

УДК 53.086: 535.4: 57.086

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИИ РАССЕЯНИЯ ТОЧКИ В УСТАНОВКАХ КОМПЬЮТЕРНОЙ ЦИТОФОТОМЕТРИИ

И.Г. Пальчикова^{1,2}, Е.С. Смирнов¹

¹ФГБУН Конструкторско-технологический институт
научного приборостроения СО РАН

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет»

Предложен метод экспериментального определения функции рассеяния точки в установке компьютерной цитوفотометрии, основанный на обработке цифрового 16-битового изображения тест-объекта. Анализируются требования к цифровой камере и тест-объекту. Тестирование передаточной характеристики камеры выполняется с помощью аттестованного 9-ступенчатого ослабителя. Показано, что при комнатной температуре цифровая камера повышенной дигитализации позволяет регистрировать два кольца двумерной ФРТ оптической системы микроскопа на линейном участке передаточной характеристики камеры. Специализированные дифракционные микрообъекты «светящаяся точка» разработаны и изготовлены методами электронно-лучевой литографии в пленках хрома. Математическая обработка массива цифровых изображений микрообъектов позволяет восстанавливать ФРТ микрообъективов и строить как аксиальные, так и трансверсальные сечения каустик.

Ключевые слова: цифровое изображение, дигитализация, деконволюция, микроскоп, цитометрия.

DOI: 10.17212/1727-2769-2014-4-104-114

Введение

Современная элементная база фотоники составляет хорошую основу для количественных измерений микроскопных изображений и развития методов компьютерной цитوفотометрии [1]. Развитие цифровой фотографии и цифровых технологий обработки изображений создает новые возможности для исследований в области микроскопии. Современные цифровые фотокамеры [2] предлагают широкий диапазон различных настроек, обеспечивают хорошую пространственную детализацию изображений, характерный размер пикселя составляет ~4–6 мкм. Динамический диапазон аналого-цифрового преобразования изображения расширился до 16 битов. Шумовые сигналы контролируются и могут быть обработаны аппаратными средствами фотокамеры или внешними программными средствами. Все вышеперечисленное привело к тому, что погрешности измерений ДНК в клеточном ядре, окрашенном по Р. Фельгену, значимые в классических методах [3] цитوفотометрии, в современных компьютеризированных установках [4] становятся малыми. Вместе с тем существенный вклад в ошибку распределения начинает давать дифракция света [5] в процессе регистрации микроизображения, которая приводит к тому, что искажается распределение оптической плотности в цифровом изображении клеточного ядра. В результате дифракции света в микроскопе каждая точка предмета изображается в виде кружка рассеяния, а в хорошо корре-

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 12-08-00396-а.

гированных оптических системах – в виде кружка Эйри. Этот эффект наиболее сильно проявляется в изображении границы ядра, затрудняя процесс сегментации изображения. Оптическая система микроскопа традиционно рассматривается в рамках теории линейных систем [6], т. е. она характеризуется импульсным откликом – трехмерной функцией рассеяния точки (ФРТ), которая и используется при математическом описании влияния дифракции на качество изображения. Существующие алгоритмы и методы обработки цифровых изображений позволяют исключить эффект размытия границы путем выполнения операции деконволюции цифрового изображения с ФРТ изображающей оптической системы. Достоверность такой «реконструкции» предмета напрямую связана с точностью определения ФРТ.

Настоящая работа посвящена разработке метода экспериментального определения ФРТ в установках компьютерной цитофотометрии. Рассматривается фотометрический метод измерения ФРТ, анализируются требования к характеристикам цифровой камеры, тестовым объектам и приводятся результаты измерения ФРТ микроскопа.

1. Материалы и методы

Цитофотометрическая установка [1] состоит из микроскопа с набором микрообъективов; цифровой камеры со встроенным АЦП, фотоматрица которой помещается в плоскость промежуточного изображения или изображение строится на ней с помощью дополнительного объектива; компьютера для накопления и обработки данных и соответствующего программного обеспечения. На рис. 1 приведена фотография используемого микроскопа *DIALUX 20 EB (Leitz)*. Микроскоп оснащен галогенным осветителем (лампа 12 В, 50 Вт) и лазерной приставкой. Для получения качественного изображения в типичных задачах цитофотометрии обычно достаточно использовать безиммерсионный микрообъектив планахромат $40\times$, NA 0,5 и зеленый оптический светофильтр (540 нм). Точность цитофотометрических измерений зависит от стабильности характеристик освещения, а именно от стабильности яркости во времени в каждой точке картины и однородности освещения по полю зрения. Следующим фактором, влияющим на точность, являются выбор и оптимизация режимов работы камеры по отношению к динамическому диапазону микроскопного изображения.

