

ОПТИЧЕСКИЕ ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 612.117.5 : 535.51

О ВЛИЯНИИ ДИФРАКЦИИ НА РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ЦИТОФОТОМЕТРИИ*

И. Г. Пальчикова^{1,2}, Л. В. Омелянчук³, Е. С. Смирнов²

¹Конструкторско-технологический институт научного приборостроения СО РАН,
630058, г. Новосибирск, ул. Русская, 41
E-mail: palchikova@tdisie.nsc.ru

²Новосибирский государственный университет,
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

³Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН,
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

С помощью экспериментов и теоретического рассмотрения выявлено влияние дифракции на результаты компьютерной цитофотометрии. Показано, что относительная погрешность, вносимая дифракцией, существенно зависит от оптических характеристик объекта: размера и поглощения. Определено, что в компьютерной цитофотометрии для измерения длины геномов различных организмов благоприятен выбор стандартов, обладающих меньшей концентрацией ДНК в ядрах, имеющих большие размеры. Теоретически и экспериментально доказана возможность учёта систематической ошибки, вносимой дифракцией, без цифровой обработки каждого микроизображения, связанной с выполнением процедур деконволюции с функцией рассеяния точки микроскопа.

Ключевые слова: дифракция Френеля, функция рассеяния точки микроскопа, ДНК, цитофотометрия.

Введение. В современной микроскопии количество вещества, способного поглощать свет в биологическом препарате, может быть найдено методами цифровой обработки изображений. Наиболее известной задачей такого рода, часто возникающей в медицине и биологии, является цитофотометрическое определение количества ДНК в клеточном ядре, окрашенном по Фельгену. Численная оценка оптической плотности окрашенных структур позволяет судить о содержании в них ДНК на основе закона Бугера — Ламберта — Бэра. Цитофотометрические методы определения ДНК рассмотрены в [1, 2]. Ранее разработаны следующие цитофотометрические методы: сканирование, двух- и многоволновой, фотоэмульсионный и интегральный. В последнее время наиболее точным признан метод сканирования [3] с помощью стандартного сканера "Vickers M86". Альтернативным и более перспективным подходом в этой области может оказаться применение аппаратуры на основе цифровой техники [4–6]. Развивая данный подход, мы стали использовать современные камеры с повышенной дигитализацией, нашли способ учёта блика оптики, что оказалось полезным для задачи определения содержания ДНК в ядре [7, 8].

В результате дифракции света в микроскопе точка предмета изображается в виде кружка рассеяния, а в хорошо коррелированных оптических системах — в виде кружка Эйри [9]. Современные методы обработки цифровых изображений позволяют исключить этот эффект путём выполнения операции деконволюции, если определена функция рас-

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 12-08-00396-а) и Сибирского отделения РАН (междисциплинарные интеграционные проекты № М51 и № К41).

сеяния точки (ФРТ) системы. Анализу дифракции в микроскопе посвящён ряд работ, в частности [10], в которой найдена пороговая величина интенсивности в изображении края прозрачной микрополоски, определяющая местоположение геометро-оптической границы. Однако в ней не затрагиваются цитофотометрические аспекты. Систематическая погрешность, вносимая дифракцией в результат вычисления интегральной оптической плотности ядра, задаётся алгоритмом обработки цифровых микроизображений. В [11] предложен феноменологический способ учёта изменения пропускания края в изображении клетки (или ядра), вызванного дифракционным рассеянием света, путём модификации алгоритма сегментации. В разработанном нами [7, 4] алгоритме процедура сегментации для нахождения границы клеточного ядра отсутствует. В связи с чем рассмотрение вклада погрешности, вызванной дифракцией, представляет особый интерес.

Цель данной работы состоит в рассмотрении вклада дифракции в цитофотометрические измерения при различных размерах и пропусканиях клеточного ядра, окрашенного по Фельгену.

1. Теоретическое рассмотрение дифракции. Цифровая обработка микроизображений, полученных в монохроматическом свете для целей компьютерной цитофотометрии, включает следующие шаги [7]:

1. Исключение блика оптики путём вычитания микроизображения препарата китайской туши из микроизображения фотометрируемого ядра.

