

1. ANALÝZA OBRAZU

1.2 AKO VIEME ZISTIŤ KOĽKO JE V KRVÍ KRVINIEK?

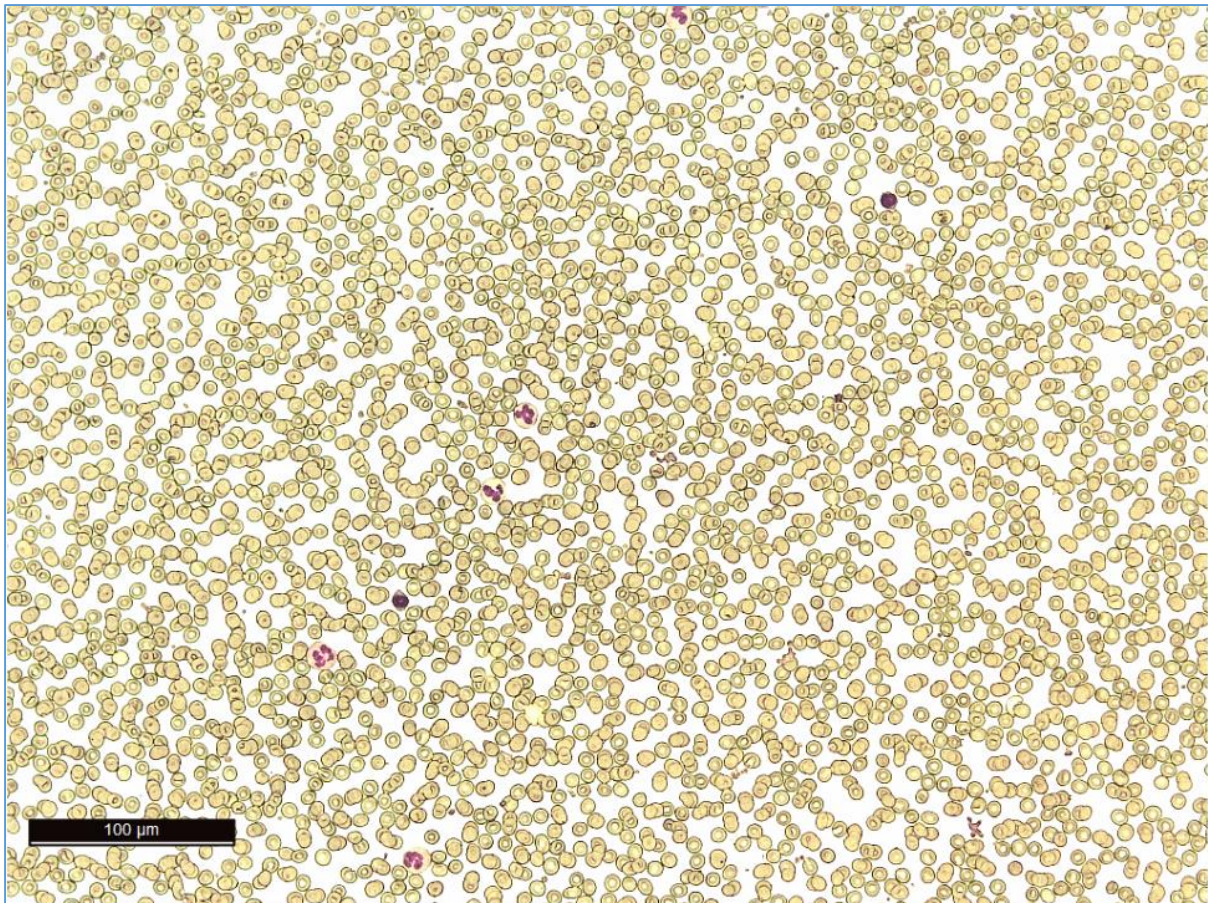
Pozorne si prezrite fotografiu krvného náteru.

Otázky:

Ako rozpoznáte červené krvinky, biele krvinky a krvné doštičky v tomto normálnom, zdravom krvnom nátere?

Ktorých krvných elementov je v krvi **najviac**? Prečo je to tak?

Krvný náter



Akú funkciu plnia biele krvinky?

Nájdite na veľkom obrázku **krvnú doštičku**. Je menšia, než krvinky. **Prečo je dôležitá?**

Otázka:

Aké sú normálne hodnoty počtu krviniek na liter krvi?