Из всех известных методов освещения наиболее рациональным является метод Кёлера, который и используется в большинстве микроскопов. Стабильные неоднородности освещения могут быть при необходимости учтены в процессе обработки изображения путем нормировки на изображение поля в отсутствие предмета. Стабилизация мощности излучения лампы достигается применением стабилизированных источников питания. Обычно допустимым [4] считается двухпроцентный дрейф яркости источника в течение 8 часов.



Рис. 1 – Фотография микроскопа цитофотометрической установки

Fig. 1 – Photo of the microscope of cytophotometry setup

При тестировании камеры и во время эксперимента необходимо соблюдать равные условия освещения для препарата в каждой серии снимков и одинаковые режимы регистрации изображения.

В экспериментах для получения монохроматического освещения использовались интерференционные светофильтры с длиной волны 500, 600 и 650 нм в пике пропускания и с полушириной полосы пропускания 5 нм, устанавливаемые после галогенного осветителя микроскопа и конденсора. Изображение регистрировалось с помощью цифровой камеры *CANON EOS 500D*. Все расчеты производились с помощью компьютера и программных пакетов *EXCEL* и *MATHCAD*.

ФРТ – это распределение интенсивности света в изображении точечного самосветящегося предмета (монохроматического, в когерентном случае). Из этого определения вытекают несколько задач, которые необходимо решить в экспериментах. Во-первых, передаточная характеристика цифровой камеры должна быть линейной в требуемом динамическом диапазоне. Во-вторых, размер элементов фотоматрицы должен быть таким, чтобы ФРТ восстанавливалась из экспериментальных значений в пикселях с высокой степенью достоверности. В-третьих, предмет должен быть «точечным», т. е. он должен иметь размеры меньшие, чем предельно разрешимые с помощью исследуемого микрообъектива. Мы решили эту задачу путем разработки и изготовления специальных тестовых микрообъектов в пленках хрома.

2. Тестирование цифровой камеры

Мы выбрали, протестировали и определили оптимальные в эксперименте режимы цифровой камеры *CANON EOS 500D* с управлением через *USB*, которая удовлетворяет всем требованиям эксперимента: тип датчика – *CMOS*, размер матрицы – 22,3×14,9 мм, количество пикселей – 4752×3168, размеры пикселя 4,7×6,3 мкм, динамический диапазон (дигитализация) – 16 битов, ручной баланс белого.

Точность экспериментов и цитофотометрических измерений зависит в частности от линейности передаточной характеристики установки в целом. Для тестирования передаточной характеристики в качестве первого тестового объекта используется аттестованный девятиступенчатый ослабитель к спектрографу ИСП-51. Пропускание 1÷9 ступеней имеет следующие значения: 100; 70,79; 50,12; 31,62; 19,95; 14,80; 8,91; 6,31; 100 % соответственно. Вторым тестовым объектом служит фотометрический клин, изготовленный из ахроматического нейтрально-серого в массе стекла. Размеры клина – 70×15 мм. Тестирование установки проводится следующим образом. Производится последовательная регистрация цифровых изображений различных ступеней тестового объекта со значением ISO равным 100, значение установки выбора баланса белого – вручную. На каждом изображении выделяется один и тот же сегмент, по которому проводится усреднение значений уровней серого по всем пикселям. Значение уровня серого, соответствующее пропусканию 100 %, выбирается равным среднему арифметическому значению уровней серого в изображении 1-й или 9-й ступени тестового объекта. Строится передаточная характеристика, отражающая зависимость экспериментально полученного значения пропускания от паспортного значения пропускания тестового объекта.

В результате количественной обработки цифровых изображений выявлена линейная зависимость $T_1 = k \times T_2$ пропускания ступеней ослабителя T_1 , найденная в результате эксперимента, от величины значений пропускания T_2 , указанных в паспорте ослабителя. Коэффициент k линейной аппроксимации равен 0,99. Прямая линейной аппроксимации на всех графиках лежит в пределах среднеквадран-

точного отклонения экспериментальных данных. Использование гамма-коррекции с коэффициентом 1,78 позволяет довести доверительный интервал линейной аппроксимации до 0,99.