2. Выделение на цифровых изображениях ядер с вычтенным бликом субимиджей собственно ядра и прозрачного участка, расположенного рядом с ним. Последний используется для определения среднего по субимиджу уровня серого, который в дальнейших расчётах равнозначен интенсивности I_0 света, падающего на ядро. Уровень серого каждого пикселя субимиджа собственно ядра нормируется на средний уровень серого. Полученное таким образом цифровое изображение состоит из чисел, пропорциональных коэффициенту пропускания света участками ядра.

3. Приравнивание оптической плотности каждого пикселя к логарифму коэффициента пропускания, взятому с обратным знаком (согласно закону Бугера — Ламберта — Бэра [1]).

4. Расчёт содержания ДНК в ядре пропорционально сумме оптических плотностей во всех пикселях изображения.

Размытие изображения вследствие дифракции вносит специфическую ошибку, подобную ошибке распределения. Распределение интенсивности в микроизображении определяется в результате свёртки распределений интенсивности в геометро-оптическом изображении и ФРТ микроскопа. Каждая точка предмета представлена в виде кружка рассеяния, что приводит, во-первых, к дифракционному размытию границы изображения, во-вторых, к изменению значения интенсивности в точках, удалённых от границы (согласно закону сохранения энергии). Если определена ФРТ микроскопа, то путём выполнения операции деконволюции возможно уменьшить размытие изображения границы. Однако в компьютерной цитофотометрии одной из основных задач является вычисление оптической плотности каждого пикселя изображения и первостепенное значение приобретают непростые вопросы нормировки распределений интенсивности и ФРТ.

Задача оценки вклада дифракции в ошибку цитофотометрических измерений решается нами в декартовых координатах в двумерном приближении Френеля [9] скалярной теории дифракции Кирхгофа в монохроматическом случае. Ядро заменяется модельным объектом в виде прямоугольной полоски с функцией τ пропускания амплитуды световой волны:

$$\tau = 1 - A \operatorname{rect}(x_0/L_x) \cdot \operatorname{rect}(y_0/L_y), \quad (1)$$

где $L_x \times L_y$ — физические размеры полоски (мкм); A — коэффициент поглощения по

амплитуде; (x_0, y_0) — декартовы координаты на плоскости полоски.

Оптическая схема построения изображения включает микрообъектив с увеличением M и числовой апертурой NA , размер (X, Y) выходного зрачка определяется числовой апертурой, и в расчётах форма зрачка принимается квадратной.

В геометро-оптическом приближении распределение интенсивности $I_{\text{geo}}(x, y)$ в плоскости изображения с декартовыми координатами (x, y) запишется в виде

$$I_{\text{geo}}(x, y) = I_0/M^2 \{1 - A^2 \text{rect}(x/ML_x) \cdot \text{rect}(y/ML_y)\} \quad (2)$$

(здесь I_0 — интенсивность падающей однородной световой волны).

В дифракционном приближении интеграл свёртки для распределения интенсивности в плоскости изображения имеет вид

$$I_c(x, y) = \frac{I_0}{M^2} \left| 1 - A \int_{\xi_1}^{\xi_2} \sin c\xi d\xi \int_{\eta_1}^{\eta_2} \sin c\eta d\eta \right|^2 \quad (3)$$

в случае когерентного освещения и

$$I_n(x, y) = \frac{I_0}{M^2} \left| 1 - A^2 \int_{\xi_1}^{\xi_2} \sin c^2 \xi d\xi \int_{\eta_1}^{\eta_2} \sin c^2 \eta d\eta \right| \quad (4)$$

в случае некогерентного освещения.

Пределы интегрирования задаются как

$$\xi_{1,2} = \frac{2NA}{M\lambda} \left(x \mp \frac{ML_x}{2} \right); \quad \eta_{1,2} = \frac{2NA}{M\lambda} \left(y \mp \frac{ML_y}{2} \right), \quad (5)$$

где λ — длина световой волны. Условия нормировки обсуждаются далее при определении оптической плотности образцов.