Vyšší alebo nižší počet krvných elementov môže signalizovať ochorenie.

Nájdite a na internete a porovnajte optimálne hodnoty počtu krvných buniek z viacerých zdrojov.

Otázka:

Ako sa dá zistiť počet krviniek na liter krvi?

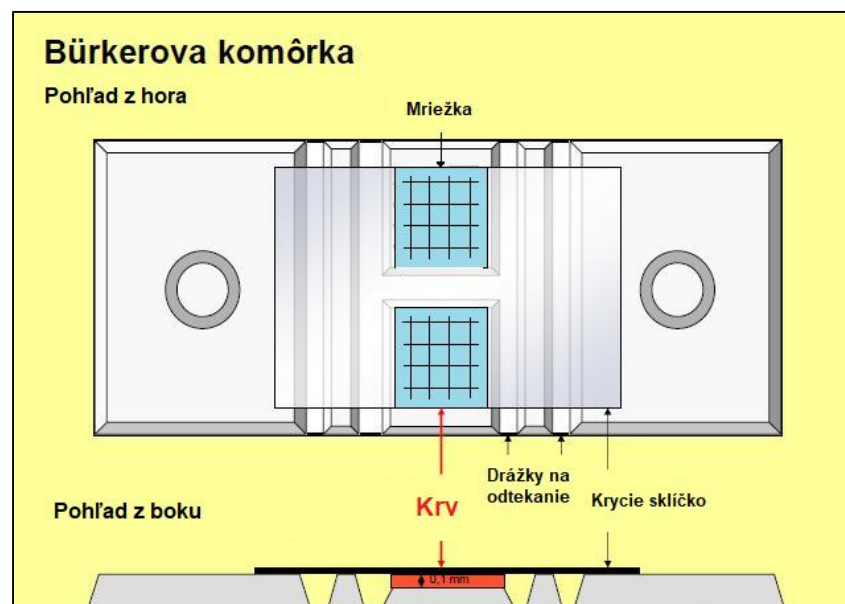
Úloha 1:

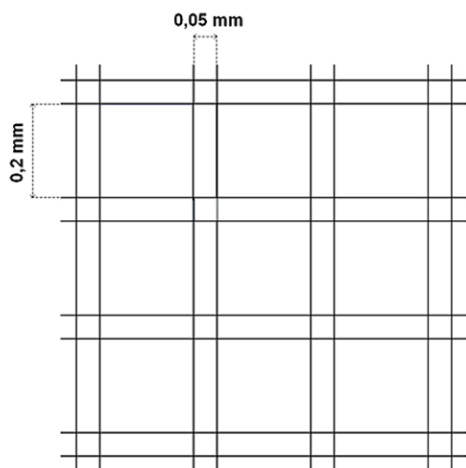
Navrhnite spôsob, ako by sa dal spočítať počet krviniek v jednom litri krvi.

Vymyslite analogický model efektívneho počítania malých častíc vo veľkom objeme, na ktorom vysvetlíte svoj postup.

Ako sa to robí v praxi

Na počítanie červených alebo bielych krviniek sa používa **Bürkerova komôrka**. Je to špeciálne podložné sklíčko, ktoré má vymedzenú, presne o 0,1 mm prehĺbenú časť rozdelenú mriežkou na štvorce a obdĺžniky. Keďže poznáme rozmery mriežky, vieme aký objem vzorky sa nachádza nad jednotlivými políčkami – veľkým, stredným a najmenším štvorcom a obdĺžnikmi v naplnenej komôrke.