Среднеквадратичное отклонение (СКО) по выборке средних значений, вычисленных по участкам матрицы с различным количеством пикселей (от 2×2 пикселей до 200×200 пикселей), зависит от яркости изображения (величины уровня серого) и характеризует шумовые компоненты сигнала. Наибольший разброс среднего значения (а значит, и шумовых компонентов) наблюдается при низких уровнях освещенности матрицы. Наибольшие значения коэффициента вариации, определяемого как отношение СКО к соответствующему среднему значению, выраженное в процентах, достигают 4 % при уровне серого, равном 1,6 % от максимального уровня серого. Величины коэффициента вариации среднего значения становятся менее 0,25 %, когда уровни освещенности матрицы находятся в середине динамического диапазона. Ширина линейного динамического диапазона составила 15 битов.

Темновые шумы напрямую зависят от величины *ISO*. Минимальное количество пикселей, дающих ненулевой уровень серого на черном снимке (при закрытой апертуре), составляет 0,016 % от общего числа пикселей на матрице при *ISO*100 единиц. В экспериментах с последующей количественной обработкой снимков предпочтительно использовать малые значения *ISO*.

3. Тестовые микрообъекты

В теории линейных систем применительно к построению изображения в микроскопе предполагается, что предмет (препарат) является тонким по сравнению с глубиной фокуса изображающей системы и плоским. Это предположение вполне обосновано для препаратов крови, процедура подготовки которых для цитофотометрии в видимой области спектра достаточно подробно описана [3] и стандартизована. При расчете микрообъектива покровное стекло включается в оптическую схему и при использовании не искажает изображение собственно препарата. Более того, современные микрообъективы рассчитываются и изготавливаются таким образом, что обеспечивают разрешение практически на дифракционном пределе. Перечисленные факты накладывают определенные ограничения на тест-объект «светящаяся точка».

В качестве объекта «светящаяся точка» во флуоресцентной микроскопии [7] используются меченые флуорофорами полистироловые латексные микросферы диаметром 0,121 мкм, помещенные в 1 %-й агаровый гель между покровными стеклами, разнесенными на расстояние 280 мкм. Однако такие объекты не подходят для измерения ФРТ в рассматриваемом случае, когда применяется метод проходящего света.

Мы разработали комбинированный объект, включающий «линейную решетку» и «светящиеся точки», изображение которых дано на рис. 2. Объекты изготовлены в Центре коллективного пользования «Наноструктуры» при ИФП им. А.В. Ржанова СО РАН. Они выполнены методами электронно-лучевой и фотолитографии в тонких пленках хрома на стандартных стеклянных (*K8*) полужках в виде дифракционных микроструктур. Характерные размеры микроструктур (в виде кругов и квадратов), предназначенных для экспериментов с микрообъективами небольшого увеличения (от 2^x до 10^x), приведены в таблице. Точность исполнения размеров составила $\sim 0,1 \pm 0,3$ мкм.

При необходимости тест-объект закрывается покровным стеклом. В таблице и на рис. 2 приведены характеристики одного из пяти изготовленных тестовых объектов. Остальные тестовые объекты могут быть использованы для изучения микрообъективов большего увеличения.

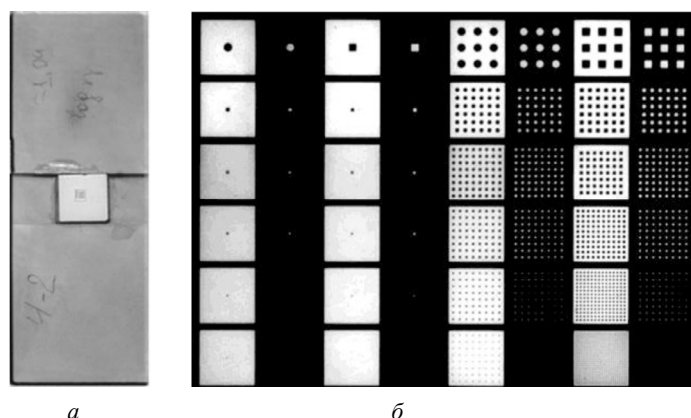


Рис. 2 – Фотография тест-объекта «светящиеся точки» (а); фотография микрообъектов в виде круглых и квадратных, пропускающих и поглощающих свет площадок в тонких пленках хрома с оптической плотностью 1,05. Характерные размеры кружков и квадратов (сверху вниз): 22, 11, 9, 7, 5 и 3 мкм (б)

