

# COLOCALIZZAZIONE

---

In ImageJ è possibile calcolare la proporzione di cellule di due o più tipi diversi che si sovrappongono.

Ci sono 2 possibili metodi per effettuare questo calcolo:

**METODO MANUALE** (Utilizzando gli strumenti base del software):

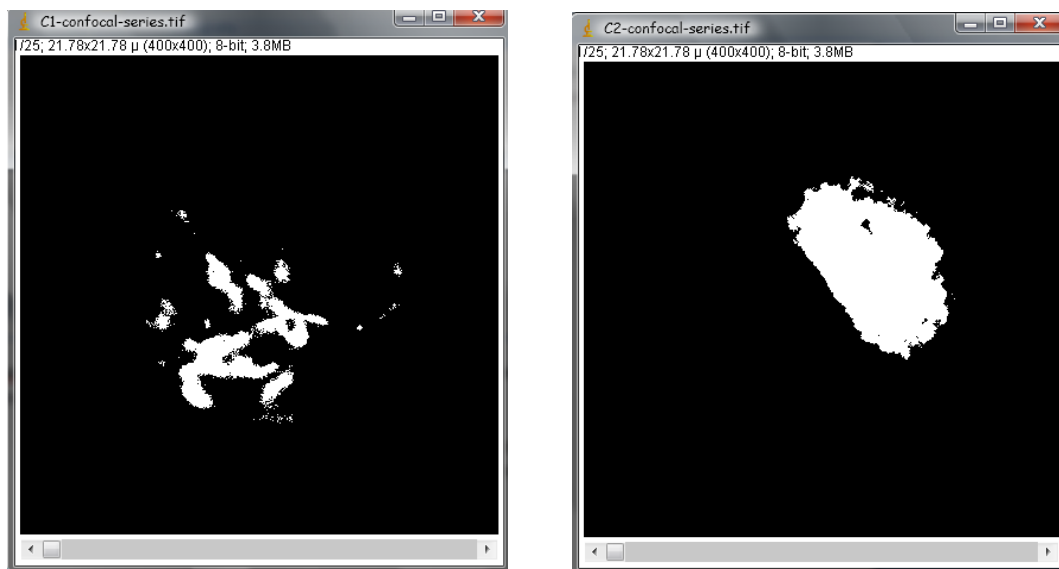
Consiste nel fare un'operazione logica fra le immagini, precisamente un AND fra le 2 immagini binarizzate -

> l'AND è un operatore logico che a partire da due immagini restituisce solo i pixel che compaiono nella stessa posizione in entrambe le immagini (vedendolo con i numeri binari:  $A \text{ AND } B$  dà 1 solo se sia A che B valgono entrambi 1; in tutti gli altri casi restituisce 0).

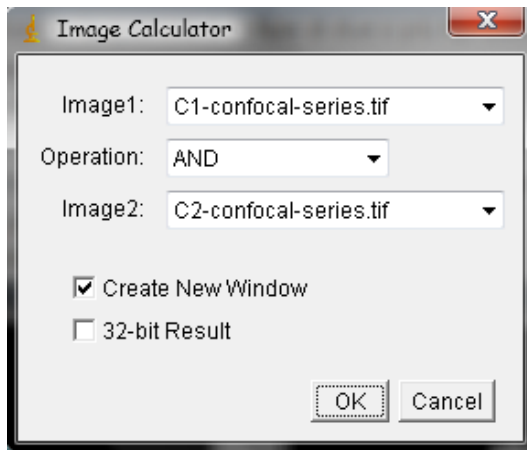
Il primo passo da fare è separare i canali in modo da ottenere i 2 tipi di cellule separati (Image -> Color -> Split Channels)-> vedi file SEPARAZIONE e UNIONE DEI CANALI.

Il secondo passo consiste nel rendere le immagini binarie, o sogliandole tramite il comando Threshold oppure binarizzandole proprio tramite il comando Make Binary (vedi file CONTA DI CELLULE nella parte iniziale).

Alla fine di queste 2 operazioni avremo 2 immagini del tipo:



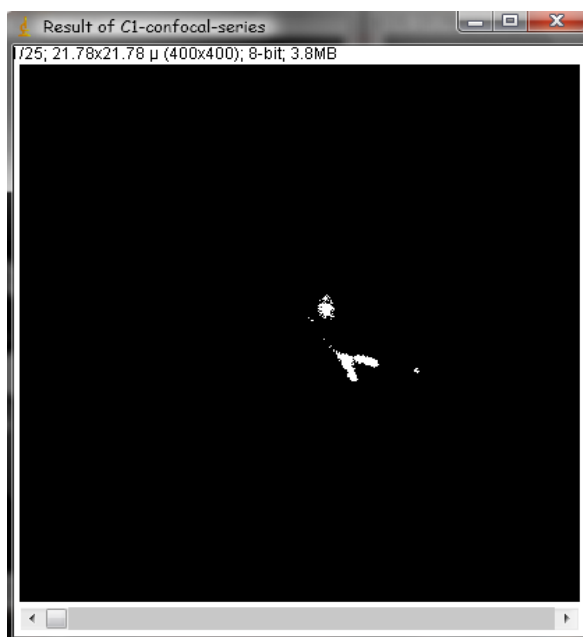
A questo punto cliccare sul comando Image Calculator (Process -> Image Calculator) :



Ora basta inserire le due immagini su cui vogliamo operare e selezionare l'operazione di AND.