Найденные таким образом распределения интенсивности позволяют рассчитать оптическую плотность дифракционного изображения объекта в когерентном D_c и некогерентном D_n случаях, пропорциональную содержанию ДНК:

$$D_{c,n} = \int_{-\infty}^{\infty} \int \log_{10} \left(\frac{I_0}{M^2 I_{c,n}} \right) dx dy. \quad (6)$$

При сравнении оптических плотностей, рассчитанных в различных приближениях, отдельный интерес вызывает вопрос нормировки распределений интенсивности. Обычная нормировка основывается на законе сохранения энергии, и в дифракционных задачах это приводит к введению нормировочных коэффициентов, полученных путём интегрирования сравниваемых распределений интенсивностей по всему пространству. В данном случае рассматривается поглощающий объект на светлом (полностью пропускающем) фоне, поэтому из соображений сходимости интегралов требуется некоторая модификация процедуры. Будем считать, что среда ядра является оптически неактивной и количество поглощённой энергии одинаково для обоих случаев (геометро-оптического и дифракционного рассмотрения). Это условие позволяет рассчитать нормировочный коэффициент A_{nor} и оптическую плотность объекта при геометро-оптическом рассмотрении как

$$D_{\text{geo}} = L_x L_y M^2 \log_{10} \left[\frac{1}{A_{\text{nor}}(1 - A^2)} \right]. \quad (7)$$

Коэффициент $A_{\text{ног}}$ находится отдельно для когерентного и некогерентного освещения.

Систематическая ошибка определения количества ДНК оценивается общепринятым способом с помощью относительной погрешности:

$$S_c = (D_{\text{geo}} - D_c)/D_{\text{geo}} \quad (8)$$

в случае когерентного освещения и

$$S_n = (D_{\text{geo}} - D_n)/D_{\text{geo}} \quad (9)$$

в случае некогерентного освещения. Все численные расчёты осуществлялись в программной среде Mathcad 14.

2. Методика экспериментов. Эксперименты проводились на цитофотометрической установке, описанной в [4], с использованием двух типов объектов.

Первый тип специальных тестовых объектов разработан нами, в частности, для оценки влияния дифракции на точность цитофотометрических измерений.

Выделенные и рассмотренные основные требования к процессам регистрации и обработки микроизображений для цитофотометрии дали возможность установить процедуру калибровки [4] цифровых камер для цитофотометрических устройств. Накопленный нами опыт подтверждает, что набор следующих типовых стандартных тестовых объектов: объекта-микрометра, тест-объекта «светящаяся точка», фотометрического клина, многоступенчатых спектрометрических ослабителей, тест-объекта «линейная решётка» — позволяет выполнить полную калибровку цитофотометрической установки. Для целей калибровки цитофотометрической установки мы разработали тестовый объект (рис. 1), объединяющий функции вышеперечисленных тест-объектов.

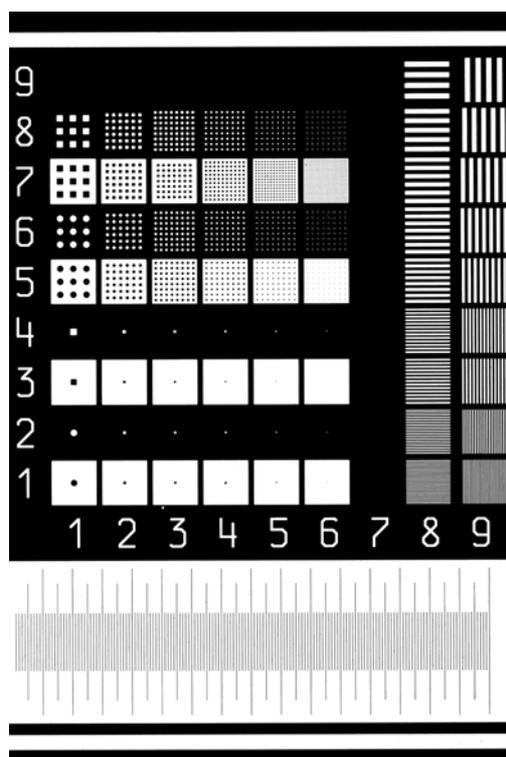


Рис. 1. Фотография специального тестового объекта для цитофотометрии

№ п/п	Вид	ДНК, пг	Тип клеток	Поглощение A^2	Размер, мкм	S_n	S_c
1	Gallus domesticus (цыплёнок)	1,25	Эритроциты	$0,71 \pm 0,049$	$(3,8 \times 2) \pm 0,16$	0,171	-0,092
2	Danio rerio (рыба)	1,68–1,80	Эритроциты	$0,7 \pm 0,051$	$(4,8 \times 2,6) \pm 0,19$	0,143	0,096
3	Homo sapiens (человек)	3,50	Лейкоциты	$0,76 \pm 0,095$	$(5 \times 5) \pm 0,45$	0,132	-0,006
4	Rana arvalis (лягушка)	4,65–7,17	Эритроциты	$0,78 \pm 0,07$	$(8,6 \times 5) \pm 0,34$	0,118	0,02

Микрообъекты выполнялись в плёнках хрома, покрывающих стеклянную подложку, методами электронно-лучевой и фотолитографии. Пропускание подложек варьировалось в пределах 0,1–0,9.