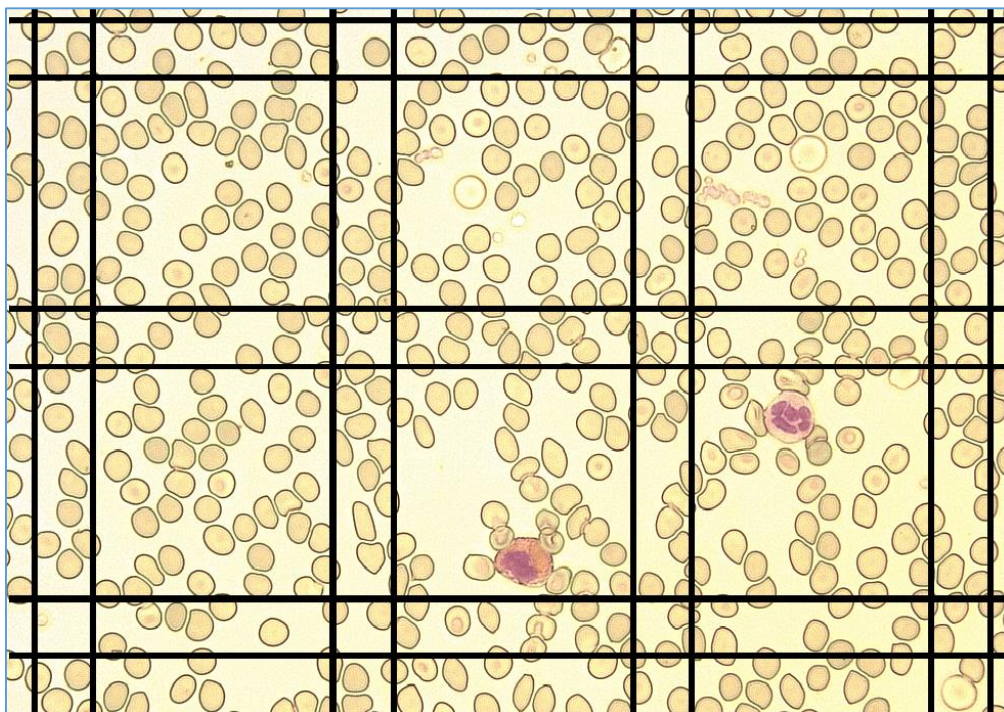
Bürkerova mriežka

Častice, v našom prípade krvinky, sa počítajú pod mikroskopom na zvolenej ploche – v niektorom štvorci alebo v obdĺžniku. Záleží na ich veľkosti a početnosti. Biele krvinky sa počítajú vo veľkých štvorcoch skladajúcich sa z niekoľkých políčok. Červené malom štvorci alebo v obdĺžniku. Vypočíta sa priemer spravidla z niekoľko desiatok políčok a tento údaj sa prepočíta na počet krviniek v jednom litri krvi.

Úloha 2:

Zistite počet červených krviniek pacienta na 1 liter krvi. Počítajte priemer z 10 obdĺžnikov.

V pracovnom liste máte fotografiu krvi v Bürkerovej komôrke. Vypočítajte priemerný počet krviniek len z 10 obdĺžnikov. Bunky, ktoré rám presahujú, nezapočítavajte (zjednodušené pravidlo).



Objem nad obdĺžnikom Bürkerovej komôrky je $0,001 \text{ mm}^3$.

V jednom litri sa tento objem nachádza 10^{12} – krát. Na obrázku je neriedená krv.

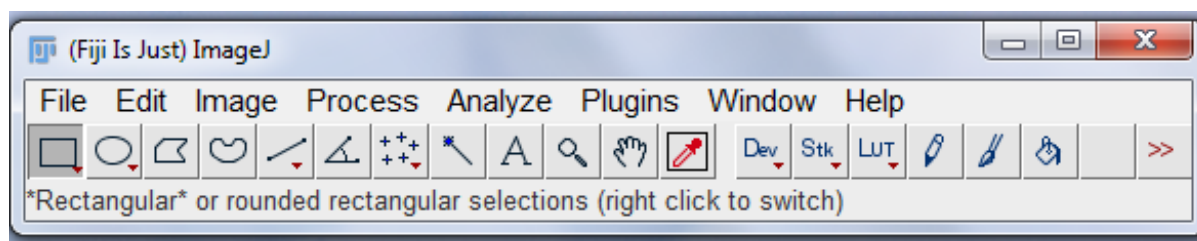
Poznámka

Pre rutinné ručné počítanie v laboratóriách sa krv zvykne riediť, aby sa krvinky neprekrývali a čo najmenej sa ich nachádzalo po stranách mriežky. Riedenie sa pri prepočte na liter musí potom brať do úvahy. Aby bol výpočet presný, nepočítajú sa krvinky presahujúce mriežku vpravo a dole ale počítajú sa tie, ktoré presahujú do susedného políčka vľavo a hore.

Počítanie krviniek na obrázku pomocou programu Fiji

K procesom spracovania a analýzy obrazu patrí okrem iného aj spočítavanie mikroskopických objektov, meranie ich veľkosti a plochy. V programe Fiji (ImageJ) sa dajú tieto úkony robiť veľmi jednoduchým spôsobom. Program treba pred výučbou témy na počítači nainštalovať. Je voľne prístupný na adrese <https://imagej.nih.gov/ij/>. Viac o ňom nájdete v Doplňujúcich informáciách pre učiteľa na konci metodiky.

