

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 746**

21 Número de solicitud: 201330974

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**28.06.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**31.03.2015**

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
(100.0%)**

**Jordi Girona, 31  
08034 Barcelona ES**

72 Inventor/es:

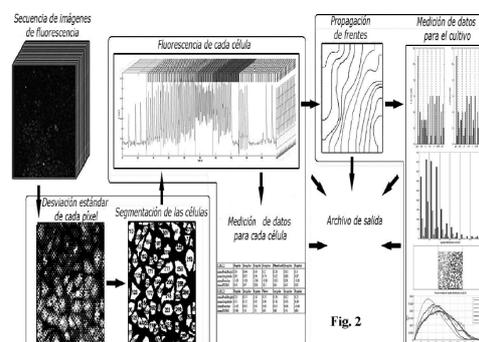
**HOVE MADSEN, Leif;  
VALLMITJANA LEES, Alexander y  
BENÍTEZ IGLESIAS, Raúl**

54 Título: **Método implementado por ordenador para caracterización dinámica de células en cultivos celulares y programas informáticos para llevar a cabo el método**

57 Resumen:

Método implementado por ordenador para caracterización dinámica de células en cultivos celulares y programas informáticos para llevar a cabo el método.

El método comprende adquirir una secuencia de imágenes de fluorescencia de un cultivo celular; segmentar dicha secuencia de imágenes de fluorescencia e identificar la ubicación, forma y tamaño de cada célula que forma parte del cultivo; medir el nivel de fluorescencia de cada célula identificada para determinar una concentración de un ion de Calcio en cada célula identificada; estimular mediante un aporte externo de energía eléctrica dicho cultivo a una determinada frecuencia de estimulación; determinar la respuesta de cada célula identificada a dicha frecuencia de estimulación; y determinar una respuesta global de dicho cultivo estimulado mediante dicho aporte externo de energía eléctrica y analizar la propagación eléctrica de dicho estímulo en forma de una elevación local de la concentración del ion de Calcio a dicha frecuencia de estimulación.



## DESCRIPCIÓN

**Método implementado por ordenador para caracterización dinámica de células en cultivos celulares y programas informáticos para llevar a cabo el método**5 Sector de la técnica

- La presente invención concierne en un primer aspecto, en general, a un método implementado por ordenador para caracterización dinámica de células, tal como células cardíacas del tipo cardiomiocitos o células del sistema nervioso del tipo neuronas, en cultivos celulares, basado en imágenes de microscopia de fluorescencia, y en particular a un método que comprende identificar la respuesta dinámica de dichas células a un estímulo externo de energía eléctrica, y analizar la propagación de dicho estímulo externo de energía eléctrica en forma de una elevación local de la concentración de un ion de Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en dichas células.
- 10
- 15 Un segundo aspecto de la invención concierne a programas informáticos adaptados para realizar algunas de las etapas del método del primer aspecto.

Estado de la técnica anterior

- Los cardiomiocitos son células cardíacas que tienen la particularidad de contraerse. La contracción se regula por la concentración del ion de Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) tanto en el medio intracelular como en el extracelular, y para medir esta concentración normalmente se utiliza una técnica de microscopia de fluorescencia convencional o confocal. Generalmente, en un experimento típico se dispone de un cultivo de células cardíacas y se estimula eléctricamente un extremo del cultivo para ver cómo se propaga el impulso eléctrico a lo largo del cultivo en forma de una elevación local de la concentración del ion de Calcio que se graba como una cantidad mayor de luz perteneciente a las regiones donde la concentración del ion de Calcio es más elevada.
- 20
- 25
- 30 Son conocidas diversas propuestas relativas para la clasificación de la respuesta celular a dichos estímulos eléctricos, y de esta forma se permite realizar una caracterización de su dinámica, es decir, se modifica el ritmo de estimulación para poder observar cómo reacciona el cultivo. La mayoría de dichas propuestas se hallan descritas en artículos especializados, algunos de los cuales serán citados a

continuación, y descritos brevemente, por considerarse como representativos del estado de la técnica más cercano a la presente invención.

Por ejemplo, el documento '*Stochastic Approximation Techniques Applied to Parameter Estimation in a Biological Model*' C. Renotte, A. Vande Wouwer, da a  
5 conocer un proceso para modelar dinámicamente un conjunto de células animales a partir de un conjunto de datos experimentales. Para ello, utiliza unas variantes de unos algoritmos SP de primer y segundo orden y se aplican a la estimación estadística con máxima verosimilitud de parámetros cinéticos y a las condiciones  
10 iniciales un modelo de procesamiento biológico de mediciones experimentales procedentes de unos cuantos componentes macroscópicos.

Por otro lado, el documento '*Automated Semantic Analysis of Changes in Image Sequences of Neurons in Culture*' Omar Al-Kofahi, da a conocer un método  
15 automatizado para cuantificar el comportamiento dinámico de neuronas generando varios niveles de detalle de las mismas. Para ello, el método utiliza un criterio de selección de modelo bayesiano que aprovecha un conjunto de cambios a corto plazo de los modelos de neuronas y toma en consideración pruebas adicionales aportadas por un cambio de una máscara de iluminación-insensible.

20 El documento, '*Non-Invasive, Label Free, Quantitative Characterisation of Live Cells in Monolayer Culture*' Jing Zhang et al, describe el desarrollo de una nueva técnica para caracterizar poblaciones de células utilizando un microscopio óptico de onda evanescente y un software predictivo que permite el estudio cuantitativo de los  
25 procesos celulares y de células vivas de calidad en alta resolución sin el uso de etiquetas.

