МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ЦИФРОВОЙ ЦИТОФОТОМЕТРИИ

© Г. И. Штейн,¹ В. Г. Пантелеев, Б. Н. Кудрявцев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург ¹электронный адрес: spbgistn@mail.ru

В статье обсуждаются достоинства и недостатки абсорбционной цитофотометрии, а также основные ошибки метода. Рассматривается состав современной аппаратуры для цитофотометрических исследований с применением цифровых технологий. С целью увеличения точности измерений предлагаются способы определения величин блика, темнового тока, неравномерности фона и учета других ошибок цифровой цитофотометрии. Обсуждаются возможности универсального и специализированного программного обеспечения для цитофотометрии.

Ключевые слова: цитофотометрия, оптическая плотность, цифровое изображение. Принятые сокращения: ЦФМ — цитофотометрия, CCD — charge-coupled device.

Метод цитофотометрии (ЦФМ) широко применяется в клеточной биологии для определения содержания различных веществ в клетках и их компартментах благодаря своей высокой чувствительности (до 10⁻¹⁴ г). С помощью ЦФМ было установлено, что количество ДНК постоянно в гаплоидных клетках данного вида животных или растений; показано, что содержание ДНК в ядрах удваивается в течение клеточного цикла; открыто явление клеточной (соматической) полиплоидии, обнаружена связь между метаболизмом РНК и белка в клетке и т. д. (Свифт, 1969). В настоящее время ЦФМ широко используется не только в фундаментальных исследованиях, но и для целей медицинской диагностики (Haroske et al., 1998).

Для определения количества вещества в клетке наряду с абсорбционной ЦФМ используются и другие фотометрические методы: цитофлуориметрия, проточная цитометрия, микроинтерферометрия, измерения в поляризованном свете и другие методы (Ташкэ, 1980; Hardie et al., 2002; Shapiro, 2004).

В ЦФМ используется изображение объекта исследования, создаваемое световым микроскопом. В отличие от фотометрии растворов и суспензий, где объектом служит весь объем кюветы, на микроизображении присутствуют не только объекты исследования, но и неинформативные области. В связи с этим одной из проблем ЦФМ является регистрация информации только от измеряемого объекта. Развитие методов и аппаратуры ЦФМ для решения этой проблемы можно условно разделить на три этапа (Chieco et al., 2013).

 Зондовая ЦФМ. Объект измерения освещается узким пучком или выделяется на изображении с помощью специальной диафрагмы (зонда), и фотоприемник регистрирует интегральный аналоговый сигнал от всего объекта. Поскольку объекты (например, клетки) имеют различные размеры и форму, с помощью круглого или прямоугольного зонда фиксированных размеров сложно выделить сигнал только от объекта. В результате на фотоприемник попадает свет от окружающего фона, что вызывает существенные ошибки ЦФМ. Ошибки появляются также из-за неравномерного распределения вещества в объекте, из-за рассеяния света и других эффектов (Бродский, 1966; Агроскин, Папаян, 1977; Goldstein, 1981).

2. Для устранения вышеперечисленных ошибок была предложена сканирующая ЦФМ. Зонд малых размеров (много меньше размера объекта) перемещается по изображению (или изображение перемещается относительно зонда) по меандру (сканирование). Сигнал от точек объекта интегрируется, а фоновый сигнал отсекается по пороговому уровню. Происходит частичная дискретизация изображения по строкам, а световой поток преобразуется в аналоговый электрический сигнал (Altman, 1975). На таком принципе работали, например, цитофотометры SMP-0.5 (Opton, Германия) и M86 (Vickers, Великобритания). В анализаторе Morphoquant (Carl Zeiss, Jena, Германия) дискретизация изображения происходила не только по строкам сканирования, но и по точкам внутри строки, а сигнал преобразовывался в цифровую форму и обрабатывался компьютером. В анализаторе изображений IBAS (Opton, Германия) сочетались сканирующая и телевизионная системы. Эти приборы являлись переходной ступенью к третьему этапу, который можно условно назвать «цифровой» ЦФМ.

3. В цифровой ЦФМ используется фотодиодная матрица, благодаря которой происходит параллельное преобразование изображения в цифровой сигнал на каждом элементе матрицы, т. е. изображение разбивается на элементы — пиксели (от picture cells). В настоящее время задачи ЦФМ решаются в основном с помощью анализаторов микроизображений, состоящих из микроскопа, цифровой камеры, компьютера и специализированного программного обеспечения. ЦФМ является лишь одной из функций таких анализаторов, которые могут решать много других задач, например морфометрию, текстурный анализ, анализ движения микрообъектов и т. д. Кроме того, на основании проведенных измерений анализатор может произвести классификацию объектов и дать заключение по всему препарату. В англоязычной литературе для цифровой ЦФМ применяется термин «image cytometry» (Bocking, Nguyen, 2004) или «image analysis densitometry» (Hardie et al., 2002).