Fig. 2 – General view of the test object (a); photo of a microobjects in the form of squares and circles. Optical density of a film of chromium is 1.05. Typical dimensions (downwards) are the following series: 22, 11, 9, 7, 5 and 3 μm (b)

Размеры микрообъектов, мкм
Dimensions of the microobjects, microns

| Размер по чертежу, мкм | 22 | 11 | 9 | 7 | 5 | 3 |
|---|-------|-------|------|------|------|-------|
| Размер, полученный в пленке хрома, мкм | 22,15 | 11,26 | 9,25 | 7,24 | 5,42 | 3,37 |
| Приведенная погрешность изготовления, % | 2,91 | 4,80 | 7,36 | 6,96 | 9,86 | 20,35 |

4. Экспериментальное определение ФРТ

Эксперименты по отработке методики измерения и изучению ФРТ проводились с микрообъективами ЛОМО и *CarlZeiss* (Германия) небольшого увеличения (от $2\times$ до $10\times$). Ниже приводятся данные для объектива планохромата $4\times/0,1$, расчетное линейное разрешение которого составляет 3,97 мкм. Измерение ФРТ проводилось путем фотографирования дифракционного тест-объекта в проходящем свете с интерференционным светофильтром 650 нм с полушириной полосы пропускания 5 нм. Для исключения влияния на изображение остаточной хроматической аберрации и виньетирования отдельно фотографировался фоновый кадр – поле изображения микроскопа в отсутствие предметов – для последующей нормировки получаемых снимков. При фотографировании фона применяется тот же светофильтр, что и для кадра с тест-объектом. Использовался дифракционный тест-объект № 4-2, пропускание которого составляет 8,96 %, а характерные размеры микрообъектов приведены в таблице.

Каустика любого объектива представляет собой трехмерную фигуру и изображение светящейся точки также является объемным. Двумерная ФРТ должна быть измерена в поперечном сечении каустики в местоположении перетяжки, чтобы этот результат можно было использовать в расчетах. То есть при измерении ФРТ важно правильно навестись на фокус. Для выявления особенностей

объемного изображения и исключения ошибки расфокусировки производилась серия снимков одного тест-объекта при различных положениях столика. В нижнем положении столика микроскопа наблюдалось размытое изображение, затем оно фокусировалось и снова размывалось по мере движения столика микроскопа по вертикальной направляющей снизу вверх. Положение и перемещение столика микроскопа контролировались микрометром *Micron*. За одно перемещение столик поднимался на 3,76 мкм. То есть съемка изображений производилась при различных положениях столика микроскопа по высоте вблизи фокальной плоскости микрообъектива. Получено более 100 фотографий.

Для отбора наиболее сфокусированного изображения использовалась шкала из штрихов тестового объекта. Вдоль всей шкалы (поперек делений) делалась выборка однопиксельной линии, для цифровых значений яркости в которой определялась величина дисперсии. Кадры с максимальным значением дисперсии отбирались как наиболее сфокусированные.

Настройки цифровой камеры и время выдержки выбирались таким образом, чтобы матрица камеры работала в линейном режиме. Теоретические возможности чувствительности *CANON EOS 500D* позволяют зафиксировать не менее десяти светлых колец диска Эйри. Однако реальные технические возможности матрицы значительно уступают за счет присутствия темнового шума (в среднем до 3 дБ), как показано на рис. 3.

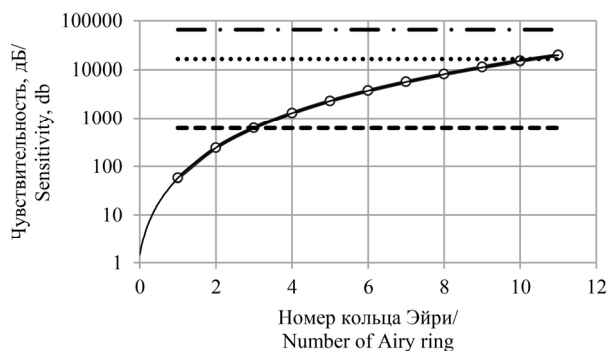


Рис. 3 – К возможностям современных матриц с повышенной дигитализацией

Fig. 3 – To the possibilities of modern matrices with increased digitalization

Штрих-пунктирная линия на рис. 3 показывает максимально возможный диапазон чувствительности 16-битной матрицы камеры, равный $2^{16} = 65536$ градациям серого, точечная горизонтальная линия на рис. 3 – 14-битной матрицы ($2^{14} = 16384$). При полном отсутствии шумов с помощью 14-битной фотоматрицы можно различить до десяти колец Эйри. Штриховая горизонтальная линия показывает реальный уровень темнового шума матрицы используемой камеры, который ограничивает возможности динамического диапазона при комнатной температуре. Таким образом, различить третье кольцо диска Эйри в экспериментах при комнатной температуре не представляется возможным.

