

# ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ФУНКЦИИ РАССЕЙЯНИЯ ТОЧКИ РЕГИСТРИРУЮЩЕГО ПРИБОРА НА РЕЗУЛЬТАТЫ СКАНИРОВАНИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ПЯТЕН В ЛУНКАХ МИКРОПЛАНШЕТА ПО ТЕХНОЛОГИИ ФОСФАН

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF POINT SPREAD FUNCTION OF THE RECORDING INSTRUMENT ON THE RESULTS OF ANALYTICAL SPOTS SCANNING IN THE MICROPLATE WELLS USING THE FOSPHAN TECHNOLOGY

*Y. Darashkevich  
S. Asliyan  
A. Sokolov*

*Summary.* A method is proposed for determining the distorting function (PSF) of a scanning device using the FOSPHAN technology. A quality criterion for modeling PSF is proposed. Studies have been conducted using a control sample with the aim of further adjusting the PSF based on the proposed criterion. The optimal values of the two-dimensional normal distribution, simulating a PSF, are determined. Conducted research on real samples to determine the effect of the PSF recording device on the scan results. The degree of distortion of the initial values for different levels of the intensity of the recorded signal is estimated. An improvement in the signal-to-noise ratio in the reconstructed image is shown.

*Keywords:* Time-resolved luminescence, multiplex analysis, digital image, deconvolution, signal-to-noise ratio.

**Дарашкевич Ярослав Олегович**

Аспирант, Московский государственный технический университет им Н.Э. Баумана

**Аслиян Сергей Каренович**

Аспирант, Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения, г. Москва

**Соколов Александр Сергеевич**

Начальник лаборатории, Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения, г. Москва  
niibp16.3@gmail.com

*Аннотация.* Предложена методика для определения искажающей функции (ФРТ) сканирующего прибора по технологии ФОСФАН. Предложен критерий качества моделирования ФРТ. Проведены исследования с использованием контрольного образца с целью последующей корректировки ФРТ на основе предложенного критерия. Определены оптимальные значения двумерного нормального распределения, моделирующего ФРТ. Проведены исследования на реальных образцах с целью определения влияния ФРТ регистрирующего прибора на результаты сканирования. Оценена степень искажения исходных значений для различных уровней интенсивности регистрируемого сигнала. Показано улучшение соотношения сигнал/шум в восстановленном изображении.

*Ключевые слова:* Разрешенная во времени люминесценция, мультиплексный анализ, цифровое изображение, деконволюция, соотношение сигнал шум.

## Введение

**Т**ехнология ФОСФАН является универсальной технологической платформой для решения задач в области клинической лабораторной диагностики [1]. Основываясь на принципах временной и пространственной селекции сигнала, технология позволяет регистрировать низкие уровни люминесценции на поверхности лунок микропланшета с высокой плотностью расположения аналитических пятен. Критерием применимости аналитической системы в массовом скрининге является ее производительность или скорость сканирования (проб/час, тестов/день и т.д.). Увеличение скорости сканирования неизбежно приводит к пространственному искажению сигнала, ошибкам

пространственной селекции и дифференциации сигнала между близкорасположенными аналитическими пятнами, что требует внесения корректирующих изменений в результаты сканирования [2]. Существуют различные методы восстановления исходного сигнала [3]. Разработчики, в области конфокальной микроскопии, вносят корректирующие изменения в сигнал с помощью специальных алгоритмов деконволюции [4]. Подобный подход для восстановления сигнала так же применим для регистрирующих индикаторов, работающих по технологии ФОСФАН. Для этого нами была разработана методика определения и корректировки искажающей функции в сканирующем индикаторе ИФИ-05, а на экспериментальных моделях была опробована эффективность применяемого алгоритма восстановления.

