

Análisis 3D mediante Object analyzer (Huygens



Scientific Volume Imaging B.V.



- [Pasos generales](#)
- [Segmentación](#)
- [Interacción con los objetos](#)
- [Análisis](#)
 - [Resultados](#)
 - [Filtrar resultados](#)
- [Regiones de interés \(ROIs\)](#)
- [Visualización de la imagen](#)
- [Geometría en *Object Analyzer*](#)
- [*History* = macro](#)
- [Ejemplos](#)
 - [Distancia a objetos de referencia](#)
 - [Localización dentro del núcleo](#)
- [Link a la página de Huygens](#)



Pincha en los links para ir directamente a la sección de interés.



Retrocede al índice.



1- Abrir **Huygens Professional**

o **Huygens Essential**



2- Abrir la imagen a analizar (**File → Open**)

3- La **deconvolución** de la imagen es opcional pero ayuda a definir las estructuras, elimina fondo y corrige aberraciones esféricas.

3- Abrir el analizador (**Analysis → Object Analyzer Advanced**)

4- Un buen análisis requiere una buena **segmentación** de la imagen (separar los *voxels* de interés del *background* como objetos independientes).

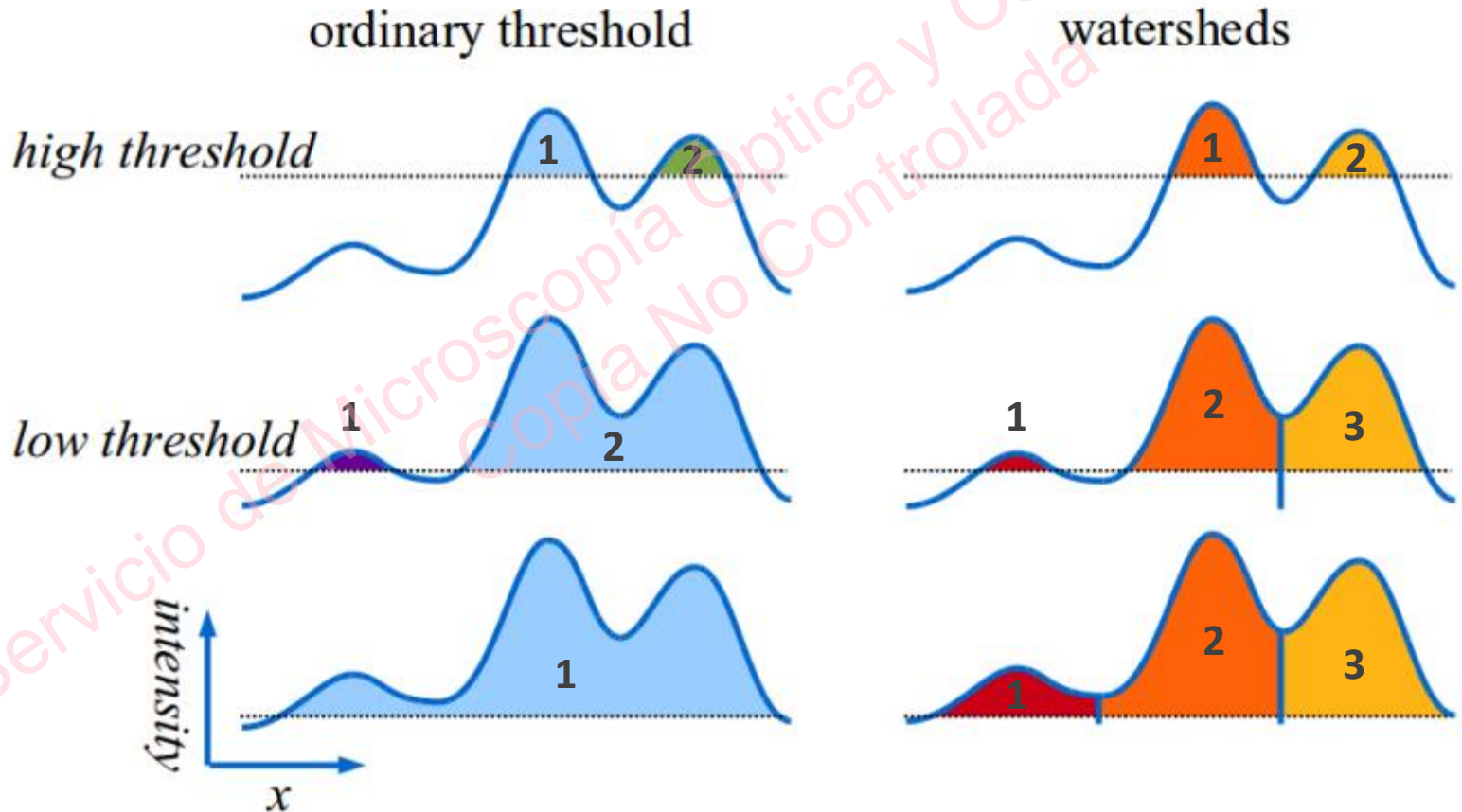
5- Excluiremos objetos demasiado pequeños mediante **garbage** (objetos inferiores a un determinado número de voxels serán eliminados de la imagen).

6- La visualización 3D será **Iso-Surface** (imagen con efecto “plastificado”).

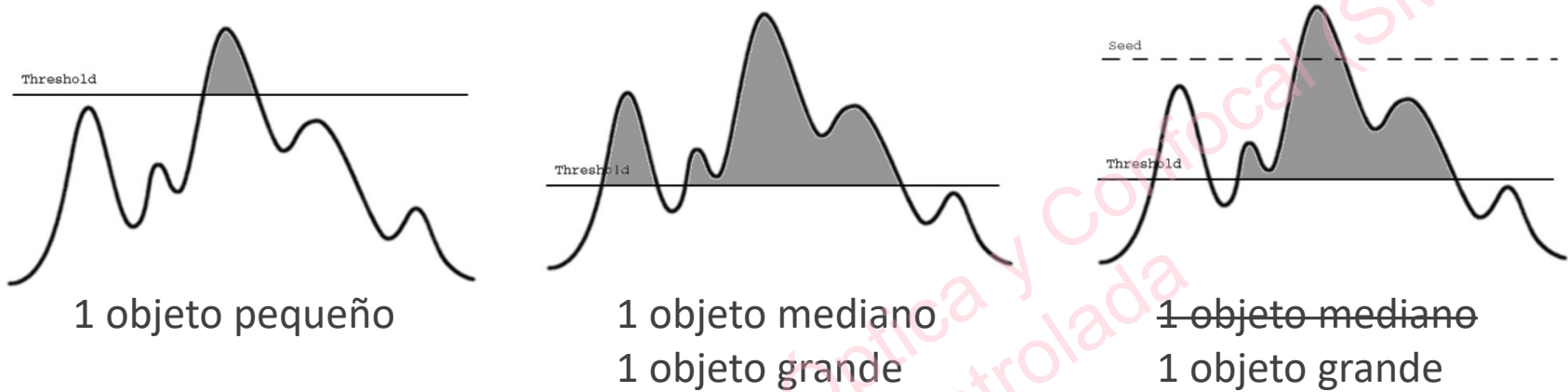
7- Realizaremos el análisis 3D de interés. Sólo se podrá analizar la relación entre canales de 2 en 2.

