

DOI: 10.7868/S0041377118090047

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ МИКРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

© Г. И. Штейн,* Б. Н. Кудрявцев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

** электронный адрес: spbgistn@mail.ru*

Рассматриваются особенности применения лазерных сканирующих конфокальных микроскопов для микрофлуориметрии клеток и их структур. Обсуждается влияние основных параметров этих микроскопов на результаты измерений. Даются рекомендации по уменьшению ошибок измерений, связанных с нестабильностью лазерного излучения, неравномерностью освещенности поля сканирования и изменением усиления фотоприемников. Приводится подробный протокол измерений и расчета поправок для лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5. Протокол может быть использован и для других типов конфокальных микроскопов.

Ключевые слова: клетка, конфокальная микроскопия, микрофлуориметрия, яркость изображения

Принятые сокращения: АОФ — акустооптический фильтр, ЛСКМ — лазерный сканирующий конфокальный микроскоп, МФМ — микрофлуориметрия, ФЭУ — фотоэлектронный умножитель.

Микрофлуориметрия (МФМ) — один из современных прецизионных микроскопических методов, применяемых в клеточной биологии (Кудрявцев, Розанов, 1974; Taylor, Salmon, 1989; Waters, Wittmann, 2014). Измерение интенсивности собственной флуоресценции исследуемых клеточных структур или флуоресцентного красителя, связанного с ними, позволяет определить содержание в них вещества с высокой точностью. Предельное количество ДНК в отдельных хромосомах, которое может быть измерено методом МФМ, достигает $5 \cdot 10^{-15}$ г (Агафонова и др., 2013). Аппаратура и методики МФМ постоянно развиваются и совершенствуются. Современные микрофлуориметры на базе классического (широкопольного) флуоресцентного микроскопа, использующие в качестве фотоприемников цифровые камеры и осуществляющие цифровую обработку изображений, позволяют проводить многопараметрический анализ, при котором определяются не только фотометрические, но также морфометрические и текстурные параметры клеток или их органелл (Пантелеев и др., 2005).

Однако при исследовании многокомпонентных (например, клетки на срезе ткани) или вложенных (например, ядра в цитоплазме клеток) цитологических объектов возникает проблема точного отделения флуоресценции исследуемого объекта от флуоресценции других окружающих его объектов. Несмотря на то что объекты, расположенные выше и ниже исследуемого объекта, могут быть не видны в микроскопе, световой поток от них попадает на фотоприемник в виде рассеянного света и может приводить к серьезным ошибкам при измерениях интенсивности флуоресценции.

Для устранения внефокусных световых потоков была разработана конфокальная микроскопия (Shaw, 1999; Pawley, 2006), позволяющая получать изображение с тонкого слоя препарата (аксиальная разрешающая способность до 0.5 мкм). Поскольку в современных лазерных сканирующих конфокальных микроскопах (ЛСКМ) также используется явление флуоресценции, они могут быть применены для МФМ сложных объектов (Bensley et al., 2016).

В процессе сканирования препарата информация в конфокальном микроскопе претерпевает ряд преобразований: флуоресцентное излучение от исследуемого объекта преобразуется на фотоприемнике ЛСКМ в аналоговый электрический сигнал, затем аналого-цифровой преобразователь (АЦП) трансформирует его в цифровой сигнал, который поступает в компьютер и может быть выведен на монитор в виде изображения. Поэтому в зависимости от этапа преобразования информационный сигнал можно характеризовать интенсивностью флуоресценции, амплитудой, цифровым уровнем или яркостью изображения (Штейн и др., 2016). Для проведения количественных измерений зависимость между этими параметрами должна быть пропорциональной. Однако как прибор, так и особенности объекта исследования, методы приготовления препарата (в частности, его окрашивание) могут вносить случайные или систематические отклонения от пропорциональности (Кудрявцев, Розанов, 1974).

МФМ с использованием ЛСКМ имеет свои специфические особенности. Эти особенности связаны прежде всего с большим числом параметров ЛСКМ, влияющих на результаты измерений. Помимо параметров базового

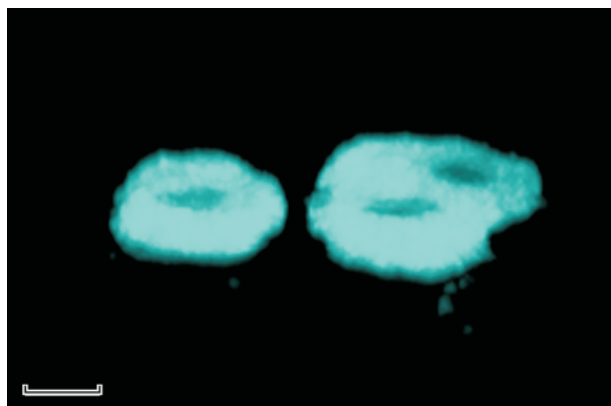


Рис. 1. 3D-изображение изолированных гепатоцитов крысы, окрашенных аурамин- SO_2 для выявления гликогена с помощью PAS-реакции.