Lišta programu Fiji s nástrojmi a možnosťami výberu

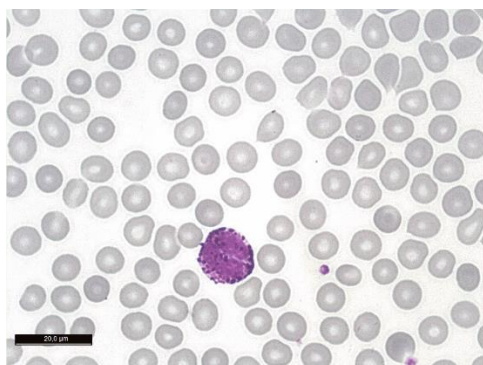


Z fotografie krvi v komôrke bez mriežky (za predpokladu, že vrstva krvi tvorí 0,1 mm) môžeme získať údaj o počte krviniek v litri krvi bez toho, aby sme ich mechanicky počítali. Ak vymedzíme plochu, ktorá zodpovedá 10-násobku obdĺžnika *Bürkerovej komôrky*, vieme spočítať celé bunky v tomto štvorci pomocou pár kľukutí. Ak výsledok vydelíme desiatimi a násobíme $\times 10^{12}$ dostaneme počet červených krviniek v jednom litri krvi pacienta.

Úloha 3:

Je tento pacient zdravý? Zistite počet jeho červených krviniek na 1 l krvi pomocou programu Fiji.

Postup pri zisťovaní počtu červených krviniek vo výreze fotografie pomocou softvéru Fiji

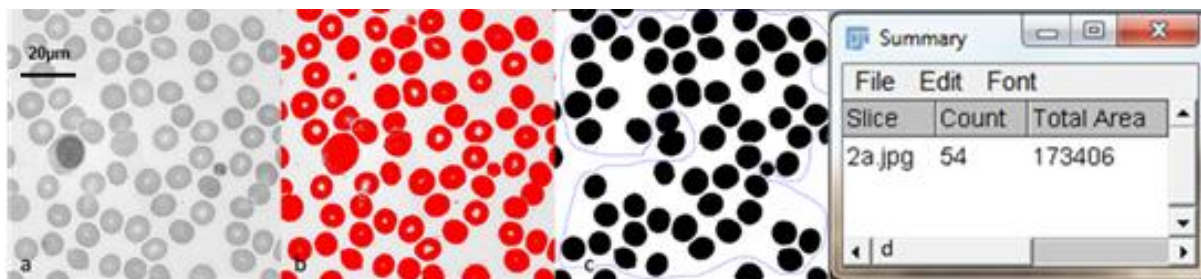


Fotografia krviniek

V programe Fiji si otvorte fotografiu sprístupnenú učiteľom a postupujte podľa nasledujúceho návodu a vzorového obrázku:

1. Na fotografii vymedzte pomocou „rectangular selection“ (prvé tlačidlo – obdĺžnik) jednotkový štvoruholník s veľkosťou 0,01 mm². (Aké pomery strán prichádzajú do úvahy? Zvoľte si možnosť 0,125 x 0,08 čo zodpovedá veľkosti 1000 x 640 pixelov).
2. Skopírujte výber (Edit – Copy).
3. Vytvorte nový obrázok (File – New – Image). Dajte obrázku názov, vyberte formát RGB, bielu farbu (white) a nastavte jeho rozmery v pixeloch, aby sa rovnali stranám vášho jednotkového obdĺžnika (1000 x 640).
4. Vložte výber do nového obrázka (Edit – Paste). Zatvorte pôvodný obrázok, aby nerušil.
5. Fotografiu upravte prahovaním (Image – Adjust – Color Treshold). Nechajte predvolenú metódu prahovania (default), farbu červenú (red), farebné prostredie HSB a svetlé pozadie (dark background nemá byť zaškrtnutý). Krvinky sú teraz červené.
6. Posuvníkmi upravte saturáciu a jas tak, aby ostali červenou vyznačené iba červené krvinky a biele mali pôvodnú farbu ako na zdrojovej fotografii. Pomôže, ak sa budete snažiť ohraničiť histogramy, pritom sledujte, čo sa deje s obrázkom.
7. Analyzujte častice (Analyze – Analyze particles). Nastavte veľkosť plochy častíc na 50 – nekonečno (infinity) pixelov, cirkularitu 0,50-1,00, ukáž masky (show masks) a zaškrtnite možnosti Display results, Summarize, Include holes, In situ shows. Získate tabuľku s názvom Summary s nameranými hodnotami a obrázok s čierno sfarbenými maskami objektov.
8. Manuálne ohraničte (nástrojom Freehand selections, štvrté tlačidlo) časť obrázku, na ktorej sú iba celé červené krvinky. Vynechajte odseknuté krvinky na okraji alebo ak sa do výberu dostal leukocyt a sa vám ho nepodarilo v kroku 6. odfiltrovať.
9. Zopakujte analýzu častíc (Analyze particles) získate nové údaje v tabuľke Summary, kde sú zahrnuté už len celé červené krvinky z vyznačenej oblasti. Ďalší údaj v tabuľke (Total area) znamená celkovú plochu, ktorú započítané krvinky na fotografii zaberajú. Program Fiji ich odmeral aj jednotlivo. Dokáže robiť veľa iných meraní a výpočtov.
10. Uložte výsledok - obrázok masiek a tabuľku Summary (File – Save).

Na tomto vzorovom obrázku je 54 červených krviniek.



Krvinky (a/ fotografia plochy 0,33x0,33 mm (0,1 mm²) pred úpravou kontrastu; b/ po naprahovaní, c/ obrázok s meranými krvinkami a s vyznačeným priestorom merania, d/ tabuľka programu Fiji s počtom krviniek a veľkosťou celkovej plochy krviniek v pixeloch)

Vzhľadom nato, že náš obrázok má 10-násobne väčšiu plochu, než obdĺžnik *Bürkerovej* komôrky, výsledok delíme desiatimi, aby sme ho vyjadrili vo forme **5,4 x 10¹² /1l**.

Poznámka:

Na ilustračnom obrázku **a** je fotografia krviniek vo štvorci 0,33x0,33 mm. Je na nej zobrazená aj mierka, vďaka ktorej je možné prepočítať pixely na mikrometre. Po naprahovaní sú na obrázku **b** zvýraznené aj iné objekty ako tie, ktoré chceme analyzovať - biele krvinky (granulocyt, monocyt) a krvné doštičky.

Pri analýze častíc s nastavením veľkosti častíc 50-infinity pixelov a cirkularity 0,50-1,00 sa vylúčia iba niektoré nevhodné objekty, väčšia biela krvinka a niektoré zrezané krvinky na okrajoch obr. **c**.

Získaná tabuľka Summary ešte nebola finálnym výsledkom. Pomocou nástroja Freehand selections je na obrázku **c** vyznačená plocha s celými červenými krvinkami. Častice na tejto ploche boli analyzované druhýkrát.

Obrázok 1d zobrazuje tabuľku Summary, ktorá sa vytvorila pri druhej analýze častíc. Je tam uvedený už len počet celých červených krviniek na obrázku. Druhou možnosťou ako vylúčiť nevhodné objekty je nastavenie väčšej cirkularity a veľkosti častíc, ale hľadanie toho najvhodnejšieho nastavenia je o niečo náročnejší postup, preto sme zvolili označenie plochy voľnou rukou.

Porovnajzte navzájom výsledky svojich zistení o počte krviniek pacienta.

Aká je odpoveď na otázku o zdraví pacienta, ktorého počet červených krviniek ste zisťovali?

Aké môžu byť príčiny že sa počet jeho krviniek vymyká norme?