Threshold: valor de intensidad a partir del cual el voxel será tenido en cuenta en el análisis. Los voxel adyacentes se agrupan formando los distintos objetos.

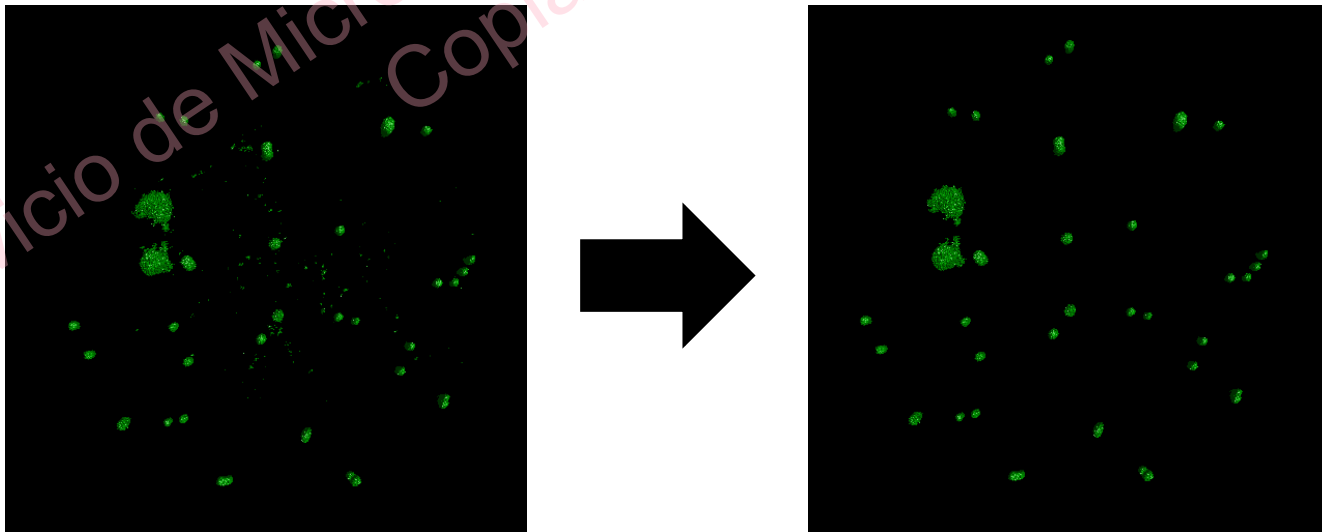
Watershed: separa objetos cercanos buscando valores locales mínimos.



Seed: threshold secundario que permite seleccionar los objetos más intensos dentro de un determinado threshold. Permite seleccionar objetos más grandes.



Garbage: elimina objetos con menor número de voxel que el indicado. Útil para limpiar la imagen y deshacerse de objetos minúsculos que realmente son fondo.



Segmentación

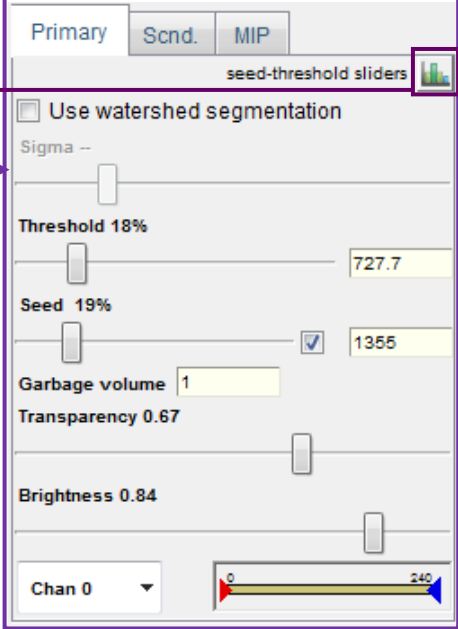
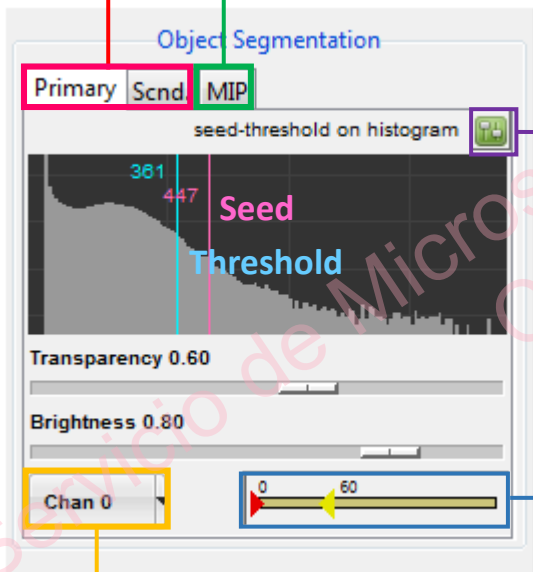


P y S se visualizan como “**Iso Surfaces**”(efecto plastificado);
MIP como Maximum Intensity Projection (puedes aumentar la calidad del MIP en **Options > High quality MIP**).

Se pueden definir 2 canales para segmentar y analizar:
Primary (P) y **Secondary (S)**

