

Также имеет смысл доработать модель так, чтобы в качестве начальных условий можно было задавать абсолютную мощность лазера и оптические параметры фокусирующей системы. Это упростит установку начальных условий и позволит учесть эффект расфокусировки луча при проникновении в глубину обрабатываемой заготовки и соответственно приблизит результаты моделирования к экспериментальным.

### **БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ**

1. Сакович И. А. Коррекция градуировочных зависимостей трехзонального термографа. Магистерская диссертация. Минск. 2016.
2. Мулярчик С. Г. Численные методы: электронный учебно-методический комплекс. БГУ, Факультет радиофизики и компьютерных технологий. Минск 2012.
3. Кузнецов Г. В., Шеремет М. А. Разностные методы решения задач теплопроводности. Томск: Изд-во ТПУ, 2007. 172 с.
4. Галенко П. К., Харанжевский Е. В., Данилов Д. А. Высокоскоростная кристаллизация конструкционной стали при лазерной обработке поверхности // Журнал технической физики. 2002. №72 (5). С 48– 55.

## **АЛГОРИТМ СТОХАСТИЧЕСКОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ ИЗОБРАЖЕНИЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ В ВЫСОКОМ РАЗРЕШЕНИИ**

**Ю. В. Супонев, А.В. Диргис, И. С. Эйсмонт, В. В. Скакун**

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

*E-mail: [usuponev@gmail.com](mailto:usuponev@gmail.com)*

Разработан и интегрирован плагин для программы ImageJ. Плагин полностью реализует метод реконструкции изображений в сверхвысоком разрешении dSTORM, включая все основные шаги алгоритма – от считывания стека изображений, до восстановления изображения в высоком качестве. Реализован наглядный графический интерфейс, интуитивно понятный пользователю. Программно реализован алгоритм локализации молекул, а также предложены и внедрены методы фильтрации молекул. Модификации позволяют применять программный продукт в условиях некачественной подготовки экспериментальных образцов. Алгоритмы протестированы и демонстрируют высокую скорость работы в сравнении с конкурентами

*Ключевые слова: флуоресцентная микроскопия; сверхвысокое разрешение; dSTORM; локализация одиночных молекул.*

Со времён нидерландского ученого Антони ван Левенгука (XII век) микроскопия вошла в биомедицину и биологию в качестве основного инструмента исследования и эксперимента, позволяя учёным изучать мельчайшие структуры жизни. Именно изучение тончайших структур живой материи позволяет медикам изобретать эффективные препараты,

диагностировать и предотвращать возможные заболевания на ранних стадиях.

За последние три столетия огромное количество технологических разработок и прорыв в производстве позволили улучшить качество оптики, однако волновая природа света ставит ограничение на разрешающую способность оптического микроскопа, называемое дифракционным пределом. Для стандартного микроскопа предел разрешающей способности составляет  $\sim 200$  нм [1]. Одним из распространенных способов преодоления данного барьера является использование флуоресцентной микроскопии. После введения концепции флуоресцентной микроскопии появилось несколько методов, которые позволяют получать изображения с супер-разрешением, приближающимся к молекулярному масштабу. В последние годы методы флуоресцентной микроскопии демонстрируют разрешающую способность около 15-30 нм [2].

Среди множества методов преодоления предела разрешающей способности микроскопа выделяется семейство стохастических методов, при использовании которых переход молекул в возбужденное состояние разрежен по времени, позволяя таким образом детектировать одиночные молекулы. Это достигается путем перевода большинства флуорофоров в обратимое неактивное состояние и стохастической активации отдельных флуорофоров, например, при облучении светом соответствующей длины волны и интенсивности. Соответственно, для работы метода требуются специальные фотоактивируемые или фотоконвертируемые флуоресцентные белки [3]. Последующее детектирование флуоресценции одиночных молекул производится с использованием широкоугольного флуоресцентного микроскопа, оборудованного чувствительной камерой. Если вероятность активации является достаточно низкой, то большинство активированных флуорофоров, находящихся в своем активном состоянии, разнесены дальше, чем предел разрешения, и их положения могут быть точно определены (локализованы) путем аппроксимации функции рассеяния точки (point-spread function) к измеренному распределению яркости.

Этот цикл фотоактивации и считывания повторяется много раз, в результате чего получается стек изображений. Важным условием при анализе данных является то, что в любой момент времени в пределах области, ограниченной дифракцией, излучает только один флуорофор. В заключение изображение с супер-разрешением реконструируется из центров локализованных одиночных молекул.