Lasciare selezionato Create New Window se si vuole che l'immagine risultante sia mostrata in una nuova finestra.

Dovrebbe risultare un' immagine di questo tipo, che rappresenta la zona dove i due tipi di cellule risultano sovrapposte:



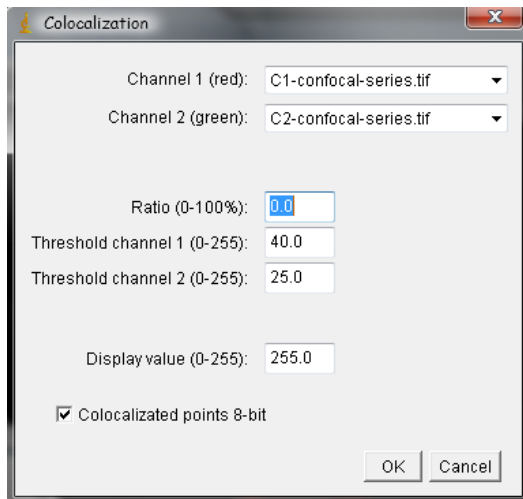
Da questa immagine è poi possibile calcolare l'area ricavata, che rappresenta l'area in comune fra le 2 cellule -> questo è possibile con l'utilizzo del comando ANALYZE PARTICLES (vedi protocollo CONTA DI CELLULE).

#### METODO AUTOMATICO:

Utilizzando il plugin -> "Colocalization" (Plugin -> Analyze -> Colocalization)

Il primo passo da fare è comunque quello di separare le immagini nei due canali.

Dopodichè basta selezionare il comando Colocalization:

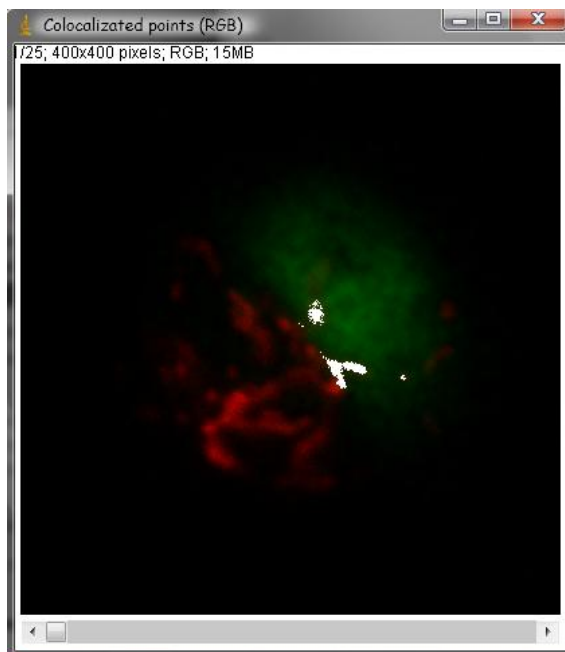


In questa finestra bisogna settare i parametri desiderati:

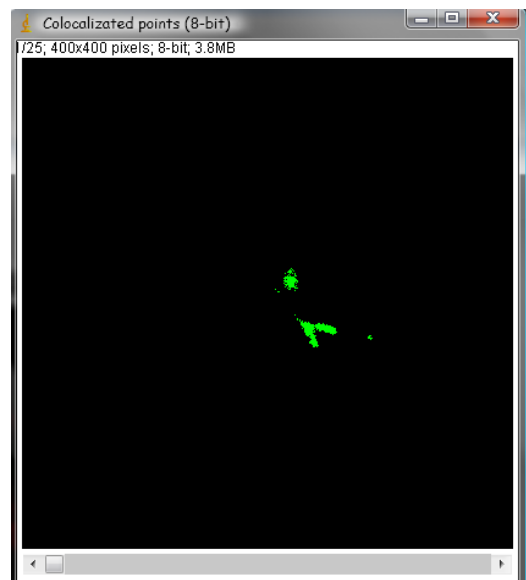
- Channel 1 e 2 sono i 2 canali che si riferiscono alle immagini da utilizzare.
- Ratio (rappresenta la larghezza dei pixel in relazione alla loro altezza): è sempre meglio lasciarla a 0.
- Threshold 1 e 2 sono le soglie che vengono apportate alle 2 immagini: meglio impostarle seguendo i valori della soglia che avevamo anche nel calcolo manuale.
- Display value (rappresenta il valore di grigio con cui si vogliono rappresentare i pixel colocalizzati): lasciare impostato 255, cosicchè i pixel vengano rappresentati bianchi.

Se si lascia selezionata l'opzione "Colocalized points 8-bit" viene visualizzata un'immagine contenente solo i punti di colocalizzazione.

Dovremmo ottenere un risultato di questo tipo:



Se lascio la spunta sulla casella "Colocalized points 8-bit":



E' importante notare come il risultato dell'applicazione dei due metodi sia lo stesso.