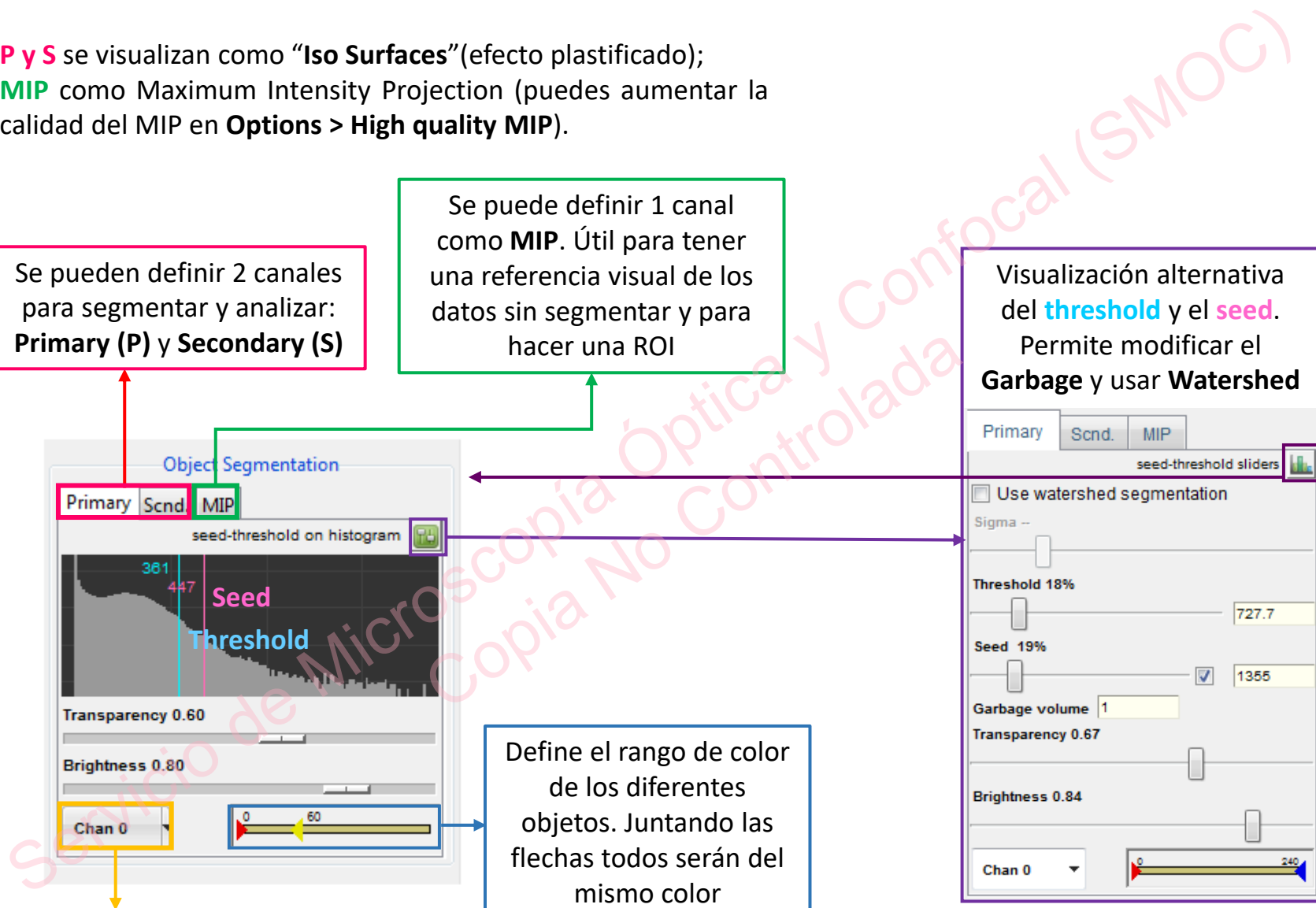
Se puede definir 1 canal como **MIP**. Útil para tener una referencia visual de los datos sin segmentar y para hacer una ROI

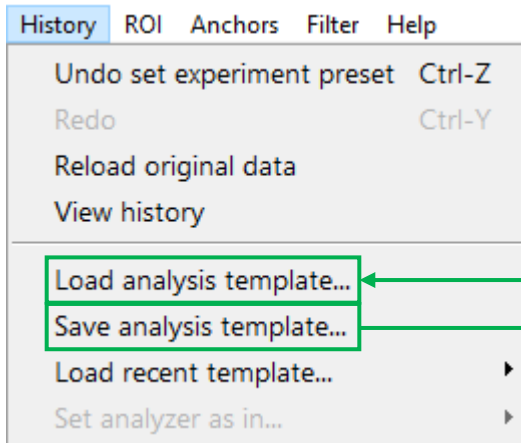
Visualización alternativa del **threshold** y el **seed**.
Permite modificar el **Garbage** y usar **Watershed**



Define el rango de color de los diferentes objetos. Juntando las flechas todos serán del mismo color

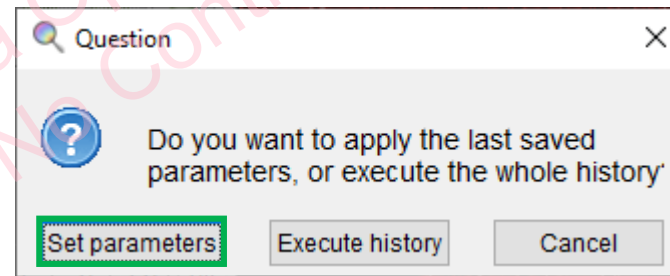
Elegir el canal:
Chan 0 = primer canal
Chan 1 = segundo canal...





y volver a cargar

Una vez definida la segmentación, se puede guardar



Execute history será útil después, cuando ya hayamos hecho algún análisis o alguna modificación de la imagen, si queremos reproducirlo de nuevo (como un macro).

Interacción con los objetos



- Analiza** el objeto que se seleccione.
- Selecciona** los objetos que se encuentran dentro de ese área.
- Elimina** el objeto que se seleccione.
- Define como **“Ancla” (objeto de referencia)** el objeto que se seleccione. El segundo clic elimina la definición.
- Permite **rotar** la imagen en 3D manipulándola con el ratón. También se puede hacer con **Tilt y Twist**.
- Permite **mover** la imagen en 2D.
- Permite **mover** la imagen en 2D pero también mueve el mural de fondo.
- Mueve la ROI** (tiene que haber sido definida previamente).

- Para **crear una ROI** dibuja un área 2D con y selecciona el icono “añadir selección a la ROI” . La selección de voxel será entonces proyectada en 3D, perpendicular a la pantalla, para convertirla en un volumen. Para explorar otras opciones de crear ROIs ir a la diapo [“Regiones de interés”](#).
- Añade** más voxel a la ROI. La selección se hace teniendo activo .
 - Elimina** los voxel de la ROI que están fuera del área seleccionada. La selección se hace teniendo activo .
 - Elimina** los voxel de la ROI que están dentro del área seleccionada. La selección se hace teniendo activo .
 - Mantiene** los objetos que se encuentran dentro de la ROI, elimina los demás.
 - Define como **Ancla** los objetos que se encuentran dentro de la ROI.
 - Borra la ROI**.
 - Elimina** los voxel de la imagen que se encuentran fuera de la ROI.

Interacción con los objetos



Mantiene los objetos que se encuentran dentro del área seleccionada, elimina el resto



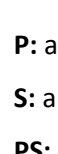
Elimina los objetos que se encuentran dentro del área seleccionada



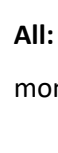
Define como **Ancla** los objetos que se encuentran dentro del área seleccionada



Mantiene los Anclas, elimina los demás objetos de ese canal



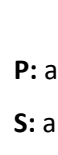
Elimina la definición del objeto como Ancla volviendo ser un objeto normal



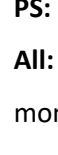
Elimina los objetos Ancla



Sobrescribe la imagen considerada como original.



Carga la imagen original, mantiene la segmentación definida. Por ejemplo, hemos borrado un objeto por error.



Deshace la última acción.

P

S

PS

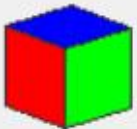
All

P: analiza o aplica una acción sólo en el canal P actual.

S: analiza o aplica una acción sólo en el canal S actual.

PS: analiza o aplica una acción en los canales P y S actuales.

All: analiza los canales P y S actuales, pero aplica una acción a todos los canales (aunque no estén en uso en ese momento), por ejemplo eliminar voxel.