ЛСКМ Leica TCS SP5. Об. $40\times/1.25$. Лазер 405 нм. Масштабный отрезок — 5 мкм.

флуоресцентного микроскопа, источника света и фотоприемника на результат измерений оказывают влияние также и параметры сканера. Кроме того, в ЛСКМ в отличие от обычного флуоресцентного микроскопа толщина слоя («оптического среза»), с которого регистрируется сигнал, как правило, значительно меньше толщины исследуемого объекта (рис. 1). Цель настоящей работы — рассмотреть влияние параметров ЛСКМ на результаты измерений, а также предложить способы учета указанных особенностей с целью повышения точности МФМ.

Параметры ЛСКМ, влияющие на результаты МФМ

Одним из основных параметров, которые измеряются в клетках с помощью флуоресцентной МФМ, является содержание какого-либо вещества. Мерой содержания вещества служит интегральная яркость изображения исследуемого объекта, которая определяется как сумма яркостей всех элементов (пикселей) его цифрового изо-

бражения. Поэтому на конечный результат измерения влияют также и параметры цифрового изображения, а именно формат, размеры пикселя и разрядность цифрового сигнала.

В результате число параметров ЛСКМ, влияющих на интегральную яркость, может достигать 20. Для упрощения настройки прибора они записываются в отдельный файл одновременно с изображением и могут быть при необходимости восстановлены. Тем не менее от правильного выбора величин многих параметров зависит точность измерения. В таблице приведены зависимости яркости изображения от основных параметров ЛСКМ, а далее дается анализ степени их влияния на результаты измерений.

Параметры объектива. Объектив является основным оптическим узлом любого, в том числе и конфокального, микроскопа. Поэтому выбор объектива является важным этапом настройки прибора. Как видно из данных таблицы, интенсивность флуоресценции наиболее сильно зависит от апертуры объектива (при эпиеосвещении — в четвертой степени), но также и от увеличения. Например, интенсивность флуоресценции с объективом $63\times/1.4$ будет составлять 63 % от интенсивности с объективом $40\times/1.25$. Другие параметры объектива (спектральные характеристики, aberrации) также влияют на получаемое изображение (Егорова, 2006). Применение объектива, дающего максимальную яркость изображения, позволяет снизить интенсивность возбуждающего освещения и, следовательно, уменьшить фотообесцвечивание препарата, а также уменьшить усиление фотоприемника, что ведет к уменьшению флуктуаций полезного сигнала (шумов).

Мощность лазерного излучения. В современных ЛСКМ мощность лазерного излучения, попадающего на препарат, регулируется акустооптическими фильтрами (АОФ). Однако расчетные величины пропускания АОФ, устанавливаемые на программной панели управления, могут не совпадать с реальными из-за нелинейности пропускания АОФ (рис. 2). Видно, что линейная область находится в диапазоне 30—70 %. Эту особенность АОФ следует учитывать при настройке ЛСКМ.

Диаметр конфокальной диафрагмы. Наиболее существенным отличием ЛСКМ от обычного (широ-

Зависимость яркости изображения ЛСКМ от его основных параметров

Параметр ЛСКМ	Характер зависимости	Литературный источник
Апертура (A) и увеличение объектива (M)	$\sim A^4/M^2$	Taylor, Salmon, 1989
Мощность лазерного излучения (Laser power)	Линейная (в диапазоне пропускания АОФ 30—70 %)	Рис. 2
Диаметр конфокальной диафрагмы (Pinhole)	Линейная (при толщине объекта \gg толщины слоя)	Wilhelm et al., 2003
Напряжение на фотоприемнике (усиление, Gain)	\approx Экспоненциальная (для ФЭУ)	Рис. 4
Смещение нулевого уровня сигнала (Offset)	\approx Линейная ^a	
Скорость сканирования (Speed)	То же	Штейн, 2007
Формат изображения (Format)	» »	То же
Изменение размеров поля сканирования (zoom)	» »	» »
Спектральный диапазон фотоприемника	Зависит также от спектра используемого флуорохрома ^a	

Примечание. ^a Пояснения даны в тексте статьи.