Одним из стохастических методов получения супер-разрешения является метод dSTORM (direct stochastic optical reconstruction microscopy) [4]. Метод dSTORM предполагает выполнение следующих основных

этапов: получение стека изображений, сегментация источников излучения, определение центров излучения с помощью аппроксимации функции интенсивности по гауссовскому профилю, исключение неподходящих молекул по ряду критериев, а также реконструкция конечного изображения в супер-разрешении [4].

На данный момент времени имеется несколько программных реализаций метода dSTORM – gainSTORM, QuickPALM и др. Однако вследствие того, что отсутствует стандартное решение, распространяемое под свободной лицензией, разработка собственного алгоритма актуальна и востребована. Таким образом, целью данной работы является разработка и программная реализация алгоритма, реализующего метод dSTORM.

Для сегментации одиночных молекул был выбран метод определения локальных максимумов [5]. Метод предусматривает проход по матрице пикселей каждого кадра в стеке и сравнение яркости пикселя со всеми соседними. Данный подход позволяет локализовать большее число источников излучения даже в случае их высокой плотности и частичного перекрытия. Реализована функция отсеивания найденных локальных максимумов по порогам интенсивности для исключения шумовых излучений из дальнейшего анализа. Каждый источник излучения на изображении представляется функцией рассеяния точки. Задача определения истинного положения источника излучения реализована путем аппроксимации распределения интенсивности локализованного источника методом наименьших квадратов, которое представляется моделью двумерной гауссовой функцией согласно формуле:

$$f(x, y) = L_{Bg} + L_G \exp\left(-\frac{(x - m_x)^2}{2\sigma_x^2} - \frac{(y - m_y)^2}{2\sigma_y^2}\right), \quad (1)$$

где  $f(x, y)$  – значение функции модели в точке  $(x, y)$ ,  $m_x$  и  $m_y$  – математическое ожидание функции по  $x$  и  $y$  координатам,  $\sigma_x$  и  $\sigma_y$  – среднеквадратическое отклонение функции по  $x$  и  $y$  координатам,  $L_G$  – параметр, определяющий высоту Гауссовой функции и  $L_{Bg}$  – уровень фона.

В качестве метода оптимизации выбран градиентный метод Левенберга-Марквардта, в качестве целевого критерия – приведенный к 1 критерий качества  $\chi^2$ . Начальные приближения параметров вычисляются по методу нахождения центра излучателя. Реализован ряд пользовательских фильтров для отсеивания локализованных излучателей по параметрам найденной аппроксимации, таких как полная ширина на половине высоты и удаленность найденного центра от оценки, полученной по методу вычисления центра.

Алгоритм реализован в качестве подключаемого плагина для программы ImageJ и разработан на языке Java. ImageJ широко применяется

в биомедицинских исследованиях, астрономии, географии и других дисциплинах, связанных с анализом изображений, а открытый API и доступная документация позволяют разработчикам гибко и эффективно разрабатывать функциональность за счёт подключаемых плагинов. Процесс и локализации молекул и аппроксимации по Гауссу распараллелен для эффективного выполнения на всех ядрах центрального процессора.

Разработанный и запрограммированный алгоритм протестирован на искусственных и реальных изображениях. Суммарное изображение стека из 9990 реально полученных кадров альфа-тубулина размером 128x128 пикселей представлено на рис. 1.

Была произведена предварительная фильтрация найденных кандидатов локальных максимумов, соответствующих фоновому шуму, путем построения гистограммы яркости для участков фона и отсеиванию по пороговому значению. Время локализации молекул составило суммарно (сегментация и определение точного положения) 10,8 с при 47 000 найденных после фильтрации молекулах, что составляет ~1 мс/кадр (против ~10мс/кадр, демонстрируемых программой gainSTORM на аналогичном стеке). Высокая скорость работы алгоритма достигается за счет параллелизации процесса сегментации и поиска гауссовой аппроксимации, гибкого отсеивания некачественных кандидатов локальных максимумов, а также использования компилируемого языка программирования Java. Тестовые вычисления производились на 6-ти ядерном ЦПУ Intel i7, 2,6 ГГц.