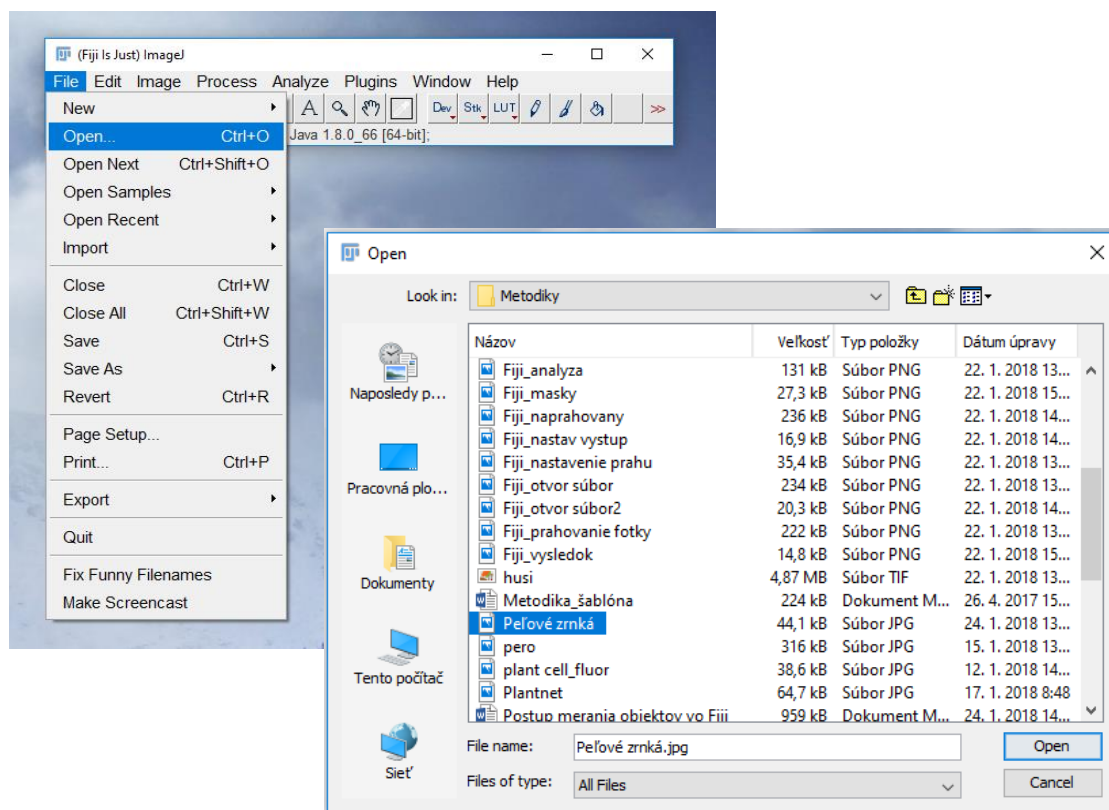
Úloha 4:

Úloha je na precvičenie merania vo Fiji. Zistite priemer peľových zrníkov na fotografii v pixeloch.

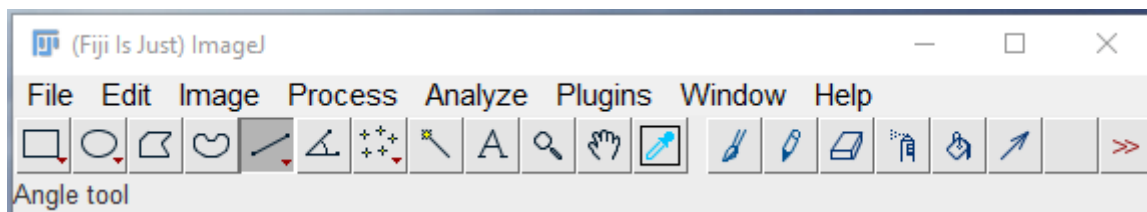
Postup merania objektov pomocou programu Fiji

Najprv musíte mať na disku fotografiu, na ktorej chcete niečo merať.

Otvorte fotografiu v programe Fiji



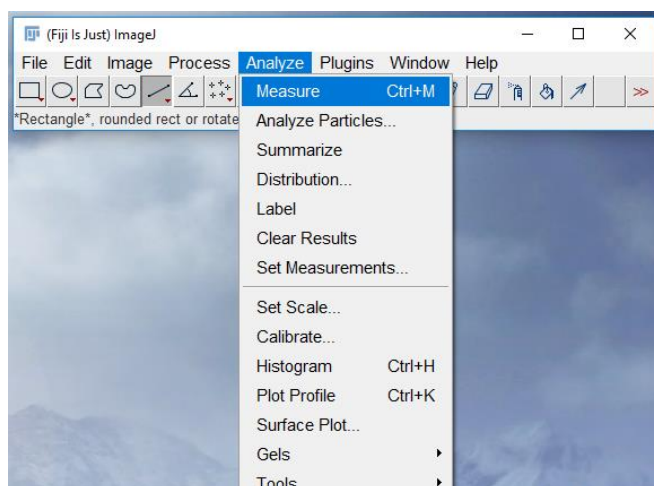
1. Zvoľte v menu Fiji úsečku.