Se conocen también algunas patentes relacionadas con el análisis dinámico de muestras biológicas, por ejemplo, el documento EP 2435834 que divulga un nuevo  
30 mecanismo que particularmente mide los estados transitorios del ion de Calcio en un sistema celular.

Sin embargo, en ninguna de las citadas propuestas se permite, al mismo tiempo y de una manera automática, relacionar conjuntamente la escala a nivel celular y la

escala a nivel de tejido debido a que las técnicas de microscopía actuales no permiten obtener imágenes de cultivos celulares con la suficiente resolución como para adquirir el detalle de cada célula por separado, de este modo no es posible caracterizar o conocer cuando una respuesta individual de una célula tiene consecuencias en la respuesta colectiva.

#### Explicación de la invención

Por tanto, existe un interés general para poder caracterizar la propagación de ciertos iones, como el ion de Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), en cultivos celulares bajo un estímulo externo de energía eléctrica a nivel celular. De este modo se puede relacionar la respuesta dinámica de la concentración del ion de Calcio, de manera automática, tanto a nivel celular como a nivel de tejido.

El procedimiento propuesto se aplica a dicha finalidad y su gran utilidad, es por ejemplo, que se puede observar cómo se modifica la propagación del ion de Calcio en función de: la concentración de fármacos candidatos para modular la dinámica del ion de Calcio<sup>+</sup>, o en función de la presencia de células con mutaciones genéticas con un marcador fluorescente que regulan la dinámica del ion de Calcio.

La invención proporciona para ello, de acuerdo a un primer aspecto, un método implementado por ordenador para caracterización dinámica de células en cultivos celulares. El método comprende a) adquirir una secuencia de imágenes de fluorescencia de un cultivo celular; b) segmentar dicha secuencia de imágenes de fluorescencia de dicho cultivo celular e identificar la ubicación, forma y tamaño de cada célula que forma parte de dicho cultivo celular; c) medir el nivel de fluorescencia de cada célula identificada para determinar una concentración del ion de Calcio en cada célula identificada; d) estimular, mediante un aporte externo de energía eléctrica, dicho cultivo celular a una determinada frecuencia de estimulación; e) determinar la respuesta de cada célula identificada a dicha determinada frecuencia de estimulación; y f) determinar separadamente una respuesta global de dicho cultivo celular, estimulado por el citado aporte externo de energía eléctrica, y analizar la propagación eléctrica de dicho estímulo eléctrico en forma de una elevación local de la concentración del ion de Calcio a dicha determinada frecuencia de estimulación.

Generalmente la metodología consiste en tres tramos de estimulación donde, partiendo de un estado de reposo, se estimula a un ritmo (frecuencia) cada vez con mayor velocidad hasta alcanzar una situación de inestabilidad. De este modo se  
5 puede emular por ejemplo una situación de exigencia cardiaca.

Además, en una realización preferida y característica del método propuesto, se correlaciona la respuesta de cada célula identificada a dicha determinada frecuencia de estimulación con la respuesta global de dicho cultivo celular permitiendo  
10 determinar la incidencia de dicha respuesta de cada célula con dicha respuesta global.

Las imágenes de fluorescencia preferiblemente son obtenidas mediante técnicas de microscopía de fluorescencia convencional o confocal. En cuanto al tipo de células  
15 sobre las que es posible aplicar el método propuesto por la invención, éstas pueden ser células excitables como miocitos, en particular cardiomiocitos, o células del sistema nervioso del tipo neuronas, en función del ejemplo de realización.

La segmentación de la secuencia de imágenes se realiza, según un ejemplo de  
20 realización, mediante un filtro, por ejemplo un filtro *Watershed*, adaptado al tamaño de la célula que se quiera identificar.

Preferiblemente, en la mencionada etapa c), se normaliza el nivel de fluorescencia medido para determinar la concentración del ion de Calcio a un nivel basal de cada  
25 célula identificada.

En un ejemplo de realización preferido, la determinación de la respuesta de cada célula se determina realizando una clasificación y etiquetación de dicha respuesta en al menos uno de los siguientes regímenes dinámicos: respuesta regular, respuesta  
30 alterna, bloqueo, presencia de una onda, respuesta irregular o inactiva.

La respuesta de la célula se clasifica en base a su comportamiento en relación a los estímulos eléctricos aplicados. Preferiblemente, los estímulos eléctricos serán aportados periódicamente. La respuesta regular significa que la célula responde de

forma regular a cada estímulo eléctrico. En la respuesta alterna la célula responde de manera alterna, en uno de cada dos estímulos eléctricos la respuesta de la célula es de menor intensidad. En la respuesta de bloqueo, la célula sólo responde a uno de cada 'm' estímulos eléctricos, siendo 'm' mayor a 1. En la respuesta presencia de una onda la célula inicia una respuesta que se prolonga durante más de un estímulo eléctrico, que generalmente será de intensidad elevada. En la respuesta irregular, la célula responde de manera irregular y la concentración de Calcio no está correlacionada con los estímulos eléctricos. Finalmente, en la respuesta inactiva la célula no responde a ningún estímulo eléctrico.

10

Preferiblemente, cada vez que se produce un cambio en la frecuencia de estimulación, se aplica un test estadístico que mide el cambio en el número de células que responden según cada régimen dinámico.

15

En un ejemplo de realización alternativo, se pueden calcular también histogramas con la medida de las células identificadas, la posición de cada célula identificada en dicho cultivo celular, la cantidad total de células pertenecientes a un mismo régimen dinámico, la respuesta de cada célula identificada dependiendo de su tamaño, mapas con la distribución espacial de la respuesta de cada célula.