Анализаторы, которые используются для ЦФМ, выпускают многие фирмы: Olympus и Hamamatsu (Япония), Carl Zeiss и Leica-Microsystems (Германия), Andor Technology (Великобритания) и ряд других. Разработаны многочисленные программы обработки изображений, например AxioVision (Carl Zeiss, Германия), ImagePro (Media Cybernetics, США), Huygens (SVI, Нидерланды), свободно распространяемые программы CellProfiler, ImageAnalyzer и др. Однако эти программы измеряют в основном геометрические и лишь некоторые фотометрические параметры. Программ, обеспечивающих проведение цитофотометрических измерений, гораздо меньше. К ним можно отнести, например, «Видеотест-Морфология» (ВидеоТест, Россия), MMCatalog (MMC, Россия), HCImage (Hamamatsu) и ImageJ (NIH, США). Наряду с фирменными анализаторами микроизображений и программным обеспечением исследователи используют и самостоятельно разработанные программы, и аппаратуру для ЦФМ (Натяганова, Трифонов, 2007; Черток и др., 2012; Иванкина и др., 2013).

В настоящей статье рассматриваются принципы ЦФМ, требования к аппаратуре и программному обеспечению для цифровой ЦФМ, дается анализ основных ошибок и приводятся методики их уменьшения.

Основные положения ЦФМ

Закон Бугера—Ламберта—Бера. В абсорбционной фотометрии степень поглощения света веществом характеризуется коэффициентом пропускания т или оптической плотностью D:

$$D = \lg (\Phi_0 / \Phi) = \lg (1/\tau), \qquad (1)$$

где Φ_0 — падающий на объект световой поток, Φ — прошедший через объект световой поток. Определение количества вещества по поглощению света основано на законе Бугера—Ламберта—Бера, описывающем ослабление параллельного монохроматического пучка света при распространении его в поглощающей среде. Закон может быть записан в виде:

$$D = kch,$$
(2)

где с — концентрация вещества, h — толщина объекта, k — показатель поглощения, характеризующий свойства вещества и зависящий от длины волны λ поглощаемого света. Зависимость показателя поглощения от длины волны называется спектром поглощения. Таким образом, измерив D и зная k и h, можно найти концентрацию вещества c, a измерив площадь объекта, можно найти его массу.

Поскольку для вычисления D используется отношение Φ_0/Φ , нет необходимости измерять абсолютные значения светового потока, а можно зарегистрировать электрические сигналы фотоприемника I₀ и I. Если преобразование светового потока в электрический сигнал происходит линейно, то $\Phi_0/\Phi = I_0/I$ (Агроскин, Папаян, 1977). В сканирующей и цифровой ЦФМ измерение оптической плотности происходит с учетом сигнала от каждого пикселя. Суммирование по всему изображению объекта дает интегральную оптическую плотность ID = ΣLD_i (где LD — локальная оптическая плотность). Средняя плотность MD = ID/S (где S — площадь объекта в пикселях). Если распределение вещества в объекте неравномерное, то MD \neq D (так как $\Sigma lg(I_0/I_i) \neq lg \Sigma(I_0/I_i)$). Необходимо отметить, что величина ID зависит от числа пикселей (т. е. от величины S), поэтому сравнивать ID разных объектов можно только при одинаковых размерах пикселя или пользоваться MD. Иногда исследователям достаточно определить относительное количество вещества, для чего достаточно измерить только ID.

Спектры поглощения и ЦФМ. В зависимости от спектральной области ЦФМ условно подразделяют на ультрафиолетовую (УФ) ЦФМ и ЦФМ в видимой области. В УФ-области многие вещества в клетке (нуклеиновые кислоты, белки) обладают существенным поглощением, что позволяет проводить непосредственные измерения содержания указанных веществ методами ЦФМ. Однако УФ-ЦФМ требует применения специальной и дорогой аппаратуры, в то время как для ЦФМ в видимой области используются стандартные микроскопы, что предопределило более широкое ее использование.

В видимой области поглощение света клеточными структурами, как правило, очень мало, поэтому необходимо использовать специальные красители, селективно связывающиеся с исследуемым веществом. Существует ряд количественных цитохимических реакций на важнейшие клеточные компоненты, например реакция Фёльгена на ДНК, где красителем, обеспечивающим поглощение света, является фуксин (Дейч, 1969; Магакян, Каралова, 1989). Для целей ЦФМ важно, чтобы концентрация такого красителя была пропорциональна концентрации исследуемого вещества (Агроскин, Папаян, 1977).

Спектры поглощения красителей, используемых для выявления того или иного вещества в клетке, обычно имеют значительную ширину и могут перекрываться со спектрами поглощения других веществ, поэтому для повышения точности и селективности фотометрические измерения проводятся в узкой спектральной области в максимуме поглощения красителя. Для этого в осветительную часть микроскопа вводятся такие спектральные компоненты, как монохроматоры, дифракционные решетки и интерференционные фильтры. Все эти фундаментальные положения полностью сохраняют свою актуальность и в случае цифровой ЦФМ.

Переход к цифровому изображению. В анализаторе микроизображений в отличие от зондовых цитофотометров происходит многоступенчатое преобразование информации об объекте: световой сигнал преобразуется в аналоговый электрический, затем в цифровой. Поэтому в зависимости от этапа преобразования информационный сигнал можно характеризовать интенсивностью светового потока, амплитудой, цифровым уровнем или яркостью экрана. При переходе от оптического изображения к цифровому происходит не только пространственная (разбиение на пиксели), но и амплитудная дискретизация, при которой аналоговый электрический сигнал разбивается на дискретные уровни. Их количество зависит от разрядности цифрового сигнала. Например, 8-разрядный цифровой сигнал имеет 256 (2⁸) уровней яркости.