Тестовый объект содержит шкалы и тестовые фигуры в виде кружков и квадратов. Характерные размеры кружков (квадратов) составляют следующий ряд: 3, 5, 7, 9, 11 и 22 мкм. Точность исполнения размеров $\sim(0,1-0,3)$ мкм. Шкала в нижней части объекта имеет длину 1 мм с ценой деления 0,01 мм.

Влияние дифракции на точность цитофотометрического метода экспериментально оценивалось по микроизображениям третьего и седьмого рядов изображения тестового объекта на рис. 1.

Второй тип — это биологические тестовые объекты. При изготовлении тестовых препаратов использовались неделящиеся ядра клеток крови нескольких биологических видов, что позволило избежать естественного разброса содержания ДНК, связанного с фазой её синтеза. Препараты окрашивались специфичным в отношении ДНК реактивом Шиффа после гидролиза соляной кислотой по методу Фельгена. Реакция окрашивания строго специфична и характеризуется стехиометрическим связыванием молекулы красителя с основаниями ДНК. Это общепринятый метод подготовки препаратов для определения количества ДНК в клетке с помощью цитофотометрии. Методика окраски описана в работе [1]. Для построения калибровочных зависимостей выбраны виды, указанные во втором столбце таблицы, в третьем столбце приведены данные по содержанию ДНК, взятые из базы [12], в четвёртом — тип клеток, в пятом и шестом — поглощение ядер и их размеры, усреднённые по десяти микроизображениям. В седьмом и восьмом столбцах приведены рассчитанные значения S_n и S_c для перечисленных видов.

3. Результаты и обсуждение. Математическое моделирование влияния дифракции на результаты компьютерной цитофотометрии выполнялось на основе формул (1)–(9) в программной среде Mathcad 14. Цитофотометрические измерения проводились с зелёным светофильтром, поэтому в расчётах использовалась величина $\lambda = 0,551$ мкм, что соответствует максимуму поглощения препаратов, окрашенных по Фельгену. Экспериментальные данные получены на микроскопе с галогенным осветителем. Микроизображение строилось с помощью объектива $40\times$ с числовой апертурой $NA = 0,65$ [4, 7]. На рис. 2, *a, b* приведены расчётные распределения интенсивности в сечении изображения квадратного объекта размером 5×5 мкм с коэффициентом поглощения по интенсивности 0,76. В геометро-оптическом приближении квадратное изображение должно иметь размер 200×200 мкм. На графике величина интенсивности вне изображения принята за единицу, местоположения геометро-оптической границы обозначены вертикальными прямыми.

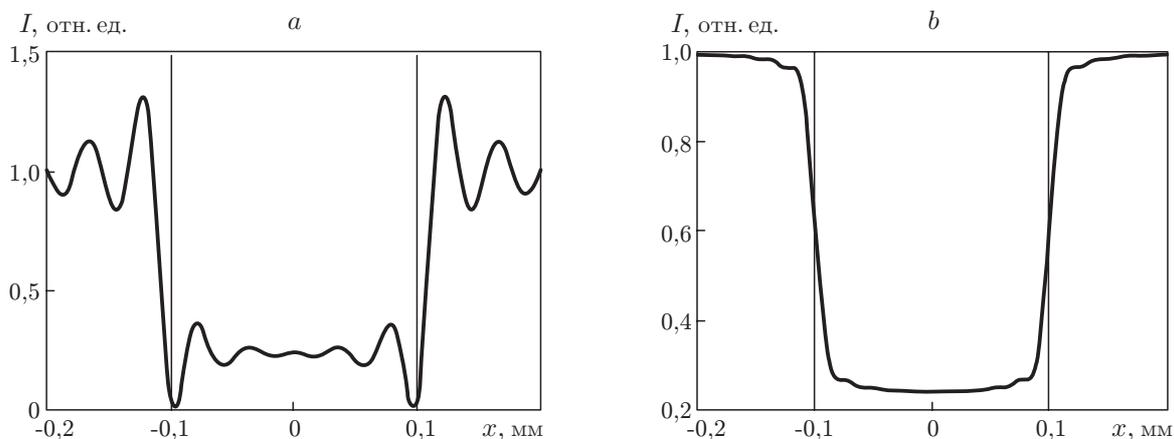


Рис. 2. Расчётные распределения интенсивности: *a* — когерентное, *b* — некогерентное освещение