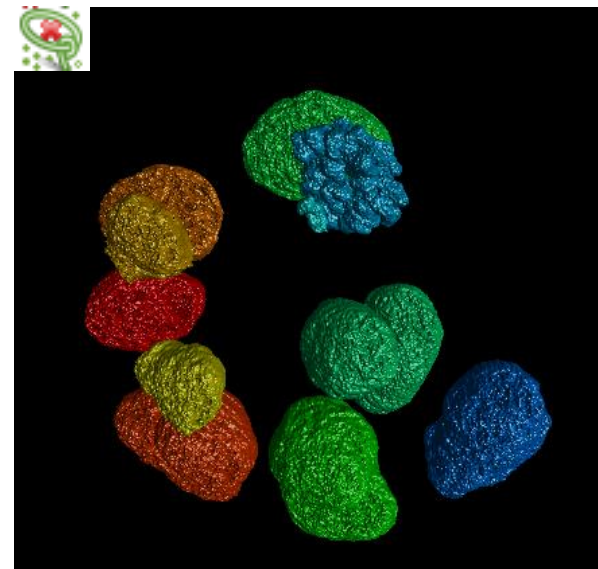
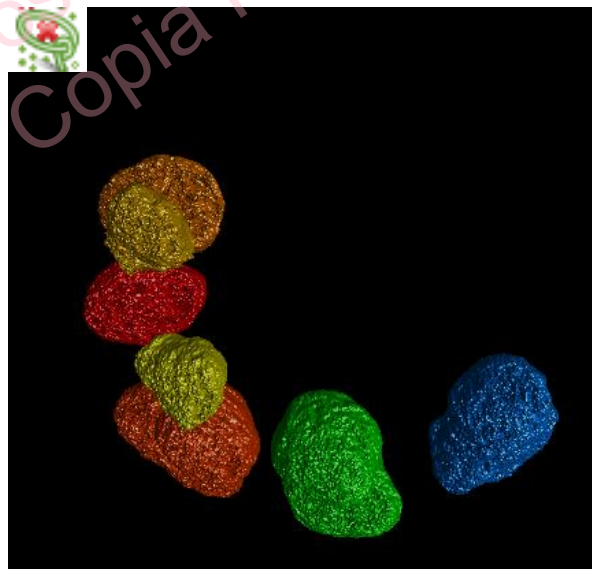
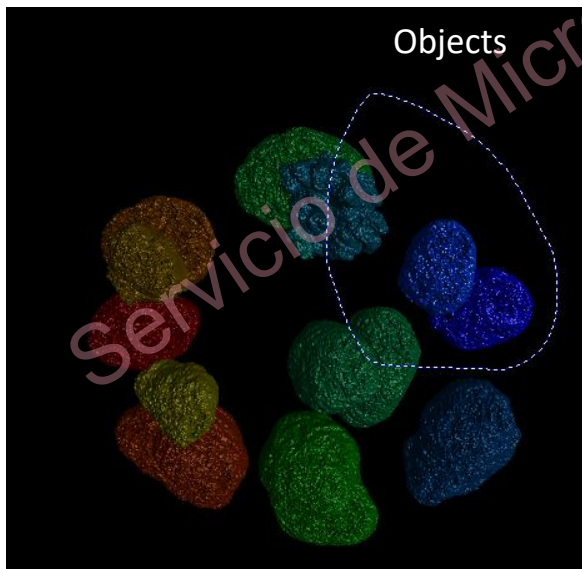
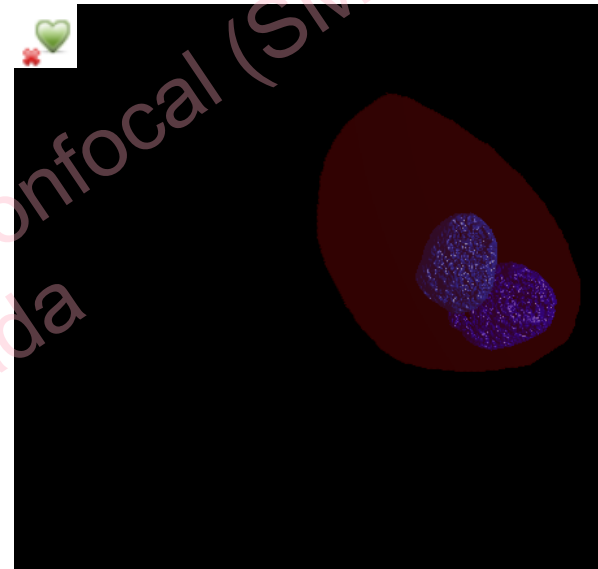
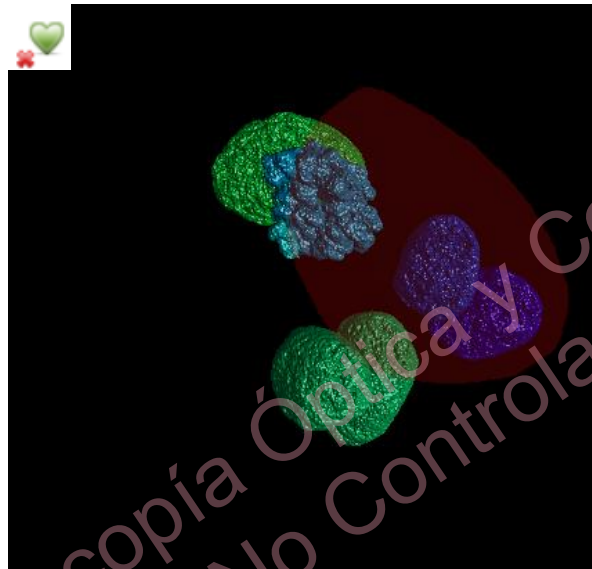
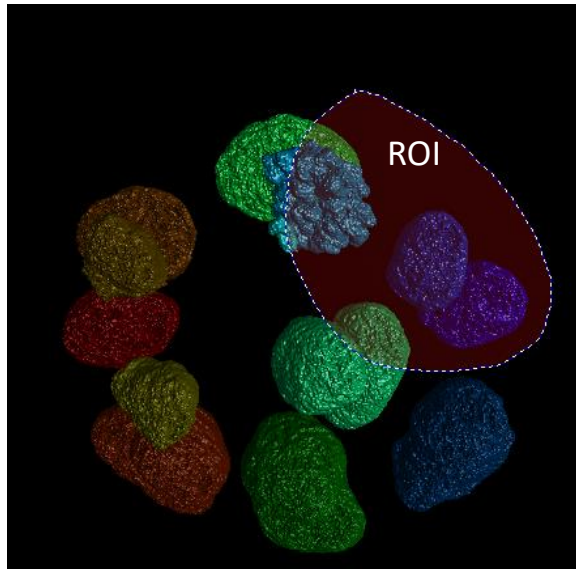




Revisar **Options** → **Relaxed selection**. Si está activo, todos los objetos que estén tocando el límite de la selección también serán tenidos en cuenta. Si no está activo, serán descartados.