20

Para caracterizar y clasificar la actividad global del cultivo celular independientemente de lo que ocurra con las células individuales se realiza, preferiblemente, un análisis fotograma a fotograma de las imágenes para poder trazar una frontera entre regiones activas e inactivas y para poder medir también el desplazamiento de dicha frontera en el tiempo. De esta forma, se puede calcular la velocidad lineal y angular de la respuesta global de dicho cultivo celular y también clasificar la propagación de la actividad en dicho cultivo celular en al menos uno de los siguientes modos: propagación plana desde unos electrodos utilizados para inducir la propagación de un señal que tiene su origen en estos electrodos, propagación plana en cualquier otra dirección o propagación curvada o en espiral que tienen su origen en actividad espontánea del cultivo.

25  
30

Breve descripción de los dibujos

Las anteriores y otras ventajas y características se comprenderán más plenamente a partir de la siguiente descripción detallada de unos ejemplos de realización con referencia a los dibujos adjuntos, que deben tomarse a título ilustrativo y no limitativo, en los que:

5

la Fig. 1 muestra un ejemplo de segmentación de un cultivo celular. En la Fig. 1A se muestra una imagen de variabilidad de la concentración del ion de Calcio en el cultivo celular. En la Fig. 1B se muestran las células detectadas junto a las etiquetas numéricas adjudicadas;

10

la Fig. 2 es una ilustración del procedimiento que sigue el método propuesto de acuerdo a un ejemplo de realización;

15

la Fig. 3 muestra, las diferentes señales obtenidas para cada uno de los diferentes regímenes dinámicos para una célula que se está estimulando mediante un aporte externo de energía eléctrica cada dos segundos. Las barras negras de la parte superior marcan el instante de estimulación;

20

la Fig. 4 muestra en su imagen superior, la distribución espacial de la respuesta de la concentración del ion de Calcio en las células en un tramo de estimulación concreto según los diferentes regímenes dinámicos, y en su imagen inferior, la distribución radial normalizada representando la distribución de distancias entre células de un mismo tipo dinámico.

25

#### Descripción detallada de un ejemplo de realización

Con referencia a la Fig. 2, el primer paso a realizar es el de la segmentación; es decir, identificar, coger los límites y etiquetar cada una de las células que forman el cultivo celular. Para ello, se coge toda la secuencia de imágenes de un tramo de estimulación y se calcula la variabilidad a lo largo del citado tramo de estimulación.

30

En general, las regiones que presentan más variabilidad corresponden a células, mientras que las de menor variabilidad corresponderán a regiones extracelulares. Posteriormente, la imagen de variabilidad obtenida se procesa mediante una técnica de segmentación de curvas de nivel (por ejemplo, *Watershed*, cuenca hidrográfica, etc.), que identifica las regiones con variabilidad local máxima. En la invención

propuesta, las regiones identificadas como un máximo local tienen un área comprendida dentro de un cierto intervalo definido según la medida característica de las células del cultivo, con lo que se garantiza que las regiones identificadas presenten una medida que se corresponde con el tamaño típico de una célula, evitando la aparición de pequeñas regiones que corresponderían a subregiones de una célula o a regiones grandes resultantes de la agrupación de diversas células del cultivo celular. Los resultados de aplicar la segmentación son los que se muestran en las Figs. 1A y 1B.

Una vez la imagen ha sido segmentada se puede medir el nivel de fluorescencia del ion de Calcio para cada una de las células del cultivo. Este nivel de fluorescencia es la intensidad de luz media de los píxeles de la célula y es un nivel de fluorescencia que, en el caso de una célula sana, presentará subidas y bajadas acompañadas con el ritmo de estimulación eléctrica correspondiente al paso del frente eléctrico por la citada célula. Este nivel de fluorescencia se normaliza al valor de la frecuencia basal de la propia célula medida en el tramo de estimulación, y por lo tanto la célula no debería responder a los citados estímulos eléctricos. De este modo, se consigue obtener un nivel de fluorescencia para cada célula del cultivo y además un nivel de fluorescencia de todo el cultivo como un todo.

Seguidamente, tal como se puede observar en la Fig. 3 se clasifica la respuesta de la célula en cada tramo de estimulación, en este caso por ejemplo a estímulos eléctricos periódicos, partiendo de las imágenes de fluorescencia grabadas mientras se estimula la célula clasificando la respuesta de la célula en los citados regímenes dinámicos. Para poder clasificar la actividad de cada célula en los citados regímenes dinámicos se puede utilizar una técnica conocida como *Random Forest* del tipo *machine learning*. A partir de un conjunto de señales previamente clasificadas (por ejemplo alrededor de 500), la técnica consiste en generar un conjunto de árboles de decisión con un componente al azar (por ejemplo 1000). Luego, al clasificar una nueva señal se aplica el conjunto de árboles de decisión escogiendo el resultado que ha sido proporcionado un mayor número de veces.

En una opción preferida, cada vez que se modifica el ritmo de estimulación, es decir se modifica la frecuencia de estimulación, se aplica un test estadístico, por ejemplo

el de *McNemar*, de significancia de cambios. Por ejemplo cuando se pasa de estimular cada segundo a estimular cada 0.75 segundos. Mediante la utilización de este test, el método propuesto tal como se muestra en la Fig. 4, permite certificar que a frecuencias elevadas los casos para la respuesta 'bloqueo' son superiores a los de la respuesta 'regular', o que cuando se vuelve a frecuencias bajas, después de haber estimulado a elevada frecuencia, existe una tendencia a que aparezcan más ondas, es decir, que aumente la respuesta 'Presencia de ondas', o que cuando una célula responde de forma 'inactiva' lo hace independientemente del ritmo de estimulación.