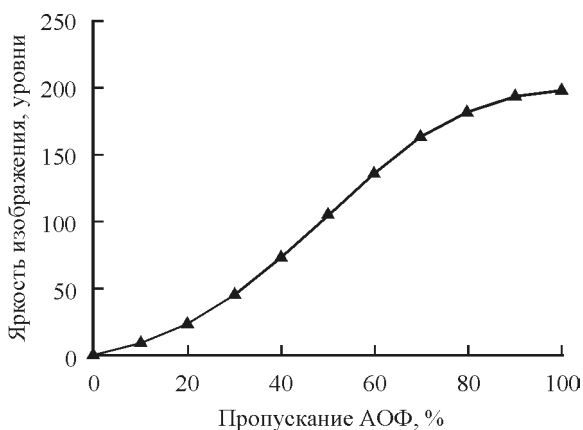


Рис. 2. Зависимость яркости изображения от расчетного пропускания акустооптического фильтра (АОФ).

ЛСКМ Leica TCS SP5. Детектор проходящего света. Лазер 543 нм.

копольного — widefield) микроскопа является наличие конфокальной диафрагмы, повышающей разрешающую способность, особенно в аксиальном направлении (по оси Z), посредством уменьшения толщины слоя, с которого оптический сигнал поступает на фотоприемник для формирования изображения. Чем меньше толщина, тем выше разрешение, но тем меньше полезный сигнал. Однако при МФМ толщина слоя, наоборот, должна соответствовать толщине объекта измерения, чтобы зарегистрировать флуоресценцию со всего объекта, но в то же время отсеять выше- и нижележащие структуры. Поэтому существуют два способа измерения — установить необходимую толщину слоя (т. е. диаметр конфокальной диафрагмы) или применить послойное сканирование по оси Z с последующим суммированием слоев.

Толщина слоя, с которого оптический сигнал поступает на фотоприемник, линейно зависит от диаметра конфокальной диафрагмы (Wilhelm et al., 2003) и во многих приборах дается как справочный параметр (Zeiss LSM, Leica TCS). При отсутствии такой информации связь диаметра конфокальной диафрагмы с толщиной слоя можно определить экспериментально. На рис. 3 приведена зависимость интегральной яркости изображения гепатоцита

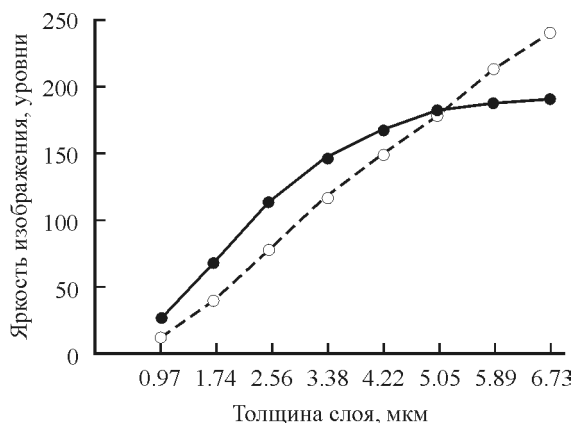


Рис. 3. Зависимость яркости изображения от толщины слоя сканирования, с которого регистрируется флуоресценция объекта.

ЛСКМ Leica TCS SP5. Об. $40\times/1.25$. Лазер 405 нм. Сплошная линия — гепатоцит (рис. 1), штриховая — тест-объект (стекло ЖС19, толщина 3 мм).

крысы, окрашенного на гликоген (см. рис. 1), от толщины слоя, устанавливаемого диаметром конфокальной диафрагмы. Видно, что при толщине слоя больше 5 мкм интегральная яркость практически перестает увеличиваться, что указывает на достижение оптимальной толщины слоя, соответствующего толщине гепатоцита. Для сравнения приведена зависимость яркости изображения от толщины слоя для флуоресцирующего стекла марки ЖС19 большой толщины (3 мм). Толщина слоя также зависит от апертуры объектива: чем больше апертура, тем меньше толщина слоя. Например, в ЛСКМ Leica TCS SP5 с объективом $40\times/1.25$ толщина слоя при максимальном диаметре конфокальной диафрагмы составляет 6.3 мкм, а с объективом $20\times/0.7$ — 22 мкм.

При МФМ «толстых» объектов, если с помощью конфокальной диафрагмы невозможно установить необходимую толщину слоя, применяется послойное сканирование с последующим суммированием слоев. Для этого можно воспользоваться функцией AVERAGE, с помощью которой можно вычислить среднюю яркость каждого пикселя по всем слоям. Такая функция имеется, например, в конфокальном микроскопе Leica TCS SP5. Поэтому после измерения интегральной яркости выбранного объекта (путем интерактивного выделения) результат необходимо умножить на число просканированных слоев.