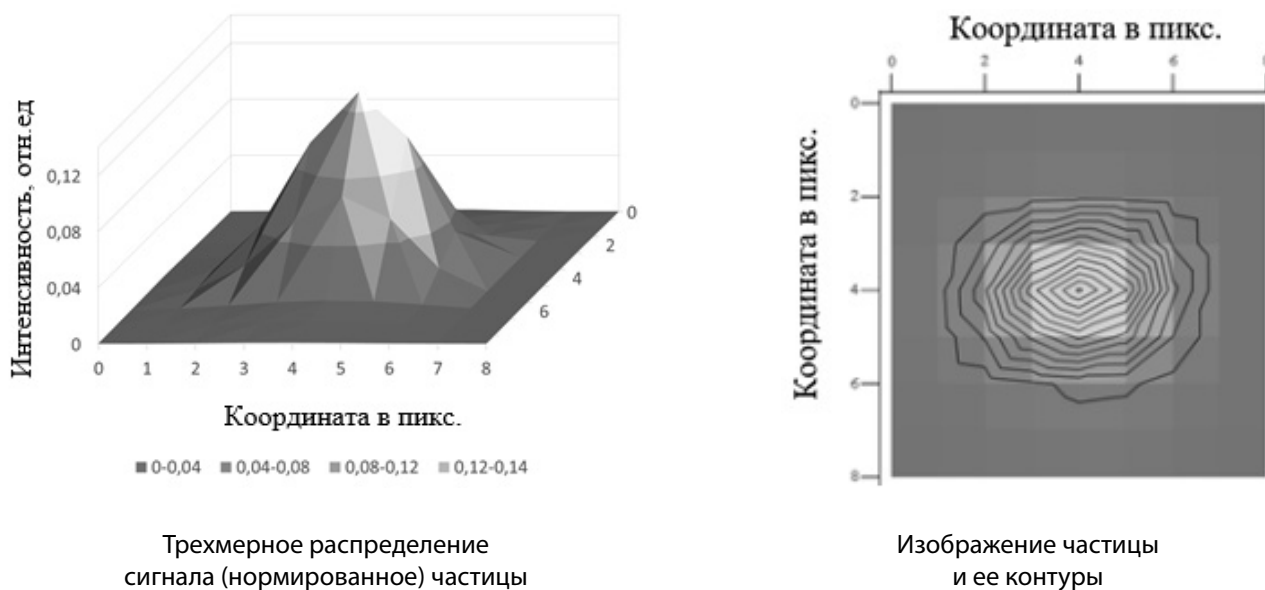


Рис. 1. Нормированное амплитудное распределение люминесцирующей частицы и ее контуры

### Существующие решения

Задача восстановления сигнала сводится к поиску искажающей функции исследуемой системы или, применительно для оптических систем, функции рассеяния точки (ФРТ). Однако, единого способа получения модели и оценки ее сходства с реальной ФРТ не существует и требуется разработка под каждую конкретную систему. [5].

Индикатор ИФИ-05 регистрирует разрешенную во времени люминесценцию с высоким пространственным разрешением для подобных систем, что является его уникальной особенностью. Поэтому нам пришлось разрабатывать собственный подход к определению ФРТ этой системы.

### Материалы и методы

Блок сканирования в индикаторе ИФИ-05 построен по конфокальной схеме. В качестве источника возбуждения используют лазерный диод с номинальной длиной волны 375 нм. Диаметр светового пятна возбуждающего излучения 140 мкм (по уровню  $\approx 0,01$  от максимума) и 100 мкм (по уровню  $\approx 0,5$  от максимума). Длина волны регистрации составляет 615 нм с полушириной спектра регистрации 25 нм. Приемник фосфоресцентного излучения: ФЭУ (R4632 Hamamatsu) в режиме счета фотонов с минимальным значением темного счета. Размер пикселя при сканировании: 50 мкм.

Определение ФРТ подразумевает получение отклика системы на точечный «светящийся» объект, размер ко-

торого соответствует пространственному разрешению системы, а уровень сигнала от частицы находится в диапазоне линейности приемника [6].