Зависимость падения уровня интенсивности от номера кольца определяется полиномом:

$$F(x) = 0,000102x^5 - 0,0027x^4 + 12,2037x^3 + 27,267x^2 + 16,215x + 1,45838$$

с достоверностью 1,00.

Полученные изображения позволяют строить как аксиальные, так и трансверсальные сечения каустик микрообъективов. Результаты обработки некоторых экспериментальных данных приведены на рис. 4–6. На рис. 4 показан 3D график трансверсального сечения каустики в фокальной плоскости (двумерная ФРТ) микрообъектива планахромата $4\times/0,1$. Двумерная ФРТ восстановлена из цифрового изображения тест-объекта, показанного в градациях серого в правой части рис. 4. При обработке изображения и построения графика применялись процедуры масштабирования и сглаживания. Анализ полученных данных выявляет отсутствие aberrаций, вызывающих асимметричные искажения ФРТ. Распределение интенсивности в радиальном сечении двумерной ФРТ, содержащем пиксели с максимальным значением интенсивности, приведено на рис. 5 сплошной линией. Пунктиром показана расчетная кривая радиального сечения кружка Эйри объектива $4\times/0,1$, расстояние между первыми нулями кружка составляет 7,93 мкм. Местоположение минимальных значений на графиках практически совпадает с точностью до пикселя. Увеличение амплитуды вторичных пиков, наблюдаемое в эксперименте, свидетельствует о наличии небольшой сферической aberrации.

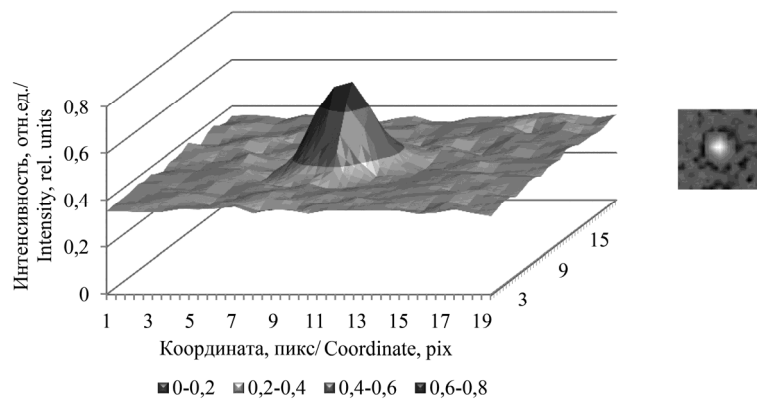


Рис. 4 – 3D график ФРТ объектива $4\times/0,1$, справа – изображение «светящейся точки» в градациях серого (1 (max) – белый, 0 (min) – черный)

Fig. 4 – 3D diagram of objective PSF of $4\times/0,1$, at right – image of “star” in grey scale

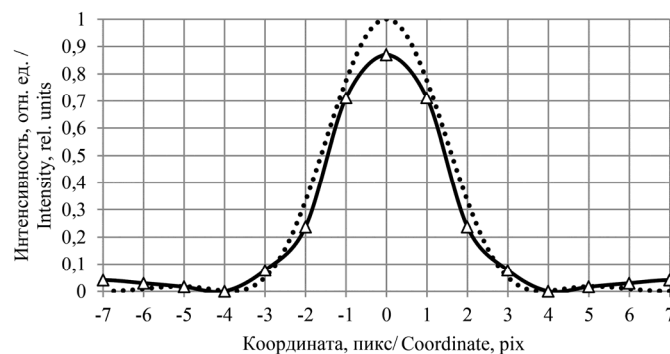
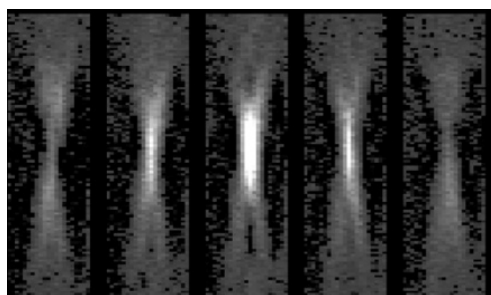


