

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ЦИФРОВОЙ МИКРОФЛУОРИМЕТРИИ

© 2019 г. Г. И. Штейн¹, *, А. Я. Гудкова², Б. Н. Кудрявцев¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022 Россия

*E-mail: spbgistn@mail.ru

Поступила в редакцию 25.04.2019 г.

После доработки 20.05.2019 г.

Принята к публикации 20.05.2019 г.

В работе обсуждаются основные принципы цифровой микрофлуориметрии, рассматривается состав современной аппаратуры для микрофлуориметрических исследований с применением цифровых технологий, а также основные ошибки цифровой микрофлуориметрии. С целью увеличения точности измерений предложены способы коррекции неравномерности освещения, нестабильности источников света, фотообесцвечивания флуорохрома, темнового тока фотоприемника, учета других ошибок цифровой микрофлуориметрии.

Ключевые слова: микроскоп, микрофлуориметрия, флуоресценция, цифровое изображение

DOI: 10.1134/S0041377119080066

Цифровые технологии прочно вошли в практику научных исследований. Современная световая микроскопия также основана на использовании цифровых видеосистем и компьютерной техники. Анализаторы микроизображений, 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; Штейн и др., 2016).

В анализаторе микроизображений преобразование изображения в цифровую форму происходит на каждом элементе фотодиодной матрицы цифровой камеры, т.е. изображение разбивается на элементы – пиксели (picture cells), а аналоговый электрический сигнал от каждого элемента матрицы преобразуется в дискретные уровни яркости. Таким образом, процесс преобразования информации об объекте проходит несколько этапов: сначала свет от объекта преобразуется в аналоговый электрический сигнал, затем он преобразуется в цифровой сигнал, который поступает в компьютер для обработки, после чего изображение выводится на экран монитора. Поэтому, в зависимости от этапа преобразования, информационный сигнал можно характеризовать интенсивностью светового потока, амплитудой, цифро-

вым уровнем или яркостью изображения (Штейн и др., 2016).

Микрофлуориметрия (МФМ) – один из прецизионных микроскопических методов, давно применяемых в клеточной биологии (Ruch, 1966; Розанов, Кудрявцев, 1967; Кудрявцев, Розанов, 1974; Tailor, Salmon, 1989; Лейси, 1992; Waters, Wittmann, 2014). Измерение интенсивности собственной флуоресценции (Lakowicz, 1999; Shaner, 2014) исследуемых клеточных структур или флуоресцентного красителя, связанного с ними, позволяет определить их состояние и содержащееся в них количество вещества с высокой точностью. Например, предельное количество ДНК в отдельных хромосомах, которое может быть измерено методом МФМ, достигает 5×10^{-15} г (Агафонова и др., 2013).

Современная МФМ также использует цифровые технологии, реализуемые в анализаторах микроизображений. Мерой содержания вещества в цифровой МФМ служит интегральная яркость изображения исследуемого объекта, которая определяется как сумма яркостей всех его пикселей.

Анализаторы микроизображений, которые могут использоваться для МФМ, выпускают многие фирмы, в частности, Olympus и Hamamatsu (Япония), Carl Zeiss и Leica-Microsystems (Германия), Andor Technology (Великобритания) и другие. Разработаны многочисленные коммерческие программы обработки изображений, например: ZEN (Carl Zeiss, Германия), ImagePro (Media Cybernetics, США), Huygens (SVI, Нидерланды), HCSImage (Hamamatsu, Япония), Видеотест-Морфология (ВидеоТест, Россия),

Принятые сокращения: АЦП – аналого-цифровой преобразователь, МФМ – микрофлуориметрия, ССD – charge-coupled device, CV – коэффициент вариации.