Как известно, предел оптической разрешающей способности микроскопа определяется формулой Аббе (Ландсберг, 1976):

$$d = 0.5 \lambda/A, \tag{3}$$

где А — числовая апертура объектива, λ — длина волны света. Дискретизация изображения не будет ухудшать оптическую разрешающую способность, если размер пикселя в плоскости объекта будет по крайней мере в 2 раза меньше d (критерий Найквиста) (Pawley, 2006; Wegerhoff et al., 2006). Поскольку матрица ССD-камеры устанавливается в плоскости изображения, создаваемого объективом, размер (P) элемента матрицы должен быть следующим:

$$P \le 0.5 \lambda M/2A, \tag{4}$$

где М — увеличение объектива. Например, для объектива $20 \times /0.7$ и $\lambda = 0.5$ мкм приемная матрица камеры должна иметь размер элемента не более 3.6 мкм, а для объектива $100 \times /1.4$ — не более 9 мкм.

Помимо пространственной разрешающей способности анализатора существует и амплитудная разрешающая способность. Например, амплитудная дискретизация приводит к ограничению диапазона измерений оптической плотности. Так, при 8-битном сигнале предел амплитудной разрешающей способности составит один цифровой уровень, т. е. 1/256 и $LD_{max} = 1g256 = 2.4$. При наличии шумов и темнового сигнала этот предел может быть существенно выше, например 1/64. Тогда $LD_{max} = 1.8$.

Аппаратура и программное обеспечение для цифровой ЦФМ

Как упоминалось выше, цифровая ЦФМ осуществляется с помощью анализатора микроизображений, основными частями которого являются микроскоп, цифровая камера, компьютер и специализированное программное обеспечение. Помимо общих требований к анализаторам микроизображений (Пантелеев и др., 2005; Chieco et al., 2013) существуют и специальные требования при проведении ЦФМ.

Осветительная система микроскопа должна создавать высокую равномерность освещенности поля зрения. Конструкция микроскопа должна обеспечивать полную настройку освещения по Келлеру. По нашим данным, применение осветителя со светодиодной матрицей (LED — light emmited diode) и стабилизированным источником питания позволяет уменьшить неравномерность освещенности до 2 %, в то время как неравномерность лампового осветителя составляет 3—5 %. Применение светодиодных монохроматических осветителей позволяет также обойтись без интерференционных фильтров, необходимых для выделения узкой спектральной области поглощения красителя.

Объективы. Разрешающая способность объектива зависит в основном от его апертуры (3). Однако для ЦФМ не менее важным параметром является дифракционная глубина резкости, которая также зависит от апертуры объектива: $T = n\lambda/A^2$ (Агроскин, Папаян, 1977). Глубина резкости должна соответствовать толщине фотометрируемого объекта, поэтому объективы с большой апертурой

(т. е. с малой глубиной резкости) для ЦФМ применять нежелательно. Наиболее подходящими являются объективы от $20 \times$ до $40 \times$ с небольшой апертурой (Chieco et al., 1994). Важными характеристиками объектива для ЦФМ являются сферические и хроматические аберрации, а также величина блика (т. е. рассеянного и отраженного света) от линз объектива. Для коррекции аберраций применяются многолинзовые объективы, однако с увеличением количества линз блик возрастает. К сожалению, производители объективов не указывают величину блика, но ее можно оценить при комплексной проверке анализатора (Chieco et al., 2013). Методика измерения блика будет изложена в следующем разделе.

Адаптер для установки видеокамеры на микроскоп. Устанавливается, как правило, на тринокулярную насадку для механического и оптического сопряжения видеокамеры с микроскопом. Распределение светового потока в тринокуляре должно быть 30/70, т. е. 70 % света направляется на камеру. Оптика, часто устанавливаемая в адаптере, согласует размер поля зрения микроскопа с размером матрицы камеры. Например, камера с матрицей 2/3 дюйма и адаптером $1.5 \times$ может «захватить» только 18.3 % площади изображения, формируемого объективом, а с адаптером 0.63×-46.2 % (Пантелеев и др., 2005).

Цифровая камера. Аналоговые камеры сейчас практически не используются, так как для их сопряжения с компьютером аналоговый сигнал необходимо переводить в телевизионный, а затем в цифровой. Подобные преобразования вносят много погрешностей и производятся относительно медленно. В современных анализаторах изображений чаще всего используются цифровые камеры. Центральным узлом такой камеры является фотодиодная матрица. Матрицы производятся по разным технологиям и различаются способами считывания сигнала и регистрации изображения. В камерах используются два типа сенсоров — CCD (charge-coupled device) и CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor). Различия свойств сенсоров определили области их применения. CMOS-матрицы, как правило, используются в цифровых фотоаппаратах и устройствах скоростной записи процессов, а ССД-матрицы — в высококачественных камерах, которые в том числе используются в микроскопии и наиболее пригодны для ЦФМ.