10

Alternativamente, se pueden calcular también histogramas con la medida de las células identificadas, la posición de cada célula identificada en dicho cultivo celular, la cantidad total de células pertenecientes a un mismo régimen dinámico, la respuesta de cada célula identificada dependiendo de su tamaño, mapas con la distribución espacial de la respuesta de cada célula.

15

Una vez caracterizada y clasificada la respuesta de una única célula, se realiza la caracterización y clasificación de la actividad de todo el cultivo celular. Para ello, se realiza un análisis fotograma a fotograma de las imágenes para poder trazar una frontera entre regiones activas e inactivas y para poder medir también el desplazamiento de dicha frontera en el tiempo. De esta forma, se puede calcular la velocidad lineal y angular de la respuesta global de dicho cultivo celular y acabar dibujando, por ejemplo, un mapa de isócronas (curvas de igual tiempo, de acuerdo al ejemplo de realización curvas según la llegada de los frentes). Con el objetivo de optimizar aquellos puntos en los que la señal es óptima, se descartan las regiones entre células contiguas donde la señal es más pobre.

20

25

Para cada tramo de estimulación, se toma la señal total del cultivo (fluorescencia media del fotograma entero en función del tiempo). Esta señal se utiliza para conocer el inicio y el final de cada frente, realizando un filtrando mediante un filtro paso banda previo admitiendo sólo aquellas frecuencias comprendidas en el rango que tiene sentido de acuerdo a la estimulación (periodos entre 0.25 y 5 segundos), y buscando posteriormente los puntos donde la derivada cruza con el eje de coordenadas (obteniendo los máximos y mínimos).

30

Luego, para localizar la posición del frente en cada fotograma se utiliza la imagen del cultivo celular segmentado, para ello se puede dividir el campo del cultivo mediante una red de tipo cuadrangular de modo que por ejemplo cada cuadrado contiene píxeles pertenecientes como mínimo a un par de células. En cada uno de estos  
5 cuadrados se contabilizan cuantos píxeles forman parte de la célula obteniendo una cuadrícula conociendo cuantos píxeles son susceptibles de ser activados. De este modo se pueden descartar las regiones donde la señal es más ruidosa. Generalmente, se normaliza cada fotograma al máximo de la actividad total del tramo de estimulación de manera que en cada píxel haya un valor intervalo [0 1] y se  
10 mira en cada fotograma y cada cuadrado de la red cuantos píxeles superan el umbral de 0.5 (mitad de la actividad máxima). De este modo es posible construir una nueva imagen, que substituye al anterior fotograma, con tan sólo los píxeles que han superado el umbral, consiguiendo de esta forma una imagen de menor resolución pero con un nivel de ruido prácticamente nulo.

15

Finalmente, la velocidad instantánea se calcula, de acuerdo a un ejemplo de realización, cogiendo para cada tres fotogramas consecutivos la imagen binaria con la posición del frente y se busca la frontera entre la zona activa y la no activa, obteniendo así una curva que será la isócrona (puntos donde se encuentra el frente  
20 en dicho fotograma). Para cada tres fotogramas consecutivos se puede hacer una medida de la velocidad en el fotograma central de la siguiente manera: con la curva del fotograma central, se va siguiendo los píxeles que la componen trazando rectas perpendiculares a la curva y midiendo la distancia a lo largo de dichas rectas hasta la siguiente y anterior curva. Para cada recta perpendicular se tendrán entonces dos  
25 valores, la semisuma de los cuales dividido entre el tiempo entre fotogramas proporciona una medida de la velocidad local en aquel punto de la curva. Haciendo la media de los valores de la velocidad para todos los puntos de la curva se obtiene la velocidad media del fotograma. Una vez medidos todos los fotogramas de un frente se puede representar el módulo de la velocidad en función del fotograma y el  
30 ángulo de la velocidad en función del fotograma. Haciendo una regresión lineal de estas dos representaciones se obtiene una medida de la velocidad angular y la velocidad lineal media del frente.

El alcance de esta invención está definido en el siguiente conjunto de reivindicaciones.

5

REIVINDICACIONES

1. Método implementado por ordenador para caracterización dinámica de células en cultivos celulares, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- 5 a) adquirir una secuencia de imágenes de fluorescencia de un cultivo celular;
- b) segmentar dicha secuencia de imágenes de fluorescencia de dicho cultivo celular e identificar la ubicación, forma y tamaño de cada célula que forma parte de dicho cultivo celular;
- c) medir el nivel de fluorescencia de cada célula identificada para determinar  
10 una concentración de un ion de Calcio en cada célula identificada;
- d) estimular mediante un aporte externo de energía eléctrica dicho cultivo celular a una determinada frecuencia de estimulación;
- e) determinar la respuesta de cada célula identificada a dicha frecuencia de estimulación; y
- 15 f) determinar separadamente una respuesta global de dicho cultivo celular estimulado mediante dicho aporte externo de energía eléctrica y analizar la propagación eléctrica de dicho estímulo eléctrico en forma de una elevación local de la concentración del ion de Calcio a dicha determinada frecuencia de estimulación.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende  
20 determinar la incidencia de dicha respuesta de cada célula con dicha respuesta global mediante una correlación de la respuesta de cada célula identificada a dicha determinada frecuencia de estimulación con la respuesta global de dicho cultivo celular.