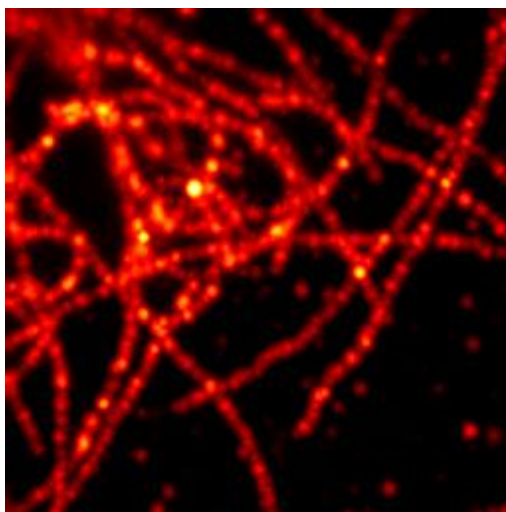


Рис. 1. Суммарное изображение стека, белок альфа-тубулин

Для оценки качества разработанного алгоритма произведено сравнение результата работы с программой QuickPALM (рис. 2). Результаты демонстрируют большую состоятельность метода в отсеивании шумовых участков благодаря качественной фильтрации.

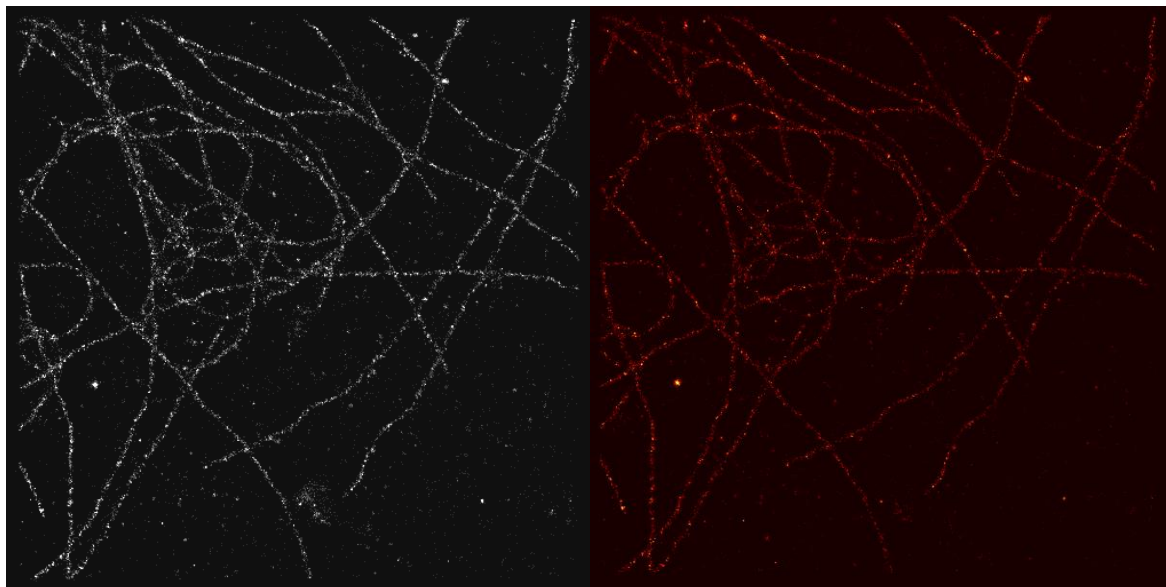


Рис. 2. Демонстрация работы алгоритма на реальном изображении белка альфа-тубулина: слева, изображение, полученное с помощью разработанного алгоритма, справа – сравнение с работой программы QuickPALM

Таким образом, разработанная программа предоставляет большую гибкость в фильтрации кандидатов локальных максимумов, достигая при этом более высокой скорости выполнения при отсутствии потери качества выходного изображения.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Beyond the diffraction limit // Nature Photonics. 2009. №3. 361 с.
2. Schidorsky S., Yi X., Razvag Y. et al. Synergizing Superresolution Optical Fluctuation Imaging With Single Molecule Localization Microscopy // Methods Appl. Fluoresc. 2018. Vol. 6 №4-045008.
3. Sebastian L., Löschberger A., Klein T. et al. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes // Nature Protocols 2011. № 6. P. 991–1009.
4. Rust M. J., Bates M., Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) // Nature Methods. 2006. № 3(10). P. 793–796.
5. Rees E., Erdelyi M., Kaminski-Schierle G. et al. Elements of image processing in localization microscopy // Journal of Optics. 2013. № 15. 094012.