Смещение нулевого уровня сигнала. Регулировка этого параметра позволяет установить пороговый уровень сигнала, ниже которого он не регистрируется при формировании изображения. Это позволяет «отсеять» фоновый уровень сигнала, возникающий из-за флуоресценции заключающей среды и иммерсионного масла, темнового тока фотоприемника и других источников. Ошибка МФМ в этом случае может быть уменьшена. Однако полезный сигнал при увеличении параметра «Offset» уменьшается, что приводит к необходимости увеличивать усиление фотоприемника.

Формат изображения. Этот параметр определяет число элементов изображения (пикселей) по горизонтали и вертикали, на которые оно разбивается при сканировании и регистрации. Теоретически при уменьшении формата яркость изображения должна возрастать, так как увеличивается время воздействия лазерного луча на препарат и время регистрации флуоресценции.

Необходимо отметить, что в различных моделях ЛСКМ при изменении некоторых параметров сканера (формата, увеличения, скорости) яркость изображения может не изменяться благодаря программно-аппаратной коррекции (Штейн, 2007).

Изменение размеров поля сканирования. Если изменять физические размеры поля сканирования, не меняя формата, то при этом меняются общее увеличение и размер пикселя, поскольку изображение выводится в тот же размер окна монитора. Чем меньше область сканирования, тем меньше размер пикселя и больше увеличение. Соответственно меняется и плотность мощности излучения лазера на объекте исследования, интенсивность флуоресценции увеличивается, соответственно возрастает и яркость изображения.

Время и скорость сканирования. Время сканирования одного поля зависит от частоты сканирования (линий в секунду) и от формата кадра. Чем больше формат (т. е. число элементов изображения — пикселей), тем оно больше. Важным параметром является также время позиционирования луча на одном пикселе, которое также

определяется частотой сканирования и форматом кадра. От времени позиционирования луча на пикселе зависят энергия лазерного луча, попадающая на препарат, и следовательно, конечная яркость изображения.

Спектральный диапазон фотоприемника. В современных ЛСКМ (например, Zeiss LSM800, Leica TCS SP5, Olympus FV3000) ширина спектрального диапазона принимаемого излучения может плавно регулироваться. Перед фотоприемником находятся призма или дифракционная решетка, а также регулируемая щелевая диафрагма для выделения необходимого участка спектра. Яркость изображения будет зависеть как от спектра испускания флуорохрома, так и от ширины и положения диафрагмы.

Уменьшение ошибок МФМ

Поскольку интенсивность флуоресценции исследуемых объектов зависит от многих параметров ЛСКМ (характеристик объектива, пропускания АОФ, мощности лазера, параметров сканера, диаметра конфокальной диафрагмы, усиления фотоприемника и др.), измерения необходимо производить при постоянных выбранных значениях этих параметров и сохранять их в специальном файле настроек. Тем не менее иногда в процессе измерений приходится изменять отдельные параметры, например усиление фотоприемника. Кроме того, некоторые параметры (например, выходная мощность лазера) оказываются нестабильными во времени. Поэтому ниже мы рассмотрим способы уменьшения ошибок МФМ в случае изменения таких параметров.

Калибровка усиления фотоприемника. Величина усиления фотоприемника (ФЭУ) является одним из основных параметров, влияющих на яркость изображения. Для того чтобы в ходе измерений уровень яркости исследуемых объектов не превысил максимально возможного, обычно производится предварительный просмотр препарата. Цель просмотра — найти наиболее яркий объект и, полагая, что все остальные объекты на препарате будут ниже его по яркости, установить соответствующий коэффициент усиления (или напряжение) ФЭУ. Для облегчения этой операции в программном обеспечении всех приборов существует функция (Hi-Lo), с помощью которой на изображении отмечаются (например, красным цветом) пиксели, в которых превышен максимально возможный уровень яркости.

Однако иногда, уже после начала измерений, все же может обнаружиться объект, уровень яркости которого превышает максимально возможный, и усиление ФЭУ приходится уменьшать. В таком случае возникает ситуация, когда предыдущие измерения невозможно сравнить с текущими и все они оказываются ошибочными. Для исключения подобной ситуации до начала основных измерений необходимо провести градуировку усиления фотоприемника. На рис. 4 приведена кривая усиления ФЭУ в зависимости от напряжения на нем. Исходя из этой кривой можно рассчитать поправочный коэффициент для результатов измерений в случае изменения напряжения на ФЭУ (см. «Приложение»).