Сенсоры с нанесенной Байеровской маской позволяют получить цветное изображение объектов. На элементы матрицы наносятся светофильтры (красный, зеленый и синий), которые обеспечивают цветное изображение. Однако использование фильтра Байера уменьшает чувствительность матрицы, а также снижает разрешение по горизонтали сенсора до 65 % и по вертикали до 80 %. Следовательно, для получения изображения с высоким разрешением и точным отображением значений яркости использование монохромного сенсора предпочтительнее. Размеры матриц традиционно измеряют в дюймах. На практике чаще используют матрицы с размером 1/2 и 2/3 дюйма по диагонали и размерами пикселей от 3 до 8 мкм. Формат матрицы, т. е. количество пикселей по горизонтали и вертикали, нельзя воспринимать как характеристику разрешения, а лишь как оценку объема информации. Большое количество активных пикселей не всегда дает дополнительную информацию об объектах. При количестве свыше 3 мегапикселей, как правило, нарастают шумы камеры, возрастает время обработки изображений, повышаются требования к производительности компьютера. Как было указано выше, основным параметром разрешения является размер пикселя (4).

Цифровая камера является сложным электронным устройством, параметры которого определяются не только свойствами матрицы. В камере много собственных источников шумов, к ним можно добавить внешние радиочастотные и тепловые наводки. Для регистрации малоконтрастных объектов необходимо уменьшение нежелательных шумов, поэтому одним из главных показателей качества камеры является динамический диапазон.

Динамический диапазон — это способность камеры передавать с определенным качеством полный диапазон градаций яркости. Он характеризуется соотношением сигнал/шум в децибелах (дБ). Камеры с малым значением динамического диапазона «шумят» т. е. искажают изображение. Для ЦФМ используют камеры с динамическим диапазоном 68 дБ и более. Для снижения собственных шумов матрицы и понижения ее темнового тока используют термоэлектронное охлаждение Пельтье. Наличие охлаждения увеличивает динамический диапазон. Камеры с охлаждением Пельтье обладают наибольшим временем накопления изображения, т. е. наибольшей чувствительностью. Величину темнового тока приходится, как правило, оценивать косвенно ПО значению яркости на камере при закрытой матрице (см. ниже раздел «Ошибки в цифровой ЦФМ и способы их уменьшения»).

Разрядность цифрового сигнала определяется АЦП (аналого-цифровым преобразователем) камеры, который преобразует накопленные фотоэлектроны в сенсоре в цифровую форму с разрядностью от 8 до 16 бит. Высокие значения динамического диапазона позволяют повысить разрядность камеры и получить больше уровней яркости на изображении, что сказывается на точности ЦФМ.

Анализ информации производителей позволяет лишь ориентировочно оценить пригодность камеры для ЦФМ. Публикуемым значениям динамического диапазона трудно доверять, значения темнового тока, как правило, неизвестны, а стабильность работы камеры во времени не отражается в техдокументации. Поэтому проверка реальных значений этих характеристик производится при подключении камеры к ПК. Зависимость яркости на камере от времени при постоянной комнатной температуре и полностью закрытой матрице позволяет оценить величину шумов и их стабильность во времени. Камеры с низкой величиной шумов (1—2 цифровых уровня) и с колебанием яркости 0.1—0.2 % наиболее пригодны для ЦФМ.

Программное обеспечение. Оно состоит из драйвера видеокамеры и программы обработки изображения. Драйвер видеокамеры должен осуществлять настройки электронного затвора, яркости, контраста, гаммы, времени накопления, графическое отображение диаграммы яркости и другие операции. Стандартные драйверы управления (twain или derect show) для этого мало пригодны, поэтому для разработки полноценного управления камерой важна поставка производителем SDK (библиотек программ управления камерой). Программы обработки изображения осуществляют запоминание изображения, выделение интересующих объектов в ручном или автоматическом режиме, измерение выбранных параметров, статистическую обработку, запоминание результатов и их передачу в другие статистические программы, например Excel, Statistica. Существуют как свободно распространяемые программы, пригодные для

ЦФМ, например ImageJ, так и коммерческие (HCImage, MMCatalog).

Программа Видеотест-Морфология 5.0 (ООО Видео-Тест, Россия) предоставляет возможность создания методик для ЦФМ. Методика представляет собой последовательность операций по обработке изображений, выполняемую с минимальным участием пользователя. В состав методики входят настройка камеры, калибровка, выбор применяемых функций, параметров измерений и статистической обработки. Пользователь может изменить предустановленную методику, создать свою методику и сохранить ее.

Методика «оптическая плотность с указанием фона вручную» рассчитана на анализ объектов, находящихся на неравномерном фоне. Методика «оптическая плотность с вводом фоновых полей» использует изображения темновых полей камеры и изображения, свободного от объектов, что позволяет учесть неравномерность освещенности поля зрения микроскопа. Методика «оптическая плотность с вводом эталонов» позволяет с помощью набора фильтров с известными значениями ослабления светового потока калибровать камеру.

Методики могут содержать фильтры преобразования: яркость—контрастность, автоконтраст, выравнивание фона, сглаживание шумов, резкость и т. д. Они предназначены для визуального улучшения изображения, чтобы исследователь лучше видел особенности текстуры объекта. Однако фильтры существенно искажают яркостные характеристики объектов, поэтому их нельзя применять при ЦФМ. В отдельных случаях (большие объекты и высокочастотные шумы) для уменьшения влияния шумов можно использовать медианную фильтрацию с маской 3 × 3.