Из сравнения графиков на рис. 2, *a, b* следует, что когерентное освещение приводит к гораздо более сильному перераспределению интенсивности света, чем некогерентное. Появляются пики, превышающие средний уровень более чем на 30 %. Изображение окружено светлым ореолом (в микроскопе). Эти артефакты должны в значительной степени влиять на интегральную оптическую плотность в процессе определения количества ДНК.

На рис. 3 показаны графики распределения пропускания микроизображений ядер биологических тестовых препаратов, перечисленных в таблице, в сечениях, близких к диаметральному. Можно видеть, что распределение пропускания имеет плато в центре ядра, величина которого варьируется для различных организмов. (Пропускание фона условно принято за единицу.)

Характер кривых на рис. 3 приводит к заключению, что условия микрофотографирования биологических препаратов соответствуют некогерентному освещению. Вследствие дифракции изображение уширяется, пропускание в центре картины колеблется.

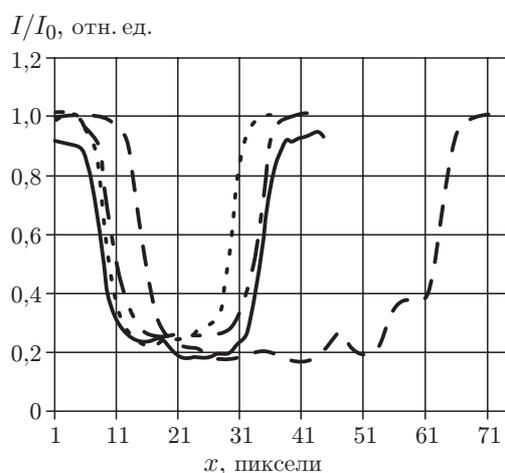


Рис. 3. Зависимость пропускания микроизображений ядер биологических тестовых препаратов от координаты вдоль линии сечения. Один пиксель соответствует 0,183 мкм (штриховая кривая — *Rana arvalis*, сплошная — *Homo sapiens*, штрихпунктирная — *Danio rerio*, пунктирная — *Gallus domesticus*)

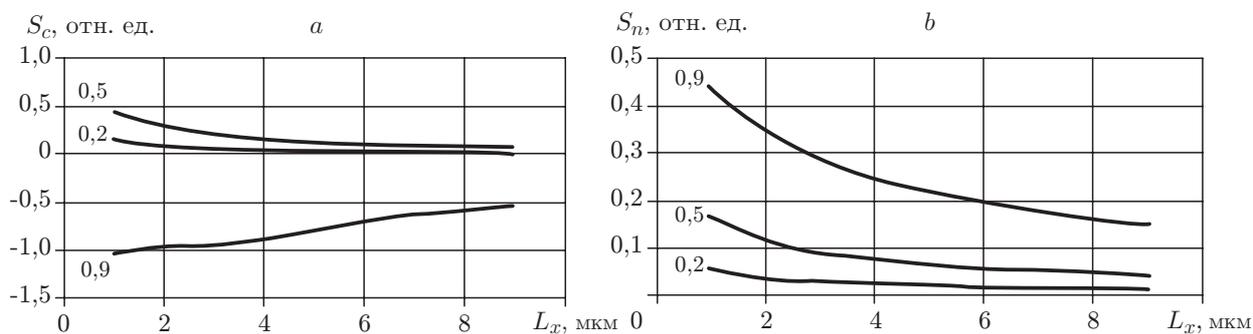


Рис. 4. Расчётные графики зависимости относительной погрешности от размера L_x квадратного объекта и коэффициента поглощения A^2 : a — когерентное, b — некогерентное освещение