3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha segmentación  
25 de la secuencia de imágenes se realiza mediante un filtro adaptado al tamaño de la célula que se quiera identificar.

4. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende  
30 normalizar dicho nivel de fluorescencia medido de cada célula identificada para determinar la concentración del ion Calcio a un nivel basal de cada célula identificada.

5. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha determinación de la respuesta de cada célula identificada a dicha determinada frecuencia de estimulación comprende clasificar la respuesta individual de cada célula en al menos uno de los siguientes regímenes dinámicos: respuesta regular,

respuesta alterna, bloqueo, presencia de una onda, respuesta irregular o inactiva.

6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque comprende además etiquetar el comportamiento dinámico de cada célula clasificada en base a dichos regímenes dinámicos.

5 7. Método según la reivindicación 5 o 6, caracterizado porque comprende además variar dicha determinada frecuencia de estimulación y aplicar un test estadístico que mide el cambio en el número de células que responden según cada régimen dinámico cada vez que se varía dicha determinada frecuencia de estimulación.

10 8. Método según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende además realizar al menos uno de los siguiente cálculos: un histograma de la medida de las células identificadas, la posición de cada célula identificada en dicho cultivo celular, la cantidad total de células pertenecientes a un mismo régimen dinámico, la respuesta de cada célula identificada dependiendo de su tamaño,  
15 mapas con la distribución espacial de la respuesta de cada célula.

9. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho análisis de la propagación eléctrica del cultivo celular comprende calcular al menos la velocidad lineal y angular de la respuesta global de dicho cultivo celular.

20 10. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque comprende además clasificar la propagación de la actividad en dicho cultivo celular en al menos uno de los siguientes modos: propagación plana desde los electrodos, propagación plana en cualquier otra dirección o propagación curvada o en espiral.

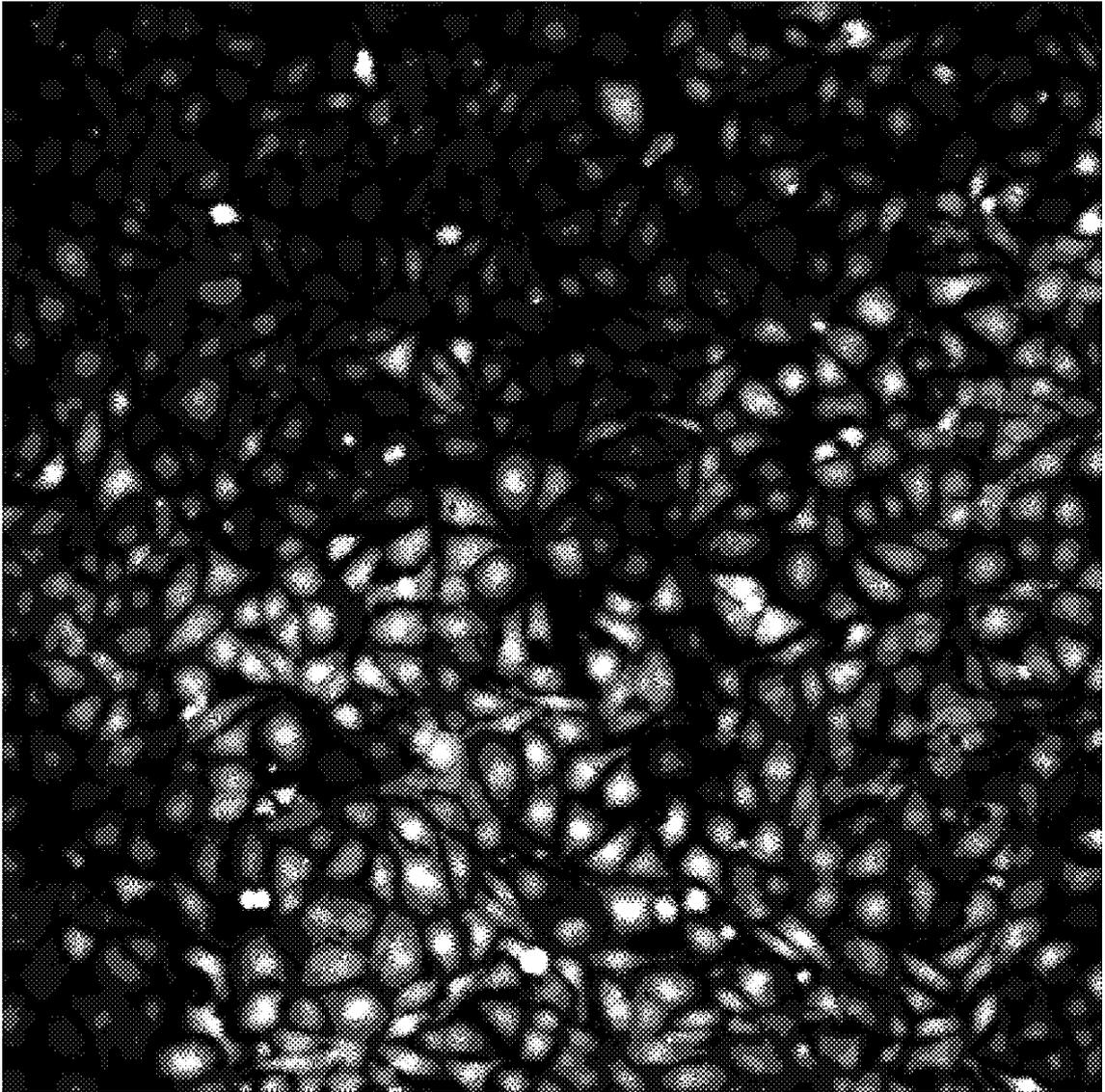
25 11. Método según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende realizar dicha estimulación por aporte externo de energía eléctrica periódicamente.