Ошибки в цифровой ЦФМ и способы их уменьшения

Как уже упоминалось, подробный анализ ошибок ЦФМ приведен в монографиях Бродского (1966) и Агроскина и Папаяна (1977). Некоторые ошибки в цифровой ЦФМ несущественны (например, неравномерное распределение поглощающего вещества в объекте), другие имеют место для всех вариантов ЦФМ (рассеяние света, неравномерность освещенности, нестабильность аппаратуры и т. д.). Существуют и специфические ошибки цифровой ЦФМ (например, ошибка выделения на изображении объекта измерения). Рассмотрим наиболее существенные аппаратные ошибки цифровой ЦФМ и способы их уменьшения.

О шибки измерения фона. Из формулы (1) следует, что для вычисления оптической плотности необходимо измерить величину падающего на объект светового потока. От точности измерения I_0 (т. е. фона) будет зависеть и точность вычисления ID. На рис. 1 представлена зависимость расчетной ошибки определения оптической плотности δ_D от ошибки измерения фона δ_F . Эта ошибка возрастает с уменьшением оптической плотности и при D = 0.1 и $\delta_F = 5$ % может достигнуть 21%.

Существуют три основных источника ошибок измерения фона — неравномерность освещенности поля зрения, неоднородность участка препарата, принимаемого за фон, шумы. На рис. 2, *а* представлен график распределения освещенности поля зрения по одной из координат, на котором видно, что при использовании лампового осве-



Рис. 1. Расчетная ошибка измерения оптической плотности объекта (δ_D , %) в зависимости от ошибки измерения фона (δ_F , %) при разных величинах оптической плотности (D).

Цифры у кривых — значения D.

тителя по краям изображения освещенность ниже, чем в центре. Как уже указывалось, использование светодиодного осветителя уменьшает неравномерность до 2 %.

Выбор способа измерения фона зависит от преобладания того или иного источника ошибок. Например, при большой неравномерности освещенности можно использовать изображение пустого поля препарата и вычисления проводить по формуле

$$ID = \Sigma lg (I_{0i}/I_i), \qquad (5)$$

т. е. в каждом пикселе вычисляется LD, а затем происходит суммирование по всему объекту для определения ID. Тем самым производится коррекция неравномерности освещенности. Как указывалось выше, такой способ реализован в программе Видеотест-Морфология 5.0. Однако использование пустого поля требует затрат времени и приводит к появлению ошибок, связанных с нестабильностью системы ввода изображения. При равномерной освещенности поля зрения наилучшим способом измерения фона является выделение не занятой объектами площади в ручном режиме на одном и том же изображении с последующим вычислением средней величины I₀. При измерении фона в нескольких точках препарата могут возникать ошибки, связанные с флуктуациями сигнала цифровой камеры (Штейн, 2002). В этом случае шумы на изображении можно уменьшить,

предварительно применяя медианный цифровой фильтр (рис. 2, б).

В программе MMCatalog (MMC, Россия) реализован способ автоматического вычисления сигнала фона по гистограмме распределения яркости, причем сигнал от выделенного объекта (объектов) не учитывается, а берется среднее значение оставшейся части изображения. Такой способ применим, когда на изображении присутствуют только измеряемые объекты и фон.

Темновой сигнал. У любого фотоприемника существует электрический сигнал даже при отсутствии падающего на него светового потока. Этот сигнал называется темновым током. Изображение, полученное при отсутствии светового потока, называется темновым полем. Темновое поле вносит в измерение ID систематическую ошибку, величина которой зависит от типа цифровой камеры и даже от конкретного экземпляра. Для устранения этой ошибки следует вычесть значение темнового сигнала как из сигнала фона, так и из сигнала от объекта (Пантелеев и др., 2005):

$$ID = \Sigma lg[(I_{0i} - I_{Ti})/(I_i - I_{Ti})].$$
(6)

Подобная формула реализована в программе Видеотест-Морфология 5.0, где в каждом пикселе используется свое значение фона I_{0i} и темнового сигнала I_{Ti} .

Рассеяние света в оптической системе микроскопа (блики). Этот эффект, который получил название эффекта Шварцшильда—Виллигера, приводит к уменьшению контраста изображения и как следствие к уменьшению измеряемой величины ID. На величину блика влияют величина апертуры конденсора, конструкция объектива и размер полевой диафрагмы, причем последний фактор является наиболее существенным (Агроскин, Папаян, 1977). Величину блика можно оценить по непрозрачной маске, имеющей размер, близкий к изучаемому объекту (Агроскин, Папаян, 1988; Kindermann, Hilgers, 1994; Омельянчук и др., 2010).

Можно предложить более простой приближенный способ определения величины блика, основанный на измерении светового сигнала в зависимости от размера полевой диафрагмы микроскопа. При закрытии диафрагмы от максимального до минимального значения величина блика уменьшается, соответственно уменьшается и величина I_{0.} Построив график (см. рис. 3) и экстраполируя его до величины полного закрытия диафрагмы (практически



Рис. 2. Равномерность освещенности при отсутствии объектов в поле зрения без (*a*) и с применением (б) цифрового медианного фильтра.

