου
- **x [unit]:** ο βαθμονομημένος x-άξονας του κάθε σημείου. Για να είναι σωστή η τιμή αυτή έχει σημασία το 'pixel width' και το 'unit of length', που ορίστηκαν στο **Image → Properties**.
- **y [unit]:** ο βαθμονομημένος y-άξονας του κάθε σημείου. Για να είναι σωστή η τιμή αυτή έχει σημασία το 'pixel height' και το 'unit of length', που ορίστηκαν στο **Image → Properties**.
- **z [unit]:** ο βαθμονομημένος z-άξονας του κάθε σημείου. Για να είναι σωστή η τιμή αυτή έχει σημασία το 'voxel depth' και το 'unit of length', που ορίστηκαν στο **Image → Properties**. Η παράμετρος αυτή δεν εμφανίζεται σε 2D ακολουθίες εικόνων.
- **t [unit]:** η παράμετρος του χρόνου σε κάθε σημείο. Για να είναι σωστή η τιμή αυτή έχει σημασία το 'frame interval' και το 'unit of time', που ορίστηκαν στο **Image → Properties**.

- **c [idx]:** το κανάλι στο οποίο ανήκει το κάθε σημείο. Η παράμετρος αυτή δεν εμφανίζεται εάν υπάρχει μόνο ένα κανάλι.
- **I [unit]:** η ένταση στο σημείο της τροχιάς.
- **Len [unit]:** το μήκος της τροχιάς από την αρχή (πρώτο σημείο) έως το τρέχον σημείο. Συνεπώς, η τιμή αυτής της παραμέτρου για το τελευταίο σημείο της τροχιάς ισοδυναμεί με το ολικό μήκος της τροχιάς.
- **D2S [unit]:** η απόσταση από το πρώτο σημείο της τροχιάς μέχρι το τρέχον σημείο. Η τιμή αυτής της παραμέτρου θα είναι πάντα μικρότερη ή ίση με την τιμή της παραμέτρου **Len**.
- **D2R [unit]:** η απόσταση από το τρέχον σημείο μέχρι το σημείο αναφοράς. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, δεν έχουμε ορίσει σημείο αναφοράς.
- **D2P [unit]:** η απόσταση από το τρέχον σημείο έως το προηγούμενο σημείο της τροχιάς.
- **v [unit]:** η ταχύτητα του σωματιδίου στο τρέχον σημείο. Η παράμετρος αυτή υπολογίζεται ως η απόσταση που διένυσε το σωματίδιο από το προηγούμενο έως το τρέχον σημείο, διαιρούμενη με τον χρόνο που μεσολάβησε (frame interval).

Οι μετρήσεις που δεν έχουν κάποια λογική τιμή μαρκάρονται με **NA**.

Make movie

Με την επιλογή αυτή, όλες οι τροχιές και τα σημεία από τα οποία αποτελούνται μπορούν να δημιουργήσουν μια ταινία, που να περιέχει τους χρόνους και τις σχεδιασμένες τροχιές. Η ταινία αυτή μπορεί να σωθεί ως εξής: **File** → **Save As** → **AVI**.