Рис. 5 – Радиальное сечение двумерной ФРТ. Экспериментальные точки отмечены значками. Масштаб: в 1 пикселе содержится 1,36 мкм

Fig. 5 – Radial section of PSF. Scale: 1 pix is equal to 1,36 micron



a *б* *в* *г* *д*

Рис. 6 – Восстановленное изображение каустики в пяти продольных сечениях: *a*, *б*, *в*, *г*, *д*

Fig. 6 – Image of caustics in five planes

Пять восстановленных продольных сечений каустики микрообъектива $4\times/0,1$ приведено на рис. 6, аксиальное сечение расположено в центре (рис. 6, *в*). Вид каустики подтверждает высокое качество объектива.

Обсуждаемые данные получены из цифровых изображений. Сигналы, регистрируемые элементами фотоматрицы, являются усредненными по их поверхности. Для фильтрации изображений, перехода к дискретным выборкам и аппроксимации мы используем универсальный аппарат программного пакета *MATHCAD*. Качество восстановления ФРТ определяется частотой Найквиста пространственной дискретизации. Для цифровых микроскопных изображений частота Найквиста в координатном пространстве предмета рассчитывается [8] как $\lambda/(4\times NA)$ и равна 1,63 мкм/пиксель. Пересчет размеров пикселей фотоматрицы в обратном ходе лучей относительно построения изображения дает величины 1,17 \times 1,58 мкм/пиксель. То есть критерий Найквиста выполняется и ФРТ восстанавливается из экспериментальных значений в пикселях однозначно и без потерь.

Таким образом, задачи, возникающие в экспериментах по нахождению ФРТ, решаются путем тестирования и линеаризации передаточной характеристики цифровой камеры, надлежащим выбором фотоматрицы с учетом частоты пространственной дискретизации изображения, и выбором тестового объекта, согласованного с увеличением микрообъектива. Разработанный метод экспериментального определения ФРТ применим к цитофотометрическим установкам с микрообъективами любой кратности. В настоящей работе приведены экспериментальные результаты для микрообъективов низкой кратности, как представляющих наибольший интерес с точки зрения их использования в задачах обработки изображений в рамках теории линейных систем.

Заключение

Развитие элементной базы фотоники привело к существенной модификации устройств и метода цитофотометрии, который является одним из основных для определения содержания ДНК в ядрах клеток и широко применяется [3, 4] в медицине и биологии. В компьютерной цитофотометрии в процессе проведения оптико-структурного анализа микроизображения значительное влияние на результаты расчетов оказывает сегментация изображения. Существенный вклад в ошибку измерений вносит дифракция света, которая искажает распределение оптической плотности в цифровом изображении клеточного ядра и его границы, затрудняя пороговую сегментацию. Поэтому важным этапом цифровой обработки микроизображения является улучшение контраста и разрешения путем выполнения

операции деконволюции с ФРТ изображающей системы. Методы деконволюции известны [6] и применяются в микроскопии, причем для их реализации требуется знание ФРТ микроскопа.

В настоящей работе разработан метод экспериментального определения ФРТ устройства компьютерной цитофотометрии и специализированные дифракционные микрообъекты для его осуществления. Показано, что характеристики цифровой камеры повышенной дигитализации позволяют измерять ФРТ оптической системы микроскопа на линейном участке передаточной характеристики камеры. Полученные цифровые изображения кружка рассеяния включают до ~20 выборочных значений интенсивности в пределах первого темного кольца ФРТ. То есть числа отсчетов достаточно для восстановления ФРТ из значений интенсивности в пикселях однозначно и без потерь. Экспериментально найденная ФРТ может быть использована в расчетах с помощью специализированного пакета программ для выполнения деконволюции с цифровым изображением препарата, например, *Scientific Volume Imaging's Huygens* [9], *ImageJ plugins* [10], или оригинальным программным обеспечением, разработанным в *Matlab codes*. В компьютерной цитофотометрии такая обработка микроизображения позволит точнее определять границы клеточного ядра, его оптико-структурные характеристики и интегральную оптическую плотность.