Поправка на нестабильность лазеров. Поскольку интенсивность флуоресценции зависит от интенсивности возбуждения, нестабильность мощности лазерного излучения может быть одной из основных случайных ошибок МФМ (Zucker, Price, 2001). Газовые лазеры

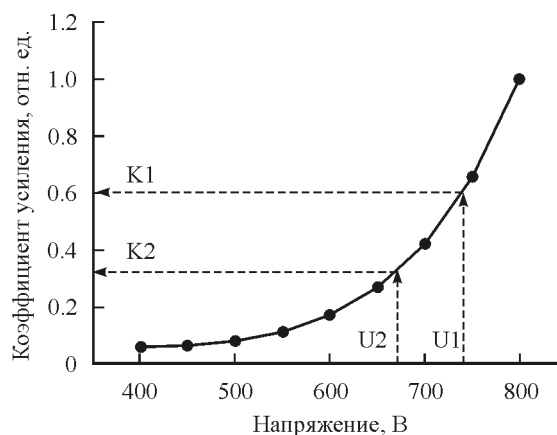


Рис. 4. Зависимость усиления фотоприемника (ФЭУ) от напряжения.

ЛСКМ Leica TCS SP5. Коэффициент усиления при напряжении 800 В принят за 1. U_1 и K_1 — напряжение на ФЭУ и соответствующий ему коэффициент усиления в начале измерений, U_2 и K_2 — измененное напряжение на ФЭУ и соответствующий ему коэффициент усиления.

обладают долговременной нестабильностью, весьма существенной, например у аргонового лазера, а диодные и твердотельные лазеры с диодной накачкой обладают кратковременной (высокочастотной) нестабильностью, которая проявляется в виде шумов на изображении. Нестабильность возбуждающего излучения зависит также от оптоволоконного кабеля, АОФ и от неправильной юстировки (Zucker, Price, 2001). При вычислении интегральной яркости кратковременная нестабильность оказывает значительно меньшее влияние, чем медленно меняющаяся нестабильность. На рис. 5 приведено изменение выходной оптической мощности аргонового лазера после включения. Видно, что стабилизация мощности происходит в течение 15–30 мин после включения в зависимости от потребляемой электрической мощности. Однако и после этого мощность может быть нестабильной, а величина изменений в значительной степени зависит от типа лазера, срока его службы и даже от индивидуальных особенностей лазера. Поэтому результаты измерений при изменении мощности лазера необходимо корректировать.

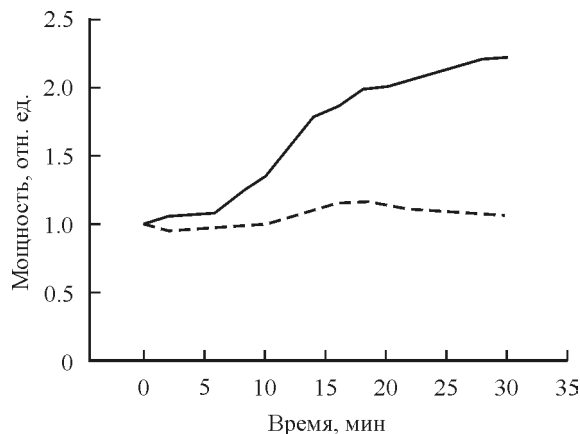


Рис. 5. Изменение оптической мощности аргонового лазера LGK 7812 (Lasos, Германия) после его включения при максимальной (сплошная линия) и минимальной (штриховая) потребляемой электрической мощности.

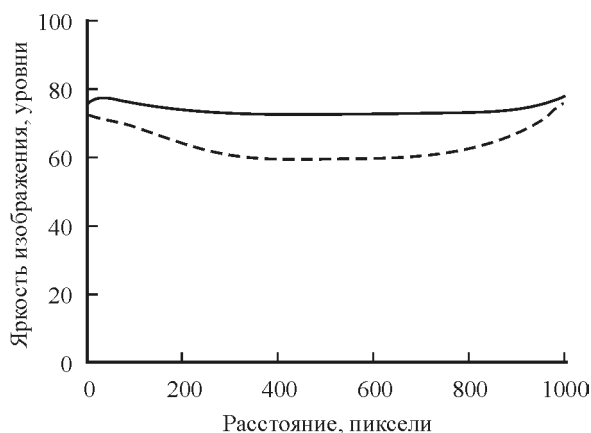


Рис. 6. Равномерность освещенности поля сканирования по координате X.

ЛСКМ Leica TCS SP5. Об. 40×/1.25. Лазер 405 нм. Тест-объект (стекло ЖС19, толщина 3 мм). Сплошная линия — скорость сканирования 100 линий/с, zoom 4; штриховая — скорость сканирования 400 линий/с, zoom 1.

Одним из способов такой корректировки является применение детектора проходящего света (если он имеется в комплектации прибора), который позволяет регистрировать интенсивность светового потока лазерного излучения, прошедшего через препарат. Изменение средней яркости изображения, получаемого с детектора проходящего света, указывает на изменение мощности лазерного излучения и дает возможность определить поправочный коэффициент при дальнейших расчетах интенсивности флуоресценции объекта исследования (см. «Приложение»).