Na obrázku pomocou myši vyznačte, čo chcete odmerať:



2. Zvoľte analýzu a meranie.



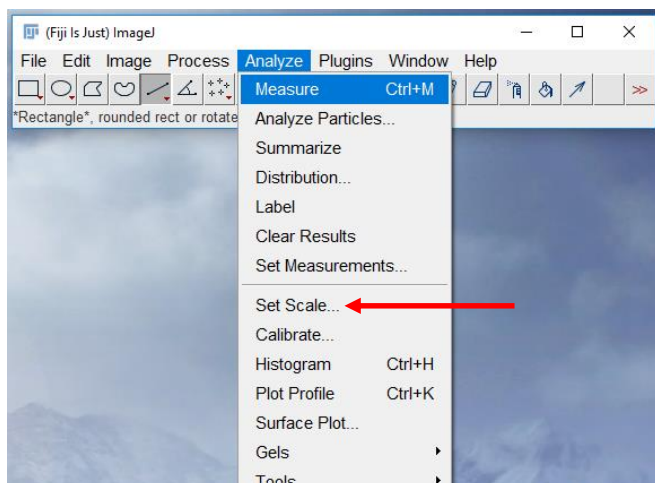
Objaví sa okno s dĺžkou úsečky v pixeloch. Tiež hodnota sklonu alebo plocha úsečky, ktorá v tomto prípade nie je pre nás dôležitá.

V pixeloch meriame relatívnu dĺžku. Preto je na fotke mierka.

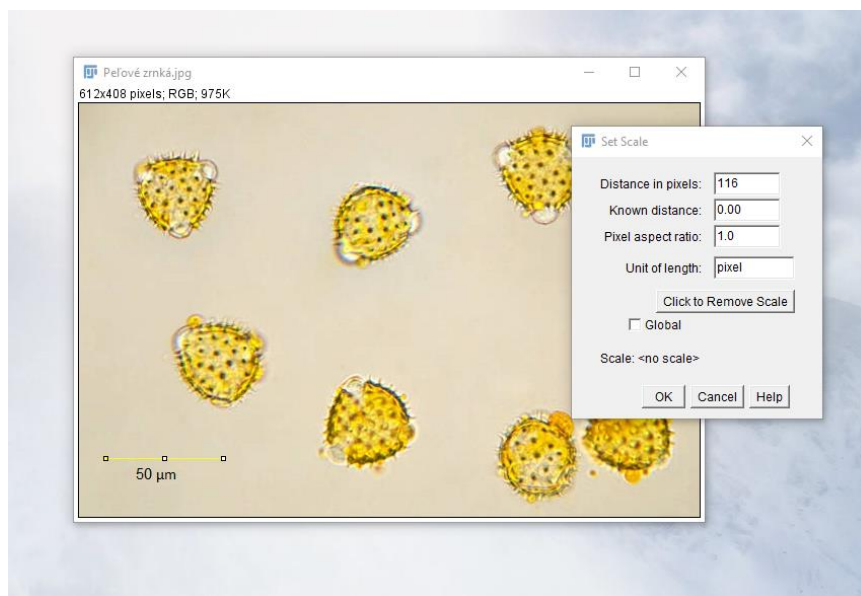
Ako prerátate pixely na mikrometre?

Skúste to pomocou Set Scale a mierky na fotografii.

1. Nastavte úsečku na meranie tak, aby sa kryla s mierkou o dĺžke 50 μm .
2. Zvoľte analýzu merania a vyberte nastavenie škály (Set Scale)



3. V tabuľke, ktorá sa objaví, je v prvom riadku rozmer mierky v pixeloch. V druhom riadku je 0,00 - prepíšte to na 50. V treťom riadku zostane jednotka, vo štvrtom riadku prepíšte pixely na mikrometre (μm).



4. Zakliknite „global“, potom OK. Odteraz bude program merať dĺžky v mikrometroch. Môže sa stať, že úplne presne mierku neodmeriate, napríklad raz bude mať 110, inokedy 115 pixelov. Je to chyba merania, nie každý dokáže nastaviť meráciu úsečku presne na mierku.

Pozor! Ak použijete iný obrázok s odlišnou mierkou, musíte nastavenie škály zopakovať podľa zodpovedajúcej mierky.