Благодарности

Авторы благодарят член-корр. РАН, д-ра физ.-мат. наук, профессора А.В. Латышева и сотрудников Центра коллективного пользования «Наноструктуры» при ИФП им. А.В. Ржанова СО РАН за выполнение работ по изготовлению дифракционных тест-объектов. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №12-08-00396-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Компьютерная цитофотометрия / Л.В. Омелянчук, Е.И. Пальчиков, Е.С. Смирнов, Н.В. Каманина // Оптико-информационные измерительные и лазерные технологии и системы: юбилейный сборник избранных трудов Конструкторско-технологического института научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук. – Новосибирск: ГЕО, 2012. – С. 375–398.
2. Особенности применения цифровых камер для цитофотометрического определения количества ДНК в ядрах клеток / И.Г. Пальчикова, Л.В. Омелянчук, Е.И. Пальчиков, Е.С. Смирнов, В.Ф. Семешин // Датчики и системы. – 2012. – № 3. – С. 2–12.
3. **Агроскин Л.С., Папаян Г.В.** Цитофотометрия. Аппаратура и методы анализа клеток по светопоглощению. – Л.: Наука, 1977. – 295 с.
4. **Puech M., Giroud F.** Standardisation of DNA quantitation by image analysis: quality control of instrumentation // *Cytometry*. – 1999. – Vol. 36, iss. 1. – P. 11–17.
5. **Пальчикова И.Г., Омелянчук Л.В., Смирнов Е.С.** О влиянии дифракции на результаты количественной цитофотометрии // *Автометрия*. – 2012. – Т. 48, № 6. – С. 92–101.
6. **Sarder P., Nehorai A.** Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images // *IEEE Signal Processing Magazine*. – 2006. – Vol. 23, iss. 3. – P. 32–45.
7. **Kontoyannis N.S., Lanni F.** Measured and computed point spread functions for an indirect water immersion objective used in three-dimensional fluorescence microscopy // *Three-Dimensional Microscopy: Image Acquisition and Process III: Proceedings SPIE*, 10 April 1996. – San Jose, California, 1996. – Vol. 2655. – P. 34–42.
8. **Lanni F.** Sampling theorem for square-pixel image data / F. Lanni, G. Baxter // *Biomedical Image Processing and Three-dimensional Microscopy. Proceedings of the Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers*, February 09, 1992. – San Jose, California, 1992. – Vol. 1660. – P. 140–147.

9. Scientific volume imaging [Electronic resource]: website. – URL: <http://www.svi.nl/> (accessed: 20.11.2014).
10. Vonesch C., Cristofani R.T., Schmit G. Deconvolutionlab: 3D deconvolution package for microscopic images [Electronic resource]. – Switzerland: EPFL: Biomedical Image Group (BIG), version 14.02.2014. – URL: <http://bigwww.epfl.ch/algorithms/deconvolutionlab/> (accessed: 20.11.2014).

POINT SPREAD FUNCTION DEFINITION FOR DIGITAL CYTOPHOTOMETRIC DEVICES

I.G. Palchikova^{1,2}, E.S. Smirnov¹

¹*Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering,
Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

A point spread function measuring method based on processing a digital image (16-bit digitalization) of the diffractive test-object, is developed and applied for the computer cytophotometric device. Special requirements for the digital camera specifications and test-object features are discussed. Testing the camera transfer characteristic is realized with the help of a certified 9-step optical attenuator. The measured noise level of the digital camera is about 3 dB at room temperature, and two rings of two-dimensional PSF may be registered within the linear range of the camera transfer characteristic. The Star special diffractive test-objects” are proposed and made in chromium films by the method of electron beam lithography. Processing the digital data arrays of Star images makes it possible to reconstruct the 3D PSF and to compute and to plot both axial and transversal sections of the caustic surface of micro objectives.

Key words: digital image, digitalization, deconvolution, microscopy, cytometry.