Корректировка неравномерности освещенности. Неравномерность освещенности поля сканирования приводит к изменению интенсивности флуоресценции объектов, находящихся в разных частях поля. Неравномерность освещенности существует в той или иной степени в любом микроскопе. Она может возникать из-за аберраций осветительной оптической системы и объектива. Объективы с плоским полем (план-объективы), которые работают в режиме эпи-освещения, дают более равномерную освещенность по сравнению с другими типами объективов (Егорова, 2006). Воздействие кривизны поля объектива проявляется наиболее сильно при сканировании относительно тонких препаратов, например монослоя клеток, где ядра, окрашенные на ДНК, расположенные на краю поля сканирования, будут светиться слабее, чем в центре, хотя содержание ДНК в них может быть одинаковым.

В ЛСКМ неравномерность освещенности происходит также из-за особенностей системы сканирования, возникающих из-за колебательного движения зеркал развертки луча. В современных ЛСКМ эта проблема частично нивелируется с помощью программно-аппаратной корректировки, а также с применением специальных оптических схем сканера (например, в Zeiss LSM 800 и Leica TCS SP8). Неравномерность освещенности может быть вызвана и другими причинами, например неточностями юстировки прибора. Чтобы снизить ошибки измерения из-за неравномерности освещения поля зрения используются тест-объекты с равномерно распределенным флуорохромом, например стекло марки ЖС19, специальные пластиковые слайды фирмы Chroma Technology, флуоресцирующие в разных областях спектра, или самостоятельно изготовленные препараты с тонким слоем раствора флуоро-

хрома. В программном обеспечении ЛСКМ LSM 800 имеется функция Shading correction, предназначенная для корректировки неравномерности освещенности поля сканирования. Можно воспользоваться также программой ImageJ (версия 1.51), в которой имеется Calculator Plus. Корректировка изображения в этом случае производится по формуле (Model, Burkhardt, 2001; Jonkman et al., 2014):

$$I'(x,y) = I(x,y) / I_T(x,y) \cdot A_T,$$

где $I'(x,y)$ — скорректированное изображение, $I(x,y)$ — исходное изображение, $I_T(x,y)$ — изображение эталонного тест-объекта, A_T — средняя яркость тест-объекта.

Улучшить равномерность освещенности могут также уменьшение скорости сканирования и увеличение zoom (рис. 6).

Заключение

Как указывалось выше, несмотря на большое количество параметров ЛСКМ, влияющих на результаты МФМ, большинство из них можно зафиксировать в специальном файле настроек ЛСКМ. Параметры, используемые при регистрации цифрового изображения, запоминаются также вместе с ним (если изображение записывается в специальном формате файлов, особенном для каждого типа ЛСКМ) и могут быть восстановлены при последующих измерениях.

Способы учета большинства методических проблем при проведении МФМ на конфокальном микроскопе приведены нами в приложении. Но существуют и другие проблемы, характерные для всех типов микрофлуориметров, например проблемы приготовления и окраски препаратов, эффект внутреннего фильтра, фотообесцвечивание флуорохрома под воздействием возбуждающего света и др. (Vicente et al., 2007; Waters, Wittmann, 2014).

Выбор иммерсионного масла также представляет собой определенную методическую проблему, так как автофлуоресценция масла может привести к ошибкам МФМ. Необходимо учитывать, что разные марки масла обладают разным уровнем автофлуоресценции, особенно в «синей» области спектра. Несмотря на маркировку, содержащую надписи типа «нефлуоресцирующее», «fluorescence free», «low fluorescence» и т. д., масло требует предварительной проверки. По нашему опыту наилучшим иммерсионным маслом с этой точки зрения является масло 518F (Carl Zeiss).

Работа с цифровым изображением также вносит свои особенности. Например, существуют проблемы выделения на изображении объектов измерения, разделении близкорасположенных и наложенных объектов (Агафонов и др., 2013; Штейн и др., 2016).

Проведение МФМ с помощью ЛСКМ вполне оправданно в случае исследования многослойных или вложенных объектов, а также при проведении многопараметрических измерений. Использование протокола (см. «Приложение») поможет снизить ошибки измерений. В некоторых случаях (например, тонкий слой клеток, использование одного флуорохрома) применение микрофлуориметра на базе широкопольного флуоресцентного микроскопа, снабженного современной цифровой видеосистемой и программой обработки изображений (анализатор изображений) может быть более предпочтительным, так как такой прибор проще в эксплуатации и имеет меньшую стоимость.