Con *Relaxed selection* activo

Con *Relaxed selection* **NO** activo



Análisis



The screenshot shows the software interface with a central 3D view of red cells. On the left, there are toolbars for Mode, Objects, ROI, and Data. On the right, there are panels for Object Segmentation (with a histogram), ROI preferences, and Render mode. At the bottom, there is a status bar with a 'Select statistics' dropdown, an 'Experiment preset' button, and object counts: '0 (ch 0): 462 obj. - 1 (ch 1): 36 obj.'. A red box highlights the 'Experiment preset' button.

Mide sólo el objeto que selecciones



Mide todos los objetos

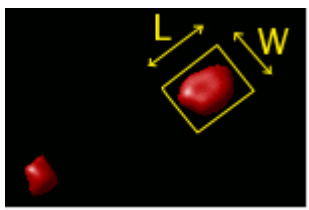


Elige el tipo de análisis que quieres realizar (ver siguiente diapo)

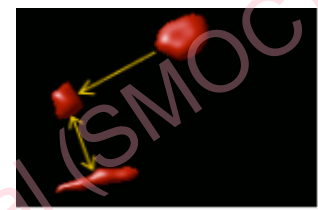
Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC)
Copia No Controlada



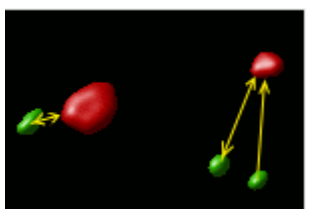
Small particles geometry:
geometría de los objetos
(tamaño, dimensiones,
esfericidad...).



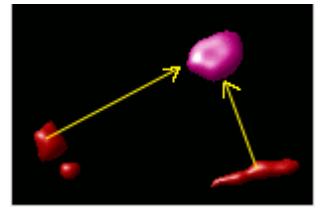
Correlation inside channels: busca el objeto más cercano del mismo canal y calcula la distancia.



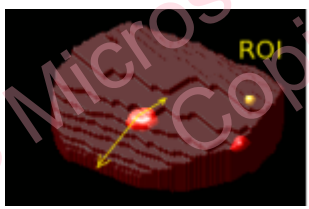
Correlation between channels: busca el objeto más cercano del otro canal y calcula la distancia.



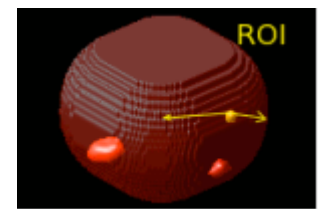
Distance to reference objects: distancia a un objeto de referencia (ancla).



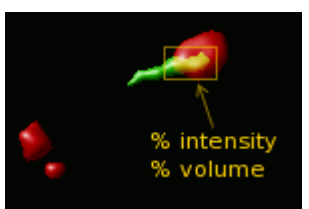
Location inside a flat nucleus: posición del objeto respecto a una ROI plana.



Location inside a round nucleus: posición del objeto respecto a una ROI.



Colocalization (intersection):
colocalización en volumen e intensidad entre dos canales.



Intensity in the other channel: intensidad de un objeto en el otro canal.



Servicio de Microscopía Óptica Confocal (SMOC) Copia No Controlada



Eliges dónde quieres que se visualicen los datos, si sólo en la tabla o también en la imagen

Al seleccionar un parámetro nos da su descripción, así como la nomenclatura que llevará en la tabla de resultados

Tipos de análisis

Select experiment report preset

Basic modes

- Small particles geometry
- Correlation inside channels

Advanced modes

- Correlation between channels
- Distance to reference objects
- Location inside a flat nucleus
- Location inside a round nucleus
- Colocalization (intersection)
- Intensity in the other channel

All parameters are reported on the table. Selected ones are also shown on the scene:

Table only	Sum of all voxel values
Table only	Volume of the voxels (micron ³)
Table only	Volume of iso surface (micron ³)
Table only	Object surface (micron ²)
Table only	Lateral correlation
Table only	Axial width of object
Scene too	Object length (micron)
Table only	Axial sphericity of the principal box
Scene too	Roughness sphericity f(IsoVol, Surface)

Surface: Surface of the isosurface determined by the current threshold value, in squared micrometers.

A parameter set that describes the basic geometry of small particles, that can be used to distinguish spherical beads from other more irregular objects.

Objects can be filtered out based on its sphericity, for example.

OK Help

En **Options** → **Configure reported parameters** se pueden añadir más parámetros al análisis.

Análisis. Resultados



Una vez que hagamos clic en el botón  saldrá la tabla de **resultados**.

Exporta los resultados (txt, csv o Matlab)*

Borra los datos de la tabla

auto clean



Select statistics: **Small particles geometry** 0 (ch 0): 462 obj. - 1 (ch 1): 36 obj. No anchor objects selected

#	Label	Chan	Pipe	Voxels	C.MassX	C.MassY	C.MassZ	Sum	VoxVol	IsoVol	Surface	Length	WILatC	WIAx	RoughSph	AxSphPB
0	# Image: ab, analyzed with HuPro 19.10.0p3 on 2020-04-02															
1	# Conditions: pipe 0 chan 0: thresh 1108.5, seed 1108.5, garb. 1, objects 462. ROI: vol 1.4503e+05 um ³ , CM (511.5, 511.5, 56);															
2	# Conditions: pipe 1 chan 1: thresh 1607, seed 2517.7, garb. 100, objects 36. ROI: vol 1.4503e+05 um ³ , CM (511.5, 511.5, 56);															
3	1	0	0	127391	497.54	319.93	43.055	20873382.22	155.93	158.47	601.52	10.838	6.7995	6.9691	0.23543	0.7478
4	2	0	0	364990	679.72	354.06	39.093	24053734.23	446.75	453.36	989.84	13.75	8.6955	11.413	0.28833	0.81206
5	3	0	0	2	519	275.48	49	2306.16	0.002448	9e-05	0.014525	0.26043	0.12793	0.059371	0.66865	0.5175
6	4	0	0	2	516	280.51	49	2257.94	0.002448	3.1e-05	0.004096	0.26043	0.12793	0.059371	1.1651	0.5175
7	5	0	0	126665	387.3	360.32	37.031	219141934.6	155.04	157.05	678.13	10.597	7.425	6.8584	0.20759	0.73985
8	6	0	0	1	523	286	45	1108.55	0.001224	0.00	0.00	0.26043	0.068556	0.025093	-	0.41074

Nº del objeto

Canal

P = 0
S = 1

Valores del análisis

En caso de seleccionar dos objetos que estén en el mismo punto de mira, pero no están colocalizando, se les asigna una letra F (*front* = delante) o una B (*back* = detrás) para saber su posición relativa.