12. Método según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dichas imágenes de fluorescencia son obtenidas mediante técnicas de microscopía confocal o mediante un microscopio óptico de fluorescencia.

30 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha o dichas células son células cardiacas del tipo cardiomiocitos o células del sistema nervioso del tipo neuronas.

14. Programa informático de ordenador que comprende medios de código de programa informático que ejecutados en un ordenador implementan el método según las etapas e) y f) de la reivindicación 1.

15. Programa informático de ordenador que comprende medios de código de programa informático que ejecutados en un ordenador implementan dicha correlación de la respuesta de cada célula identificada a dicha determinada frecuencia de estimulación con la respuesta global de dicho cultivo celular.



**Fig.1A**

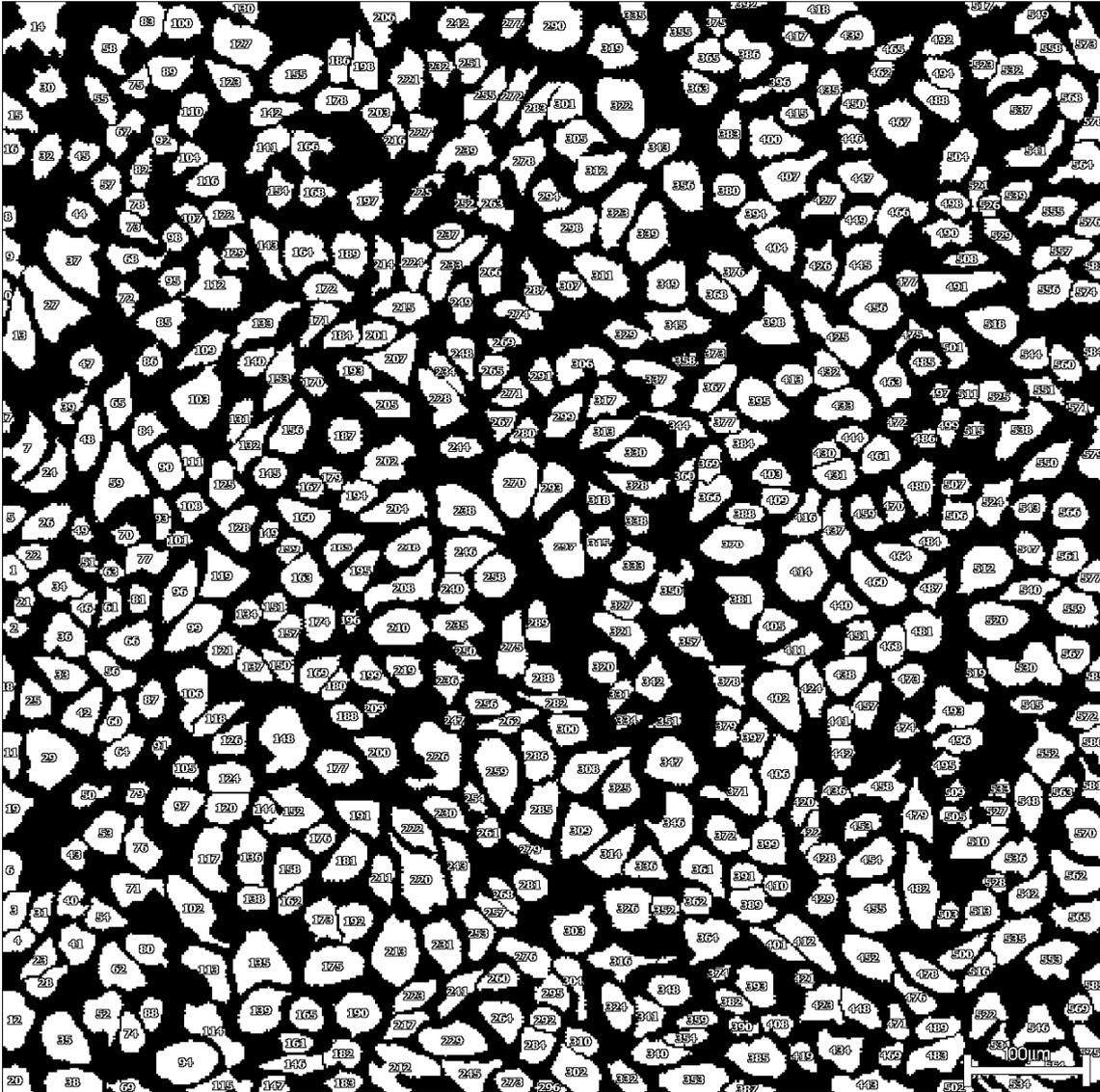


Fig.1B

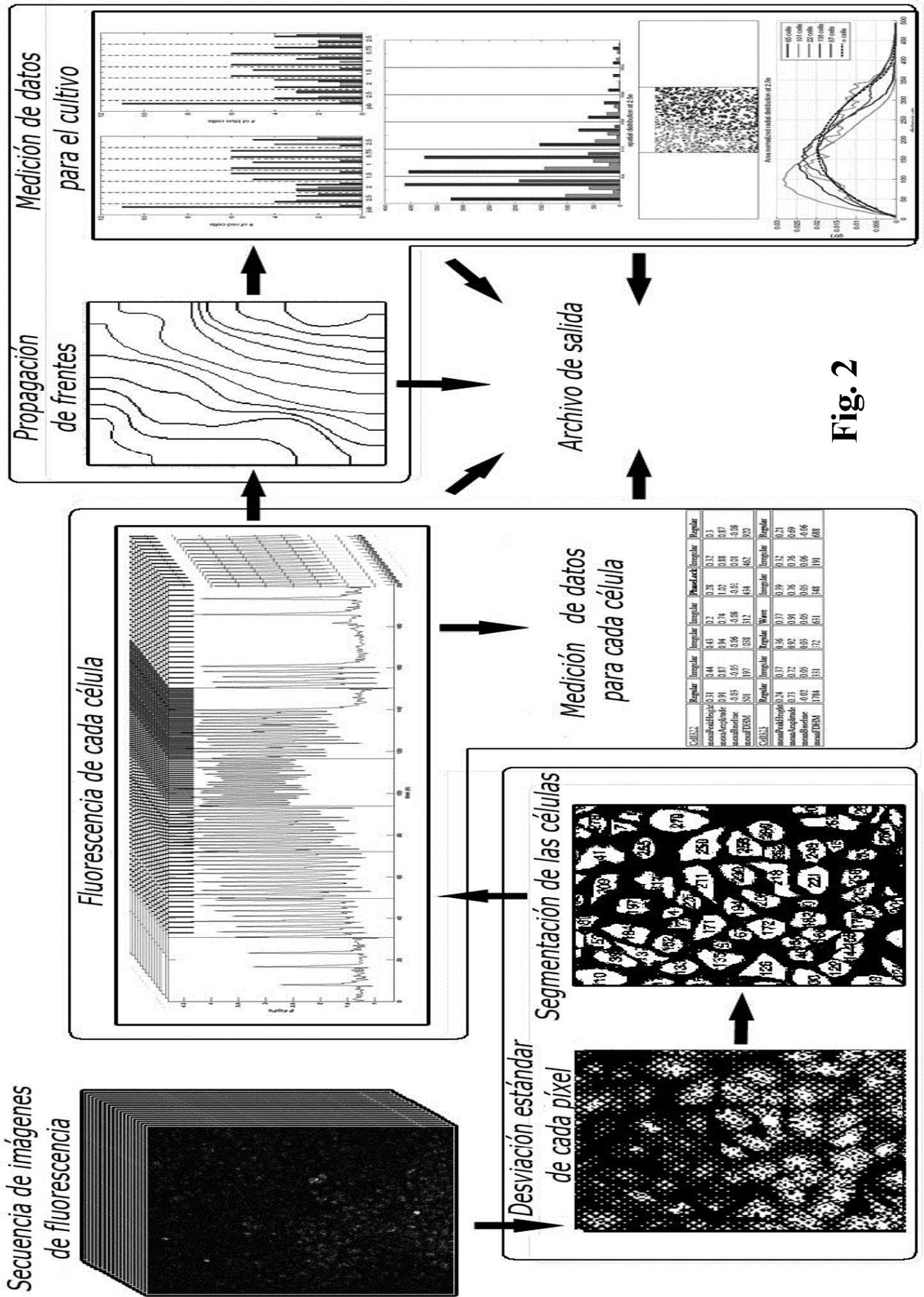


Fig. 2

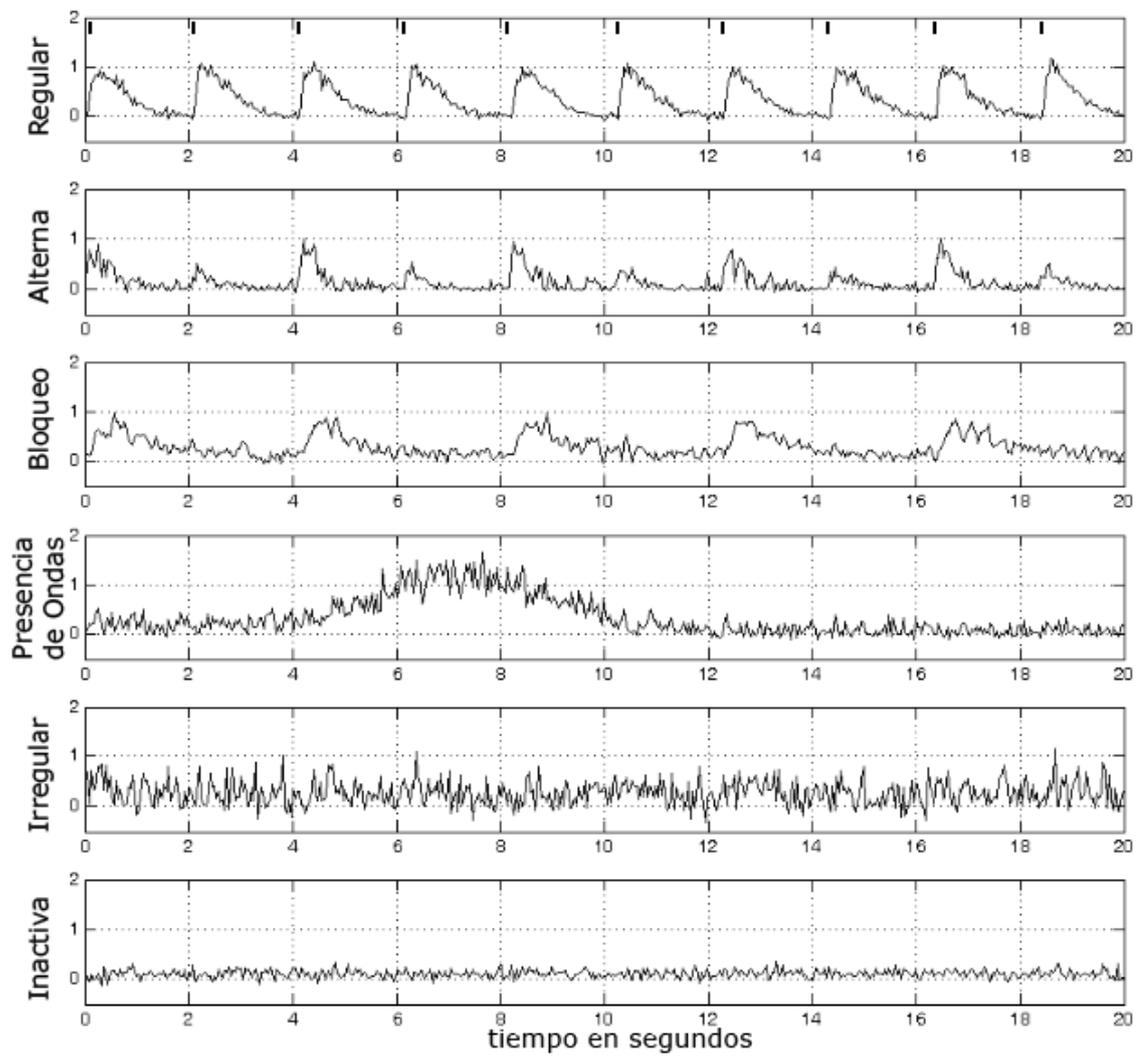


Fig. 3

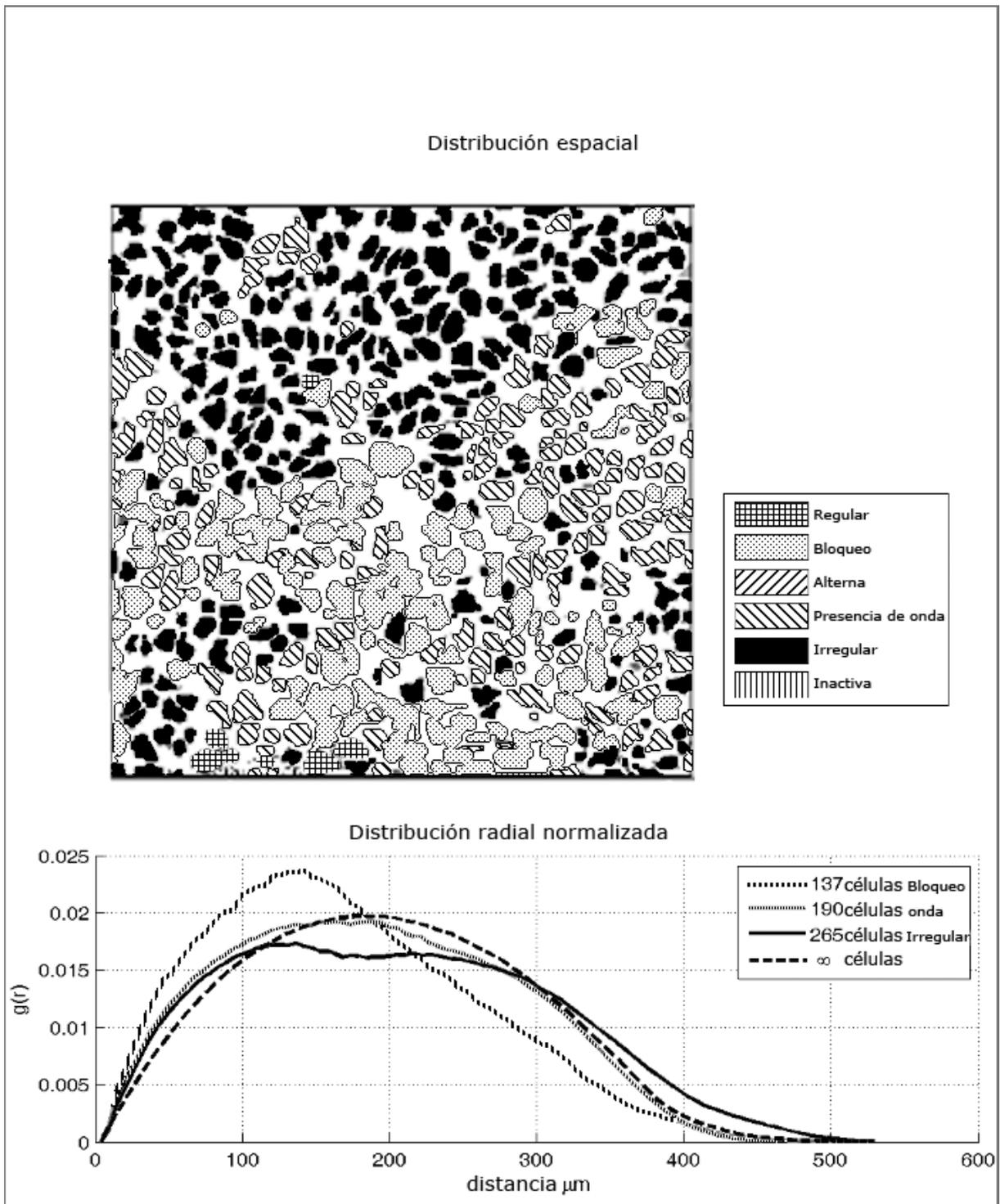


Fig. 4