Работа выполнена при финансовой поддержке по государственному заданию № 0124-2018-0003.

Приложение Протокол измерения интенсивности флуоресценции на ЛСКМ Leica TCS SP5

А. Калибровка усиления ФЭУ

1. Использовать в качестве тест-объекта стекло ЖС19 или пластиковый слайд Chroma.

2. При отсутствии лазерного излучения установить Offset, при котором средняя яркость изображения была бы близка к нулю.

3. Получить изображение тест-объекта в приемном канале калибруемого ФЭУ при напряжении 800—1000 В. Затем посредством настройки мощности лазера, диаметра конфокальной диафрагмы или смены объектива получить максимально возможный (но не предельный) уровень яркости.

4. Уменьшая напряжение, получить серию изображений тест-объекта.

5. Используя программу ЛСКМ или ImageJ, измерить среднюю яркость изображений (Average).

6. Построить график зависимости средней яркости от напряжения (рис. 4). Она будет характеризовать относительный коэффициент усиления и использоваться для введения поправочного коэффициента в расчет интенсивности флуоресценции, в случае если в процессе измерения потребуется изменить напряжение на ФЭУ.

Б. Регистрация интенсивности флуоресценции

1. В режиме сканирования XYZ настроить ЛСКМ для получения изображения исследуемых объектов.

2. В режиме сканирования XZY измерить толщину объекта. Установить такой диаметр конфокальной диафрагмы, чтобы толщина оптического слоя была больше толщины объектов измерения. Если максимальная толщина слоя меньше толщины объекта, перейти на объектив с меньшей апертурой (а следовательно, с большей толщиной слоя).

3. Использовать фотоприемник проходящего света для получения опорного изображения, необходимого для контроля мощности лазерного излучения.

4. Сохранить настройки и не менять их в процессе последующих измерений (за исключением обнаружения объектов с яркостью, превышающей предельно допустимый уровень по цветовой шкале Hi-Lo). В этом случае уменьшить усиление ФЭУ (раздел А).

5. Получить изображения исследуемых объектов и опорных изображений, сохранить их для последующих расчетов.

В. Оценка неравномерности освещенности поля сканирования

1. В режиме сканирования XYZ настроить ЛСКМ для получения изображения тест-объекта (стекло ЖС19 или пластиковый слайд фирмы Chroma). Использовать настройки раздела Б (за исключением Gain).

2. Используя программу ЛСКМ или ImageJ, применить медианный фильтр для уменьшения влияния шумов и мелких неоднородностей тест-объекта (ImageJ/Process/Filters/Median). Получить профиль яркости изображения по оси X (ImageJ/Analyze/PlotProfile). Измерить неравномерность освещенности. Если она превышает 5 %, сохранить изображение тест-объекта для процедуры коррекции неравномерности освещенности (см. раздел Г).

Г. Расчет интенсивности флуоресценции

1. В программе ImageJ (ImageJ/Process/CalculatorPlus/Divide) произвести коррекцию неравномерности освещенности поля сканирования, для чего с каждым изображением, содержащим объекты измерения, произвести операцию коррекции:

$$I'(x,y) = I(x,y)/I_T(x,y) \cdot A_T,$$

где $I'(x,y)$ — скорректированное изображение, $I(x,y)$ — исходное изображение, $I_T(x,y)$ — изображение эталонного тест-объекта, A_T — средняя яркость тест-объекта (см. раздел Б).

2. В программе ImageJ (ImageJ/Analyze/Measure) измерить интегральную яркость объектов (Integrated Density) на каждом изображении, предварительно выделив объекты обводкой вручную по контуру или используя установку уровня яркости. Эта величина будет характеризовать интенсивность флуоресценции объекта.

3. Измерить среднюю яркость изображений канала проходящего света (L), соответствующих изображениям объектов.

4. Результаты измерений перенести в какую-либо статистическую программу, например в Excel.

5. Сделать поправку на колебание мощности лазерного излучения. Скорректированная интенсивность флуоресценции каждого объекта вычисляется по формуле

$$I' = I \cdot L_1/L_n,$$

где I — измеренная интенсивность, L_1 — средняя яркость первого изображения канала проходящего света, L_n — средняя яркость последующих изображений канала проходящего света.

6. Сделать поправку на изменение усиления ФЭУ (если оно изменялось; см. раздел А). Скорректированная интенсивность флуоресценции каждого объекта, принадлежащего изображению с измененным усилением, вычисляется по формуле

$$I' = I \cdot K_1/K_2,$$

где I — измеренная интенсивность после коррекции в п. 5, K_1 — коэффициент усиления при напряжении U_1 , K_2 — коэффициент усиления при напряжении U_2 (рис. 4).