измерить I_{min} в этом случае невозможно ввиду отсутствия света), можно определить относительную величину блика g (для установленного размера полевой диафрагмы f)

$$g = (I_f - I_{min})/I_f$$
(7)

и использовать ее для корректировки расчетов, подставив в формулу (6):

$$ID = \Sigma lg[(I_{0i} - gI_{0i} - I_{Ti})/(I_i - gI_{0i} - I_{Ti})].$$
(8)

Величину относительной ошибки, возникающей в том случае, если не учитывается влияние блика, можно оценить по графику (рис. 4). Ошибка возрастает при увеличении оптической плотности объекта, а также при увеличении величины блика.

Поскольку цифровая камера захватывает только центральную область поля зрения микроскопа, можно считать величину gI_{0i} постоянной. Темновой ток камеры также практически не меняется по полю. Поэтому $\Delta = gI_{0i} + I_{Ti} \approx$ const и формула (8) при этих допущениях упрощается:

$$ID = \Sigma lg[(I_{0i} - \Delta)/(I_i - \Delta)].$$
(9)

Таким образом, для учета влияния блика и темнового тока можно приближенно определить величину блика по методике, изложенной выше, измерить величину темнового тока камеры и вычислить поправку Δ . Затем вычесть эту величину из изображения объекта до проведения измерений ID. Если эти измерения проводятся с учетом изображения, свободного от объектов (фон), то из него также надо вычесть поправку ∆. Операция вычитания константы из изображения реализована, например, в программе ImageJ (Process/Math/Subtract). Необходимо отметить, что определение величины блика проводится для конкретного объектива и она справедлива при неизменной настройке осветительной системы. Предлагаемая методика аналогична методике Агроскина и Папаяна, где поправка на величины блика и темнового тока вводятся в световую характеристику анализатора изображений (Агроскин, Папаян, 1988).

Выделение объекта на цифровом изображении. Существует много способов выделения объекта измерения на цифровом изображении, реализуемых программным обеспечением. Наиболее часто используются обводка вручную, по пороговому уровню и автоматический градиентный способ. Обводку вручную с помощью «мыши», «светового пера» или других устройств производит оператор. Этот способ используется для малоконтрастных объектов, при наличии соприкасающихся объектов или при неоднородном фоне. Для выделения контрастных отдельно расположенных объектов используется выделение по пороговому уровню, который устанавливает оператор. Пиксели с яркостью меньше порогового уровня относятся к объекту (объектам) измерения, и от выбора порогового уровня будет зависеть величина ID. Такая зависимость приведена на рис. 5. На кривой существует плато, в пределах которого ошибка измерения будет минимальной. Градиентный способ реализуется программой обработки изображений, например Видеотест-Морфология, и контуры объекта определяются по градиенту яркости на границе фон-объект. На точность измерения при таком способе будут влиять неоднородность фона и наличие соприкасающихся объектов.



Рис. 3. Графический метод расчета относительной величины блика g в зависимости от относительного размера полевой диафрагмы F.

Пояснения см. в тексте.



Рис. 4. Расчетная ошибка определения оптической плотности объекта (δ_D , %) в зависимости от его истинной оптической плотности D при разных величинах блика (g, %).

Цифры у кривых — значения g.



Рис. 5. Интегральная оптическая плотность (ID) изолированного гепатоцита, окрашенного на гликоген, в зависимости от порогового уровня.

Пояснения см. в тексте. Микроскоп Axioskop. Об. 40×/0.75. Цифровая камера DFC360FX. Разрешение 1392 × 1040.

Проблема вложенных объектов. Такая проблема может возникнуть при расположении одного объекта измерения внутри другого. Например, при измерении содержания ДНК в ядре клетки слой слабоокрашенной цитоплазмы будет располагаться над (а возможно, и под)



Рис. 6. Гистограмма распределения содержания ДНК в ядрах гепатоцитов крысы. Микроскоп Axioskop. Об. 40×/0.75. Интерференционный фильтр 575 нм. Цифровая камера DFC360FX. Разрешение 1392 × 1040. Измерено 200 ядер.

ядром, что может привести к увеличению ID. Для учета этого фактора можно измерить фон на цитоплазме. Однако более корректным будет следующий способ. Необходимо измерить интегральную оптическую плотность ядра ID_N и его площадь S_N, затем измерить среднюю оптическую плотность цитоплазмы MD_C = ID_C/S_C, причем фон измеряется на чистом месте. Скорректированное значение ID_{N1} вычисляется по формуле

$$ID_{N1} = ID_N - S_N \cdot MD_{C.}$$
(10)