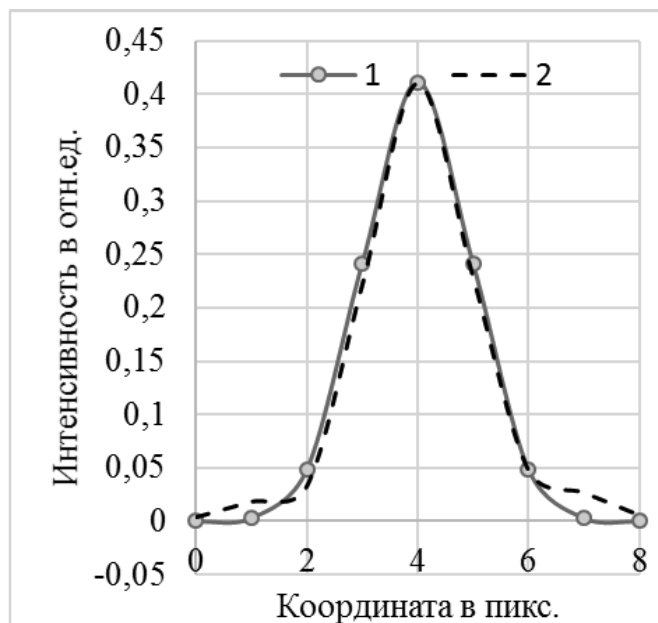
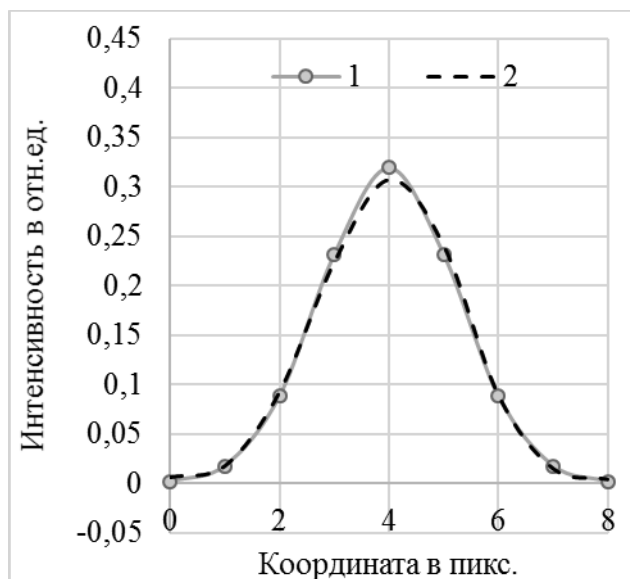
### Определение ФРТ

В качестве точечного «светящегося» объекта использовали люминесцентные комплексы на основе Eu, сорбированные на микроразмерные сферические полимерные частицы [7]. Полимерная основа микрочастицы представляет собой слабо люминесцирующий полимер полистирол-дивинилбензол ( $\approx 2\%$ ДВБ) (смола Меррифила). Диаметр частиц:  $50 \pm 10$  мкм. Частицы наносили на поверхности лунок планшета для микротитрования. Разнесение частиц по поверхности проводили разведением дистиллированной водой маточной суспензии частиц. Из выборки для построения ФРТ исключали замеры образовавшихся конгломератов частиц, частиц с низким уровнем сигнала и частиц, центр которых на изображении располагался на границе между пикселями.

Результат сканирования частицы представлен на рисунке 1.

ФРТ моделировали с помощью трехмерной функции распределения Гаусса. Радиальным сечениям в горизонтальном и вертикальном направлениях частиц из выборки сопоставляли нормальные распределения с соответствующими стандартными отклонениями (рисунок 2).

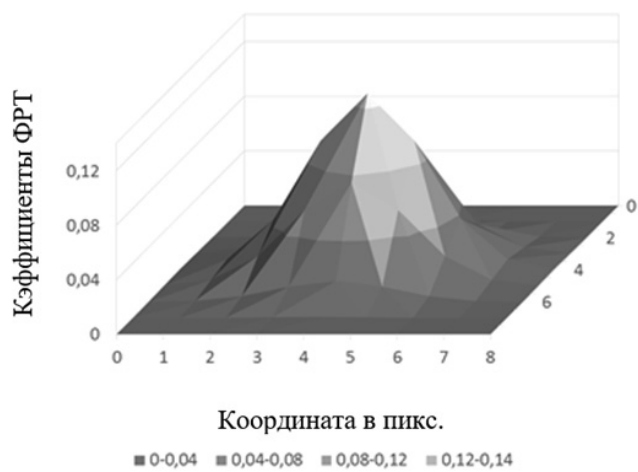
На основании полученных значений  $\sigma_1$  и  $\sigma_2$  рассчитывали двумерную функции распределения Гаусса, как матричное произведение функций распределения. Зна-



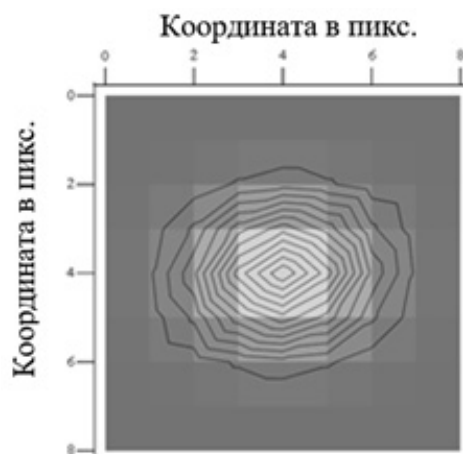
1 — горизонтальное сечение частицы;  
2 — график нормального распределения,  
стандартное отклонение  $\sigma = 1,25$

1 — вертикальное сечение частицы;  
2 — график нормального распределения,  
стандартное отклонение  $\sigma = 0,97$

Рис. 2. Сопоставление аксиального и радиального сечений нормированного сигнала частицы с кривыми нормального распределения



Трехмерное представление ФРТ  
оптической системы индикатора ИФИ-05



Изображение ФРТ  
и ее контуры

Рис. 3. Распределение коэффициентов ФРТ оптической системы индикатора



Исследуемая область имеет характерный диаметр пятен 0,25 мм, расстояние между пятнами  $0,55 \pm 0,02$  мм; ожидаемое распределение сигнала пятна — конус с основанием в виде окружности диаметром 5 пикс.