REFERENCES

1. Omel'yanchuk L.V., Pal'chikov E.I., Smirnov E.S., Kamanina N.V. [Computer cytometry]. *Optiko-informatsionnye izmeritel'nye i lazernye tekhnologii i sistemy: Iubileinyi sbornik izbrannykh trudov Konstruktorsko-tehnologicheskogo instituta nauchnogo priborostroeniya Sibirskogo otdeleniya Rossiiskoi akademii nauk* [Optical-information measuring and laser technologies and systems: Anniversary Collection Selected Proceedings of Design-technology Institute of Scientific Instrument Engineering, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences]. Novosibirsk, GEO Publ., 2012, pp. 375–398.
2. Pal'chikova I.G., Omel'yanchuk L.V., Pal'chikov E.I., Smirnov E.S., Semeshin V.F. Osobennosti primeneniya tsifrovyykh kamer dlya tsitofotometricheskogo opredeleniya kolichestva DNK v yadrah kletok [Digital camera characteristics and application for cytophotometric measurements of DNA content in nuclei of cells]. *Datchiki i sistemy – Sensors and systems*, 2012, no. 3, pp. 2–12.
3. Agroskin L.S., Papayan G.V. *Tsitofotometriya. Apparatura i metody analiza kletok po svetopogloshcheniyu* [Cytophotometry. Technique and the analysis methods of cells by the light absorption]. Leningrad, Nauka, 1977. 295 p.
4. Puech M., Giroud F. Standardisation of DNA quantitation by image analysis: quality control of instrumentation. *Cytometry*, 1999, vol. 36, iss. 1, pp. 11–17.
5. Pal'chikova I.G., Omel'yanchuk L.V., Smirnov E.S. O vliyaniy difraktsii na rezul'taty kolichestvennoi tsitofotometrii [Effect of diffraction on the results of quantitative cytophotometry]. *Avtometriya – Optoelectronics, Instrumentation and Data Processing*, 2012, vol. 48, no. 6, pp. 92–101. (In Russian)
6. Sarder P., Nehorai A. Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images. *IEEE Signal Processing Magazine*, 2006, vol. 23, iss. 3, pp. 32–45.
7. Kontoyannis N.S., Lanni F. Measured and computed point spread functions for an indirect water immersion objective used in three-dimensional fluorescence microscopy. Three-Dimensional Microscopy: Image Acquisition and Process III. Proceedings of the Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, San Jose, California, 10 April 1996, vol. 2655, pp. 34–42.

8. Lanni F., Baxter G. Sampling theorem for square-pixel image data. Biomedical Image Processing and Three-dimensional Microscopy. Proceedings of the Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, San Jose, California, February 09, 1992, vol. 1660, pp. 140–147.
9. Scientific volume imaging: website. Available at: <http://www.svi.nl/> (accessed 20.11.2014).
10. Vonesch C., Cristofani R.T., Schmit G. Deconvolutionlab: 3D deconvolution package for microscopic images. Switzerland, EPFL, Biomedical Image Group (BIG), version 14.02.2014. Available at: <http://bigwww.epfl.ch/algorithms/deconvolutionlab/> (accessed 20.11.2014).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ



Пальчикова Ирина Георгиевна – доктор технических наук, доцент, заведующая лабораторией Лазерных прецизионных систем, Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук. Область научных интересов: дифракционная оптика, цитометрия, микроскопия, цифровые видеосистемы. Опубликовано 150 научных работ. (Адрес: 630058, Российская Федерация, Новосибирск, ул. Русская, 1. Email: palchikova@gmail.com).

Palchikova Irina Georgievna – D. Sc. (Eng.), associate professor, head of Laser Precision Technologies Laboratory, Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. Her research interests are currently focused on Diffractive optics, cytometry, microscopy, digital video. She is author of 150 scientific papers. (Address: 1, Russkaya str., Novosibirsk, 630058, Russian Federation. Email: palchikova@gmail.com).



Смирнов Евгений Сергеевич – младший научный сотрудник лаборатории Лазерных прецизионных систем, Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук. Область научных интересов: методы микроскопии, колориметрия. Опубликовано 12 научных работ. (Адрес: 630058, Российская Федерация, Новосибирск, ул. Русская, 1).

Smirnov Evgenii Sergeevich – Junior researcher of Laser Precision Technologies Laboratory, Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. His research interests are currently focused on Microscopy techniques, colorimetry. He is author of 12 scientific paper. (Address: 1, Russkaya str., Novosibirsk, 630058, Russian Federation).

*Статья поступила 24 ноября 2014 г.
Received November 24, 2014*

To Reference:

Pal'chikova I.G., Smirnov E.S. Eksperimental'noe opredelenie funktsii rassenyaniya tochki v ustanovkakh komp'yuternoi tsitofotometrii [Point spread function definition for digital cytophotometric devices]. *Doklady Akademii nauk vysshei shkoly Rossiiskoi Federatsii – Proceedings of the Russian higher school Academy of sciences*, 2014, no. 4, pp. 104–114.