Clic derecho en cualquiera de las filas o columnas y saldrá un desplegable con diferentes opciones para aplicar a los datos:

- Stats
- Histogram
- Filter
- Analyze all
- Save
- Clear
- Sort inc
- Sort dec

***Ojo!! Al exportar los datos la forma más segura es csv!!**
Comprobar que los valores son los mismos. Por ejemplo, 497.54 lo exporta en csv como 4.975400E+02 pero si lo exportamos como txt y lo abrimos posteriormente en Excel aparece como 4.98E+08

Análisis. Filtrar resultados



Podemos filtrar los resultados . Elegir a quién aplicarlo:

Apply to:

P	S	PS	All
---	---	----	-----

Al aplicar el filtro los objetos descartados se borran tanto de la tabla como de la imagen

Servicio de Óptica y Controlada (SMOC)

Selecciona el parámetro en el que aplicar el filtro
Descarta los objetos...
Valor fijo o en comparación con otro parámetro

Si queremos volver a ver la imagen sin filtrar podemos volver a los datos originales .

También en **History** → **Reload original data**

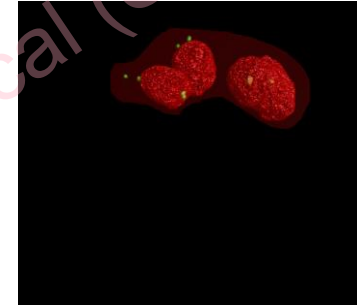
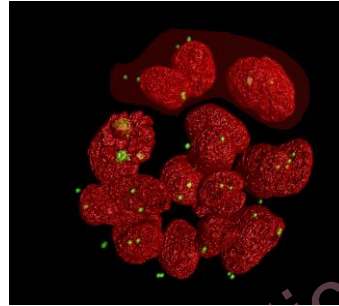
Si **auto clean** está activo la tabla se quedará vacía al filtrarla y tendremos que volver a hacer clic en el botón de analizar!!

Regiones de interés (ROI)

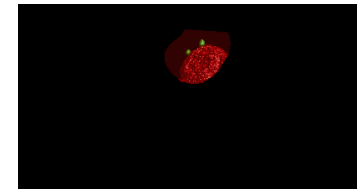
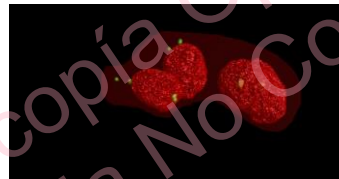


En el Object Analyzer hacer una ROI no quiere decir que sean sólo esos objetos los que se van a analizar (como puede ocurrir con otros programas como el ImageJ). Aquí las ROIs se usan para:

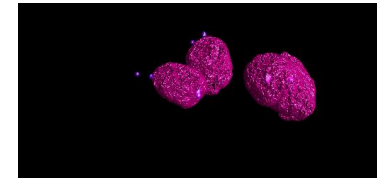
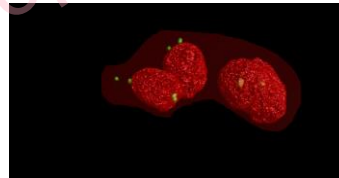
- Descartar objetos enteros



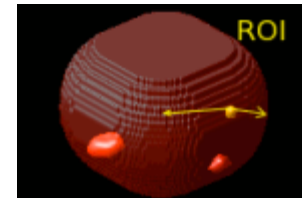
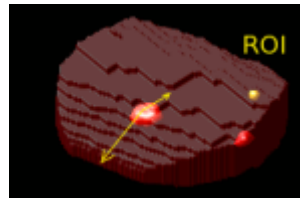
- Eliminar datos de la imagen (aunque formen parte de un objeto)



- Seleccionar objetos como anclas



- Referencia en la localización de objetos





Las ROIs se pueden definir de diferentes formas:

➤ **Mediante una selección:**  → 

➤ **Con anclas ya definidas:** 

ROI → Set → Enclose anchors in a box (ROI en forma de caja, con las dimensiones del ancla).

ROI → Set → Make coincide to anchors (ROI con la forma del ancla, excluidos huecos internos).

ROI → Set → Envelop anchors (ROI con la forma de la superficie del ancla, incluyendo huecos).

➤ **Con todos los objetos:**

ROI → Set → Make coincide to objects

➤ **Usando la colocación entre objetos:**

ROI → Set → Make coincide to intersection (ROI con los voxel que colocizan entre los objetos).

➤ **Con MIP**

ROI → Set → Set using MIP threshold

ROI → Modify → Fill inner cavities (si se quieren rellenar los huecos internos)

ROI → Modify → Fill inner and cutoff cavities (si se quieren rellenar huecos internos y externos para que la periferia de la ROI sea plana).

ROI



Una vez definida, se puede:

Guardar: ROI → Storage → Save current ROI to file.



Volver a cargar: ROI → Storage → Load ROI from file.

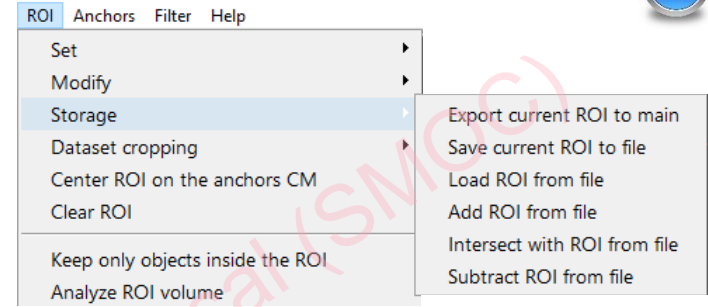
Hacer operaciones con la ROI que está definida en ese momento:

Sumarla: ROI → Storage → Add ROI from file.

Restarla: ROI → Storage → Subtract ROI from file.

Calcular la intersección: ROI → Storage → Intersect with ROI from file.


Una vez aplicado algún procesamiento, por ejemplo , es útil sobrescribir la imagen de referencia  si queremos seguir trabajando con ella. De esta forma podemos probar distintos análisis y volver a este punto en cualquier momento.







Service de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC)
Copia No Controlada

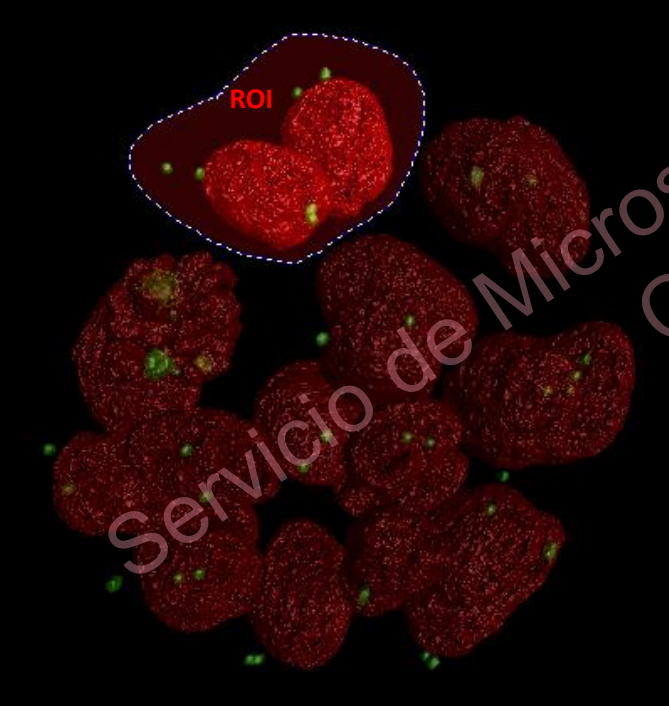



Si hemos hecho una ROI, su análisis aparecerá al final de la tabla: ROI_P y ROI_S.