Проверка аппаратуры для ЦФМ по биологическому эталону. Комплексная проверка фотометрических параметров цитофотометра проводится по биологическому эталону (Агроскин, Папаян, 1977; Штейн и др., 1998; Bocking, Nguyen, 2004), в качестве которого часто используются препараты изолированных гепатоцитов, окрашенных на ДНК по Фёльгену. Известно, что в печени млекопитающих (особенно грызунов) присутствуют полиплоидные одноядерные и двуядерные гепатоциты, содержание ДНК в ядрах которых составляет ряд кратных диплоидному уровню значений: 1, 2, 4, 8 и т. д. Такие препараты позволяют оценить приборную ошибку по соотношению между модальными значениями соседних классов плоидности. На рис. 6 представлена гистограмма распределения содержания ДНК в ядрах гепатоцитов крысы, окрашенных по Фёльгену, полученная на анализаторе изображений, состоящем из микроскопа Axioskop (Carl Zeiss, Германия) с объективом $40 \times /0.75$, цифровой камеры DFC360FX 1392 × 1040 пикселей (Leica-Microsystems) и компьютера с программой Морфология 5.0 (ООО Видеотест, Россия). Соотношение среднего содержания ДНК в ядрах разной плоидности составило: 2C : 4C = 2.04 (+2 %), 4C : 8C = 1.95 (-2.5 %). Еще одним параметром проверки точностных свойств анализатора является коэффициент вариации (v) модального пика, например 4С, который составил в данном примере 5.4 %. Для лучших сканирующих цитофотометров отклонение от пропорциональности не превышало ±3-4 %, а величина v не превышала 3—5 % (Агроскин, Папаян, 1977).

Заключение

Как упоминалось выше, исследователи, использующие метод ЦФМ, нередко используют универсальные, а также самостоятельно разработанные программы и аппаратуру для ЦФМ (Натяганова, Трифонов, 2007; Черток и др., 2012). Однако необходимо иметь в виду, что, к примеру, в программе ImageJ под Integrated Density понимается не интегральная оптическая плотность, а просто сумма яркостей выделенных пикселей. Такой параметр может быть использован при измерении интенсивности флуоресценции объектов, но не для абсорбционной ЦФМ. В программе ImageJ в разделе фотометрии гелей используется также параметр Uncalibrated Density, который вычисляется как Σlg (255/I_i), т. е. значение сигнала фона принимается равным 255 уровням (максимальный сигнал при 8-разрядном цифровом сигнале). Этот алгоритм вычисления оптической плотности применен и в программе HCImage. Но на практике точное выставление такого уровня фона невозможно вследствие нестабильности аппаратуры и неоднородности фона, и это может привести к существенным ошибкам. Поэтому в программе ImageJ необходимо производить калибровку анализатора (параметр Calibrated Density), что существенно усложняет процесс измерения. Наиболее корректно этот вопрос решен в программе Видеотест-Морфология 5.0, где вычисления проводятся по формулам (5) или (6), а фон может измеряться несколькими способами (см. раздел «Аппаратура и программное обеспечение для цифровой ЦФМ»).

В микроскопических исследованиях для получения цифровых изображений иногда используются бытовые цифровые фотоаппараты. Но для ЦФМ они непригодны из-за ряда проблем — нелинейности преобразования свет/сигнал, наличия различных автоматических настроек, трудностей стыковки с микроскопом.

Таким образом, при использовании анализаторов изображений и программ, отвечающих вышеприведенным условиям, а также методик для уменьшения аппаратных ошибок точностные параметры современной цифро-

вой ЦФМ приближаются к величинам, полученным на цитофотометрах сканирующего типа. При этом в отличие от последних цифровая ЦФМ обладает бо́льшей производительностью и возможностью проведения многопараметрического анализа клеточных популяций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068) и ФАНО России.

Список литературы

Агроскин Л. С., Папаян Г. В. 1977. Цитофотометрия. Л.: Наука. 295с. (Agroskin L. S., Papayan G. V. 1977. Cytophotometry. L.: Nauka. 295 p.)

Агроскин Л. С., Папаян Г. В. 1988. Опыт цифровой телевизионной цитофотометрии. Цитология. 30 (4) : 503—510. (Agroskin L. S., Papayan G. V. 1988. The experience of digital TV cytophotometry. Tsitologiya. 30 (4) : 503—510.)

Бродский В. Я. 1966. Трофика клетки. М.: Наука. 355 с. (Brodsky V. Ya. 1966. Trophism of the cell. М.: Nauka. 355 р.).

Дейч А. 1969. Цитофотометрия нуклеиновых кислот. В кн.: Введение в количественную цитохимию. М.: Мир. 265—287. (Deitch A. 1966. Cytophotometry of nucleic acids. In: Introduction to quantitative cytochemistry. Wied G. (Ed.). New York; London: Acad. Press. 327—354.)

Иванкина Е. А., Алексеева А. Л., Семешин В. Ф., Омельянчук Л. В., Пальчикова И. Г., Шевелева Н. Г., Кирильчик С. В., Жимулев И. Ф. 2013. Цитофотометрическое определение размера генома в онтогенезе двух видов циклопов озера Байкал (Crustacea: Copepoda, Cyclopoida). Цитология. 55 (1): 52—59. (Ivankina E. A., Alekseeva A. L., Semeshin V. F., Omelyanchuk L. V., Palchikova I. G., Sheveleva N. G., Kirilchik S. V., Zhimulev I. F. 2013. Cytophotometric determination of genome size in two species of Cyclops of lake Baikal (Crustacea: Copepoda, Cyclopoida) in ontogenetic development. Cell Tissue Biol. 2: 192—198.)

Ландсбере Г. С. 1976. Оптика. М.: Наука. 928 с. (Landsberg G. S. 1976. Optics. М.: Nauka. 928 р.)

Магакян Ю. А., Каралова Е. М. 1989. Цитофотометрия ДНК. Ереван. 204 с. (Magakian Yu. A., Karalova E. M. 1989. DNA cytophotometry. Yerevan. 204 p.)