Рис. 4. Контрольный образец



1 — сигнал до преобразования

2 — сигнал после преобразования



сечение в основании пиков



сечение в основании пиков

(продемонстрирован сигнал от 4-х пятен из 36)

Рис. 5. Результаты сканирования пятен контрольного образца

чения коэффициентов ФРТ,  $f(x_1, x_2)$ , соответствуют формуле (1), с максимумом в точке  $(\mu_1; \mu_2)$ .

$$f(x_1, x_2) = -\frac{1}{2\pi\sigma_1\sigma_2} \exp\left\{-\frac{1}{2}\left[\frac{(x_1 - \mu_1)^2}{\sigma_1^2} + \frac{(x_2 - \mu_2)^2}{\sigma_2^2}\right]\right\} \quad (1)$$

Результат моделирования ФРТ представлен на рисунке 3.

### Корректировка ФРТ

Для уточнения ФРТ исследовали характер распределения восстановленного сигнала от объекта с известными ожидаемыми параметрами.

В качестве объекта использовали контрольный образец, который входит в состав индикатора ИФИ-05 и имитирует планшет с пятнами для иммуноанализа. На рисунке 4 изображен контрольный образец, представляющий собой фосфоресцирующее стекло, над которым расположена стальная пластина с отверстиями различной формы. Для исследования использовали область контрольного образца, которая имитирует дно лунки с 36 пятнами.

Для преобразования сигнала использовался итерационный метод деконволюции Люси-Ричардсона (2) [3, стр. 337], который с помощью найденной ФРТ,  $h(x, y)$ , может восстановить значения сигнала  $f_k(x, y)$  из полученного в индикаторе изображения  $g(x, y)$ . Число итераций,

k, выбирали так, чтобы суммарный сигнал в исходном и преобразованном изображениях практически не отличался, k = 3.

$$f_{k+1}(x, y) = f_k(x, y) \left[ h(-x, -y) ** \frac{g(x, y)}{h(x, y) ** f_k(x, y)} \right] \quad (2)$$

Результаты сканирования контрольного образца до и после преобразования представлены на рисунке 5.

Исходя из того, что ожидаемой формой сигнала пятна в контрольном образце должен быть конус с окружностью в основании, вычисляли корреляцию между средними значениями пятен для каждого ряда в горизонтальном и вертикальном направлениях. Дополнительно вычисляли значение взвешенного среднего квадратического отклонения,  $\sigma_{вз.откл.}$

Такая схема позволяет учитывать характер сигнала пятна по всему ее объему, а не только по центральным сечениям. Новую ФРТ подбирали в окрестности  $\sigma_1 \pm 10\%$  и  $\sigma_2 \pm 10\%$  исходной ФРТ. Наилучшие значения корреляции и отклонения  $\sigma_{вз.кр.кв.}$  достигали при  $\sigma_1 = 1,32$  и  $\sigma_2 = 0,83$ . Результаты вычисления:

- ♦ исходные значения корреляции и взвешенного среднего квадратического отклонения:  $corr = 0,998$ ,  $\sigma_{вз.кр.кв.} = 5,617$ ;
- ♦ значения после коррекции:  $corr = 0,999$ ,  $\sigma_{вз.кр.кв.} = 2,822$ .

Скорректированную для новых значений  $\sigma_1$  и  $\sigma_2$  ФРТ использовали в апробации алгоритма восстановления сигнала на экспериментальных образцах.

### Результаты

Для исследования были проведены измерения контрольного положительного образца «Бутолокс А» (препарат очищенного ботулинического анатоксина типа А), входящего в набор реагентов для мультиплексного выявления токсинов «Токсиплекс-ФОСФАН» [8]. К содержимому флакона с лиофильно высушенным препаратом контрольного образца добавляли 0,5 мл дистиллированной воды.