Список литературы

Агафонова Н. А., Сакута Г. А., Розанов Ю. М., Штейн Г. И., Кудрявцев Б. Н. 2013. Микрофлуориметрия содержания ДНК в индивидуальных хромосомах человека с помощью анализатора изображений. Цитология. 55 (5) : 338—347. (Agafonova N. A., Sakuta G. A., Rozanov Yu. M., Shtein G. I., Kudryavtsev B. N. 2013. DNA image-fluorometry of individual human chromosomes. Tsitologiya. 55 (5) : 338—347.)

Егорова О. В. 2006. С микроскопом на «ты». Шаг в XXI век. Световые микроскопы для биологии и медицины. М. Репроцентр-М. 416 с. (Egorova O. V. 2006. With a microscope on «you». Step to XXI century. Moscow: Reprocenter-M. 416 p.)

Кудрявцев Б. Н., Розанов Ю. М. 1974. Цитофлуориметрия. Общие принципы. В кн.: Методы биологии развития. М.: Наука. 497—500. (Kudryavtsev B. N., Rozanov Yu. M. 1974. Cytofluorimetry. Main Principles. In: Methods of biology of development. Moscow: Nauka. 497—500.)

Пантелеев В. Г., Егорова О. В., Клыкова Е. И. 2005. Компьютерная микроскопия. М.: Техносфера. 304 с. (Panteleyev V. G., Egorova O. V., Klykova E. I. 2005. Computer microscopy. Moscow: Technosphere. 304 p.)

Штейн Г. И. 2007. Руководство по конфокальной микроскопии. СПб.: Изд-во СПбГПУ. 77 с. (Shtein G. I. 2007. Manual to confocal microscopy. St. Petersburg: Publ. SPbSPU. 77 p.)

Штейн Г. И., Пантелеев В. Г., Кудрявцев Б. Н. 2016. Методические проблемы цифровой цитофотометрии. Цитология. 58 (3) : 234—242. (Shtein G. I., Panteleyev V. G., Kudryavtsev B. N. 2016. Methodological problems of digital cytophotometry. Tsitologiya. 58 (3) : 234—242.)

Bensley J. G., De Matteo R., Harding R., Black M. J. 2016. Three-dimensional direct measurement of cardiomyocyte volume, nuclearity, and ploidy in thick histological sections. Sci. Rep. 6 (23756) : 1—10.

Jonkman J., Brown C., Cole R. 2014. Quantitative confocal microscopy: beyond a pretty picture. Meth. Cell Biol. 123 : 113—134.

Model A., Burkhardt J. 2001. A standard for calibration and shading correction of a fluorescence microscope. Cytometry. 44 : 509—516.

Pawley J. B. (Ed.). 2006. Handbook of biological confocal microscopy. 3rd ed. New York: Springer. 985 p.

Taylor D. L., Salmon E. D. 1989. Basic fluorescence microscopy. Meth. Cell Biol. 29 : 207—237.

Shaw P. J. 1999. Introduction to confocal microscopy. In: Light microscopy in biology. A practical approach. 2nd ed. (Ed. A. J. Lacey). New York: Oxford Univ. Press. 45—71.

Vicente N. B., Zamboni J. E. D., Adur J. F., Paravani E. V., Casco V. H. 2007. Photobleaching correction in fluorescence microscopy images. J. Phys. Confer. Ser. 90 (012068) : 1—8.

Walters J. C., Wittmann T. 2014. Concepts in quantitative fluorescence microscopy. Meth. Cell Biol. 123 : 113—134.

Wilhelm S., Grobler D., Gluch M., Heinz H. 2003. Confocal laser scanning microscopy. <http://zeiss-campus.fsu.edu/referencelibrary/pdfs/ZeissConfocalPrinciples.pdf>.

Zucker R. M., Price O. P. 2001. Evaluation of confocal microscopy system performance. Cytometry. 44 : 273—294.

Поступила 25 V 2018

USE OF CONFOCAL MICROSCOPY FOR MICROFLUORIMETRIC RESEARCH IN CELL BIOLOGY

G. I. Shtein,* B. N. Kudryavtsev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

* e-mail: spbgistn@mail.ru

Features of the use of laser scanning confocal microscopes for microfluorimetry of cells and their structures are considered. The influence of the main parameters of these microscopes on the results of measurements is discussed. Recommendations are given to reduce measurement errors associated with instability of laser radiation, uneven illumination of the scanning field, and a change in the gain of the photodetectors. A detailed protocol of measurement and calculation of corrections for the laser scanning confocal microscope Leica TCS SP5 is given. The protocol can be used for other types of confocal microscopes.

Key words: cell, confocal microscopy, microfluorimetry, image brightness