Ojo!! Si la hemos hecho mediante una selección con  el análisis es de todo su volumen (no de los objetos incluidos en ella).

Select statistics: **Small particles geometry** 0 (ch 0): 462 obj. - 1 (ch 1): 36 obj. No anchor objects selected auto clean    

#	Label	Chan	Pipe	Voxels	C.MassX	C.MassY	C.MassZ	Sum	VoxVol	IsoVol	Surface	Length	WiLatC	WiAx	RoughSph	AxSphPB
498	34	1	1	572	743.54	759.17	24.087	2270160.49	0.70013	0.69056	4.0354	1.6088	0.90915	0.97825	0.93625	0.70499
499	35	1	1	341	493.86	842.2	37.255	1170180.97	0.41739	0.41216	2.9459	1.3186	0.69446	0.87624	0.90917	0.69666
500	36	1	1	607	522.69	853.8	43.667	2120311.22	0.74297	0.70456	4.3735	1.9065	0.83566	0.94905	0.87552	0.60878
501	ROI_P	0	0	4406049	501.49	756.89	54.411	154467905.37	5393.03	--	--	--	--	--	--	--
502	ROI_S	1	1	4406049	506.82	754.94	49.006	19930767.16	5393.03	--	--	--	--	--	--	--



Para analizar únicamente los objetos que contiene la ROI habría que eliminar el resto de objetos .

ROI_P y ROI_S sólo se van reflejar un tamaño de interés si la ROI es definida con anclas, objetos, colocación entre objetos...

Visualización de la imagen



Podemos guardarla en File → Save Scene

En **Options** podremos elegir varias características relativas al aspecto de la imagen:

Options History ROI Anchors Filter

Virtual render size*	✓ Canvas
Transparency depth**	320x240
✓ Bounding box	480x360
✓ Scale bar	640x480
✓ Show ID labels	1024x768
✓ Show SVI logo	1600x1200
High quality MIP	3200x2400
	4800x3600
✓ Show reference cube	1280x720
✓ Show on-screen tooltips	1920x1080
✓ Relaxed selection	
Center scene	
Configure reported parameters	

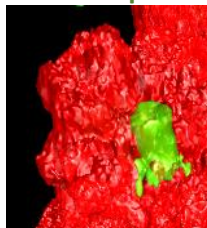
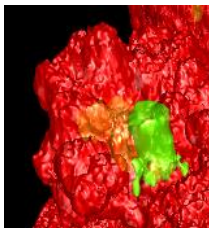
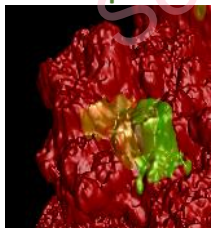
***Tamaño de la imagen:** Canvas va ajustando el tamaño automáticamente.

****Transparencia:**

Simple

Normal

Deep



Mode

Objects

ROI

Data

Apply to:

P S PS All

Reference cube

Mouse mode:
Rotate scene interactively

Screen tooltips

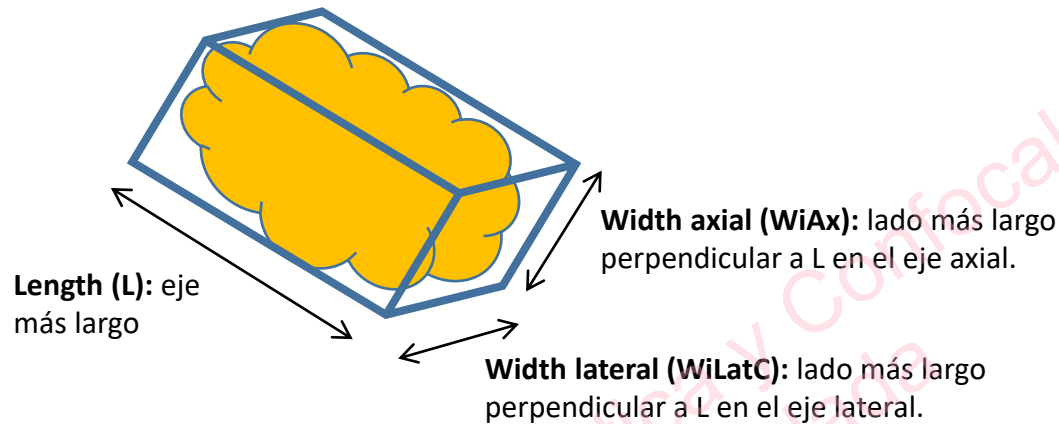
Bounding box

ID label

Scale bar

20.00 μm

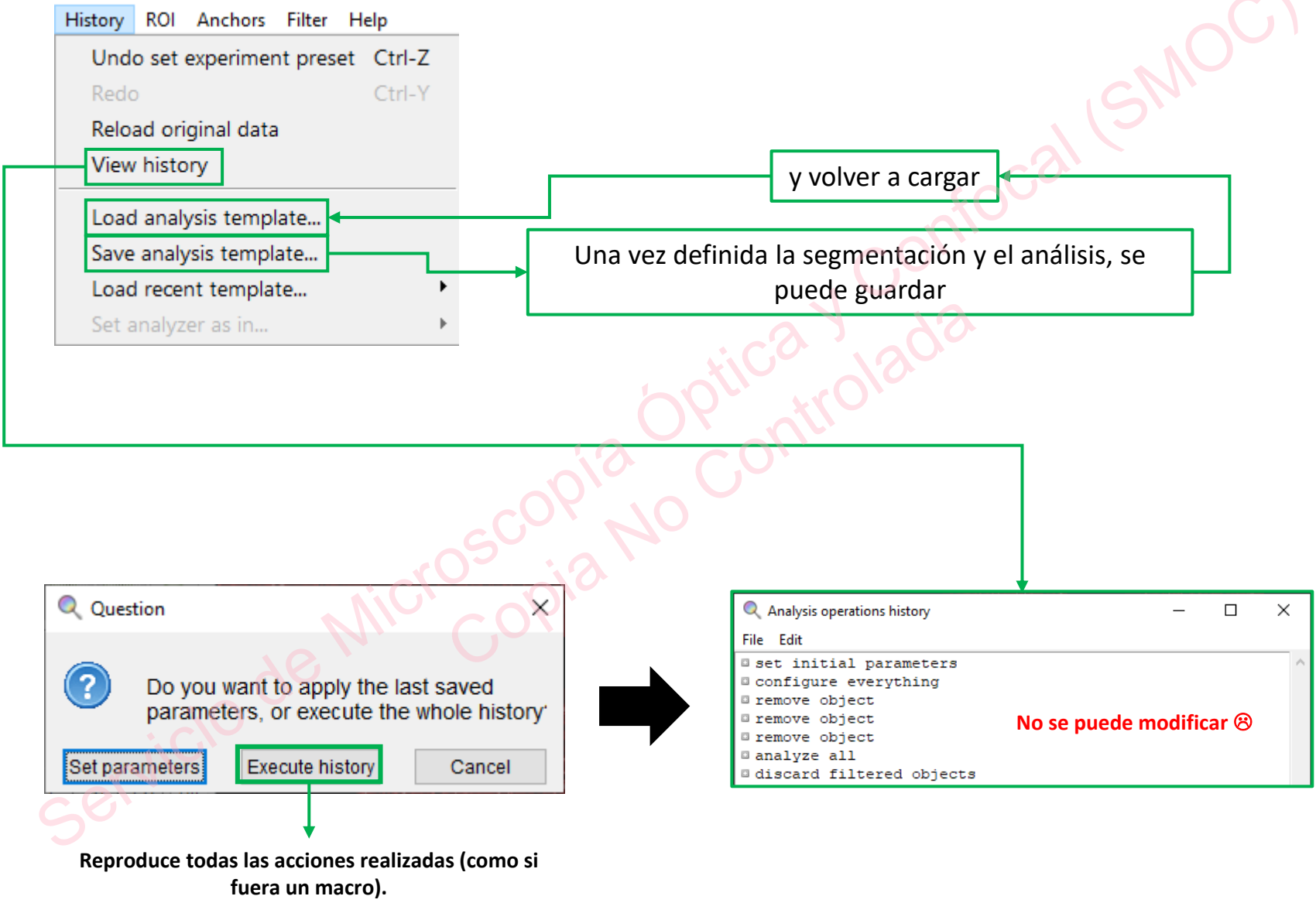
Logo



La toma de imagen produce una “elongación falsa” de los objetos debida a la aberración esférica, incluso en imágenes deconvolucionadas. Usando los valores **Length** , **WiAx** y **WiLatC** estaremos minimizando esa sobre-estimación de las dimensiones de los objetos (en **Options** → **Configure reported parameters** podemos configurar la lista de parámetros si queremos obtener también los “no corregidos”).

Lo mismo ocurre en el cálculo de la esfericidad. Si usamos el cálculo **AxSph**, en vez de **AxSphPB**, estaremos minimizando la aberración esférica.

History = macro



Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC)
Copia No Controlada



Ejemplos

Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC)
Copia No Controlada

Distancia a objetos de referencia

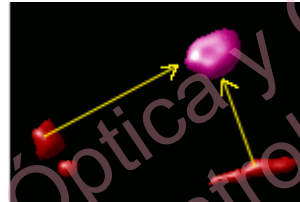


1- Define el **Ancla** que actuará como objeto de referencia



2- Elige el **tipo** de análisis:

Distance to reference objects: distancia a un objeto de referencia (ancla).



3- Analiza

#	Label	Chan	Pipe	Voxels	C.MassX	C.MassY	C.MassZ	Sum	a.CMCM	a.CMCMx	a.CMCMy	a.CMCMz	a.CMsurf	a.CMSx	a.CMSy	a.CMSz
0	# Image: ab, analyzed with HuPro 19.10.0p3 on 2020-04-06															
1	# Conditions: pipe 0 chan 0: thresh 1108.5, seed 1108.5, garb. 100, objects 11. ROI: vol 161.6 um³, CM (696.12, 771.34, 50.668);															
2	# Conditions: pipe 1 chan 1: thresh 1607, seed 2517.7, garb. 100, objects 36. ROI: vol 161.6 um³, CM (696.12, 771.34, 50.668);															
3	1	0	0	127391	497.54	319.93	43.055	20873382.22	12.74	182.04	34.357	-3.8954	7.349	105.46	0.06665	-5.0551
4	2	0	0	364990	679.72	354.06	39.093	24053734.23	0.025539	-0.14318	0.23168	0.06691	0.74363	-6.716	-3.0585	-2.0927
5	3	0	0	126665	387.3	360.32	37.031	219141934.6	20.049	292.28	-6.0336	2.129	15.034	215.7	-39.324	0.96936
6	5	0	0	113373	581.95	374.01	64.068	29229835.83	9.4181	97.624	-19.722	-24.908	4.123	48.051	-11.013	-9.0681
7	8	0	0	453524	730.45	527.26	48.709	70360312.85	12.608	-50.873	-172.97	-9.5496	6.4154	-22.446	-90.262	-2.7093
8	10	0	0	450063	586.65	599.33	50.337	24959525.59	18.201	92.918	-245.04	-11.177	9.7841	8.3453	-107.33	24.663

Distancia entre los centros de masas (CM)

Distancia del CM del objeto a la superficie del objeto de referencia

Localización dentro del núcleo

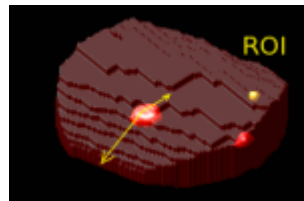


1- Define la **ROI** que actuará como núcleo ([ver diapositivas de definición de ROIs](#)).

2- Elige el **tipo** de análisis:

NÚCLEO PLANO

Location inside a flat nucleus: posición del objeto respecto a una ROI plana.

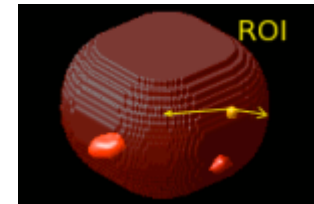


Calcula la distancia entre el centro de masas del objeto y la ROI.

Calcula la distancia más corta a la superficie de la ROI en el eje XY.

NÚCLEO 3D

Location inside a round nucleus: posición del objeto respecto a una ROI.



Calcula la distancia entre el centro de masas del objeto y la ROI.

Calcula la distancia más corta a la superficie de la ROI en cualquier dirección.

3- Analiza

r.CMCM	r.CMCMx	r.CMCMy	r.CMCMz	r.CMperXY	r.CMperX	r.CMperY
26.962	6.2426	-391.68	-9.2148	21.736	-9.9357	-316.9
34.774	308.57	-390.33	-25.953	28.635	265.39	-322.54
27.937	-4.638	-403.08	15.732	22.552	-20.816	-328.3
28.394	-64.365	-404.95	15.368	23.032	-56.544	-331.17
35.79	185.32	-487.98	2.200	30.328	147.14	-417.2

r.CMCM	r.CMCMx	r.CMCMy	r.CMCMz	r.CMsurf	r.CMSx	r.CMSy	r.CMSz
26.962	6.2426	-391.68	-9.2148	19.419	-75.936	-253.9	26.33
34.774	308.57	-390.33	-25.953	23.279	223.39	-252.54	10.592
27.937	-4.638	-403.08	15.732	22.394	5.1837	-318.3	19.277
28.394	-64.365	-404.95	15.368	22.692	-43.544	-320.17	18.913
35.79	185.32	-487.98	2.200	26.853	101.14	-350.2	37.745
35.907	156.48	-499.58	-4.2113	26.578	72.305	-361.8	31.333



Si os registráis en la página de Huygens tendréis mucho contenido didáctico

<https://svi.nl/HomePage>

Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC)
Copia No Controlada