Оценку приборного влияния на результаты регистрации проводили для 10-кратного и 20-кратного разбавления исходного раствора контрольного образца. Сравнивали изменения соотношения сигнал/шум, SNR, в сигнале до преобразования и после. SNR вычисляли по формуле (3) [9], где  $\mu_{сигнал}$  — среднее значение полезного сигнала,  $\sigma_{фон}$  — стандартное отклонение фона.

$$SNR = \frac{\mu_{сигнал}}{\sigma_{фон}} \quad (3)$$

Полезный сигнал,  $\mu_{сигнал}$  определяли как превышение среднего значения суммарного сигнала над средним значением фонового сигнала.

В результате исследования на реальных образцах получили следующие значения соотношения сигнал/шум: для 10-кратного разведения до преобразования —  $SNR_{10} = 5,417$ ; после —  $SNR_{10} = 5,557$ ; для 20-кратного разведения до преобразования —  $SNR_{20} = 3,001$ ; после —  $SNR_{20} = 3,332$ .

### Обсуждение

После преобразования сигнала наблюдали улучшение значения  $SNR_{10}$  на  $\approx 2,5\%$  и значений  $SNR_{20}$  на  $\approx 10\%$ . В случае 10-кратного разведения согласно критерию Роуза мы практически со 100% достоверностью выделяем полезный сигнал [9]. Улучшение значений  $SNR_{10}$  практически никак не влияет на получаемые результаты, поэтому восстановление сигнала, для которого  $SNR \geq 5$ , в случае хорошо разделяемых пятен не имеет существенного значения. В случае 20-кратного разведения, где значение SNR около 3, восстановление сигнала уменьшает появление ложных результатов  $\approx 3,3$  раза, с 27 случаев до 8 случаев на 10000 измерений.

На полученных изображениях контрольного образца (рисунок 5) видно, что происходит эффективное разделение сигнала между соседними пиками. Подобный эффект используется при разделении пиков в хроматографии [10]. Восстановление сигнала может быть полезно в случае наложения сигнала соседних пиков, особенно если они представляют сигнал различных аналитов.

### Заключение

Таким образом нами была проведена оценка влияния ФРТ индикатора ИФИ-05 на результаты сканирования аналитических пятен в лунках микропланшета. Показано что искажающее влияние приборной функции увеличивается при уменьшении регистрируемых уровней полезного сигнала: 2,5% для уровней  $SNR \approx 5$  и 10% для уровней  $SNR \approx 3$ . Восстановление сигнала с помощью алгоритмов деконволюции при сканировании в индикаторе ИФИ-05 имеет практической значение.

### Благодарности

Авторы выражают особую благодарность сотрудникам отдела биологического микроанализа ФГУП «ГосНИИБП» Парамонову Д. В. и Пугачёву Д. Е. за помощь в проведении данного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фосфоресцентный микроанализ как новая технологическая платформа для молекулярной диагностики / Н. С. Осин [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2007. — № 12. — С. 3–10
2. The Basic Principle of Airyscanning [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://p.widencdn.net/pynlro>. — Дата доступа: 14.06.2019.
3. Гонсалес, Р. С. Цифровая обработка изображений / Р. С. Гонсалес, Р. Е. Вудс. — Москва: Техносфера, 2012. — 1104 с. The Basic Principle of Airyscanning 2014
4. Биоспецифичные наночастицы для мультиплексного фосфоресцентного анализа (ФОСФАН) / Д. В. Парамонов [и др.] // Биоорганическая химия. — 2016. — Т. 42, № 6. — С. 722–731
5. 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, — 1996, — V.2655, — P. 34–42.
6. Stallinga S., Accuracy of the Gaussian Point Spread Function model in 2D localization microscopy / Stallinga S., Rieger B. // Optic Express. — 2010. — V. 18, № 24. — P. 24461–24476
7. High precision wavefront control in point spread function engineering for single emitter localization / Siemons M. [et al] // Optic Express. — 2018. — V. 26, № 7. — P. 8397–8416
8. Иммуночипы для одновременного обнаружения пяти ботулотоксинов методом фосфоресцентного анализа (ФОСФАН) / Никитина А. В. [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. — 2016. — № 4. — С. 64–68
9. The Essential Physics of Medical Imaging / J. T. Bushberg [et al.]. — Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. — 280 p.
10. Манойлов, В. В. Возможности алгоритма сверток с производными для оценки параметров масс-спектров, содержащих наложившиеся пики / В. В. Манойлов, И. В. Заруцкий // Обработка и анализ сигналов. — 2009. — Т. 19, № 4. — С. 103–108

© Дарашкевич Ярослав Олегович, Аслиян Сергей Каренович, Соколов Александр Сергеевич (niibp16.3@gmail.com).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Московский государственный технический университет им Н.Э. Баумана