Натяганова А. В., Трифонов В. Д. 2007. Фототубус для соединения цифровых камер со светооптическими микроскопами. Цитология. 49 (3) : 250—253. (*Natyaganova A. V., Trifonov V. D. 2007.* A phototube connecting digital cameras with light optic microscopes. Tsitologiia. 49 (3) : 250—253.)

Омельянчук Л. В., Семешин В. Ф., Алексеева А. Л., Пальчикова И. Г., Жимулев И. Ф. 2010. Интегральный метод измерения количества ДНК в клетке с использованием цифровой микрофотографии. Цитология. 52 (4) : 349—352. (Omelyanchuk L. V., Semeshin V. F., Alekseeva A. L., Pal'chikova I. G., Zhimulev I. F. 2010. Integral method for measuring the quantity of cellular DNA content by digital microphotography. Cell Tissue Biol. 4 : 305—308.)

Пантелеев В. Г., Егорова О. В., Клыкова Е. И. 2005. Компьютерная микроскопия. М.: Техносфера. 304 с. (*Panteley-ev V. G., Egorova O. V., Klykova E. I. 2005.* Computer microscopy. M.: Technosphere. 304 p.) Свифт Х. 1969. Аналитическая микроскопия биологических объектов. В кн.: Введение в количественную цитохимию. М.: Мир. 23—52. (*Swift H. 1966*. Analytical microscopy of biological materials. In: Introduction to quantitative cytochemistry. Wied G. (Ed.). New York; London: Acad. Press. 1—39.)

Ташкэ К. 1980. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию. Будапешт. 191 с. (*Tasca C. 1980.* Introduction to quantitative cyto-histological morphology. Budapest. 191 р.)

Черток В. М., Старцева М. С., Коцюба А. Е. 2012. Применение пиксельного метода в количественной оценке результатов гистохимических исследований. Морфология. 142 (5): 71—75. (Chertok V. M., Startseva M. S. Kotsyuba A. Ye. 2012. The application of a «pixel method» for the quantitative assessment of the results of the histochemical studies. Morphology. 142 (5): 71—75.)

Штейн Г. И. 2002. Влияние шумов анализаторов изображений при исследовании текстуры клеток. Цитология. 44 (1) : 102—106. (*Stein G. I. 2002*. The influence of image analyser noises on the image quality in studies of cell texture features. Tsitologiya. 44 (1) : 102—106.)

Штейн Г. И., Пантелеев В. Г., Поваркова А. В., Кудрявцев Б. Н. 1998. Возможности анализатора изображений «Видеотест» для проведения микрофотометрических исследований в цитологии. Цитология. 40 (10): 913—916. (Stein G. I., Panteleyev V. G., Povarkova A. V., Kudryavtsev B. N. 1998. Capacities of image analyzer «Videotest» for microphotometric investigations in cytology. Tsitologiya. 40 (10): 913—916.)

Altman F. P. 1975. Quantitation in histochemistry — review of some commercially available microdensitometers. Histochem. J. 7 : 375—395.

Böcking A., Nguyen V. Q. H. 2004. Diagnostic and prognostic use of DNA image cytometry in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma. Cancer Cytopathol. 102 : 41–54.

Chieco P., Jonker A., De Boer B. A., Ruijter J. A., Van Noorden C. 2013. Image cytometry: protocols for 2D and 3D quantification in microscopic images. Progress Histochem. Cytochem. 47 : 211–333.

Chieco P., Jonker A., Melchiorri C., Vanni G., Van Noorden C. 1994. A user's guide for avoiding errors in absorbance image cytometry: a review with original experimental observations. Histochem. J. 26 : 1–19.

Goldstein D. J. 1981. Errors in microdensitometry. Histochem. J. 13 : 251—267.

Hardie D., Gregory T. R., Hebert P. 2002. From pixels to picograms: a Beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. J. Histochem. Cytochem. 50 : 735–749.

Haroske G., Giroud F., Reith A., Bocking A. 1998. Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. Anal. Cell. Pathol. 17 : 189–200.

Kindermann D., Hilgers C. H. 1994. Glare-correction in DNA image cytometry. Anal. Cell. Pathol. 6 : 165–180.

Pawley J. B. 2006. Points, pixels, and gray levels: digitizing image data. In: Handbook of biological confocal microscopy. New York: Springer. 59—79.

Shapiro G. M. 2004. The evolution of cytometers. Cytometry. 58A : 13—20.

Wegerhoff R., Weidlich O., Kassens M. 2006. Basics of light microscopy and imaging. Imaging and Microscopy. Special Edition. 52 p.

Поступила 18 XI 2015

METHODOLOGICAL PROBLEMS OF DIGITAL CYTOPHOTOMETRY

G. I. Shtein,¹ V. G. Panteleyev, B. N. Kudryavtsev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg ¹ e-mail: spbgistn@mail.ru

The article discusses the advantages and disadvantages of absorption cytophotometry and basic errors of method. We examined the structure of modern equipment for cytophotometry studies with using of digital technologies. In order to increase the accuracy of measurements it is offered some methods for determining glare, dark current, non-uniformity of background and taking into account other digital cytophotometry errors. The possibility of universal and specialized software for cytophotometry is discussed.

Key words: cytophotometry, optical density, the digital image.