Перераспределение интенсивности света в изображении из-за дифракции ведёт к появлению специфической систематической ошибки в определении количества ДНК, сходной с ошибкой распределения. Очевидно, что относительная погрешность должна зависеть от размеров объектов и их пропускания. С помощью формул (1)–(9) проведён расчёт относительной погрешности в случаях когерентного и некогерентного освещения (рис. 4). Зависимости носят плавный характер, погрешность уменьшается по мере увеличения размера объекта. Расчёты подтверждают предположение о большем искажении результатов при когерентном освещении: для малых объектов ошибка S_c резко возрастает, достигая недопустимо больших и отрицательных величин (более 100 %) для поглощения 0,9. При некогерентном освещении ошибка S_n существенно меньше по величине, чем S_c . Можно видеть, что в случае объектов с бóльшим поглощением (0,9) цитофотометрические измерения количества ДНК крайне неточны: для мелких объектов (~ 1 мкм) относительная ошибка может достигать 50 %. Для объектов с поглощением 0,5 ситуация также неблагоприятная: для мелких объектов относительная ошибка больше 16 %. Наиболее благоприятен для цитофотометрических измерений случай ядер с поглощением 0,2. Для объектов размером 3 мкм и более относительная ошибка, связанная с дифракцией, составляет менее 3 % и уменьшается по мере увеличения объекта.

Правильность расчётов подтверждается экспериментами по фотометрии тестовых квадратов (см. рис. 1). Изображения брались при тех же условиях, что и для биологических тестов. Обсчёт цифровых микроизображений по алгоритму, изложенному в разд. 1, позволил построить зависимости, аналогичные показанным на рис. 4. И в этом случае D_{geo} определяется с помощью формулы (7). Поглощение измерялось на обширном тёмном участке тестового объекта (см. рис. 1). Размеры квадратов выбирались согласно указанным на чертежах тестового объекта (соответствующие экспериментальные точки на рис. 5 отмечены тёмными кружками и ромбами) и измерялись по высококачественным изображениям, полученным на материаловедческом микроскопе "Axio Imager.D1m" (фирмы "Carl Zeiss", Германия) (соответствующие экспериментальные точки на рис. 5 отмечены тёмными треугольниками и светлыми квадратами). Усреднение проводилось по девяти тестовым квадратам. Сплошные линии 2 и 3 степенных трендов построены по двум сериям экспериментальных точек. Серии 1 (треугольники) и 2 (кружки) выполнялись для тестовых объектов с поглощением 67 %, серии 3 (ромбы) и 4 (светлые квадраты) — для тестовых объектов с поглощением 99,8 %. Очевидно хорошее соответствие экспериментальных и расчётных данных. Пунктирная и штриховая линии на рис. 5 отражают результаты теоретических расчётов S_c и S_n . График зависимости $S_c(L_x)$ практически совпадает с линией 2 тренда, что свидетельствует о высокой точности расчётов.

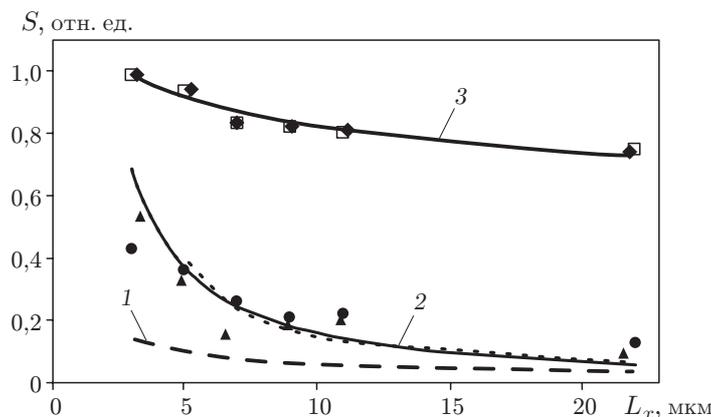


Рис. 5. Расчётные зависимости и экспериментальные данные для относительных погрешностей S_n (кривая 1) и S_c (совпадает с линией тренда 2)

Вопрос о выборе организмов, которые могли бы служить стандартами для измерения длины геномов, обсуждался в [13] и не является легкоразрешимым. Результаты нашего исследования показывают, что биологические тестовые препараты для цитометрии, проводимой с помощью микроскопии и окраски по Фельгену, должны дополнительно удовлетворять критерию малости ошибки, связанной с дифракцией. Благоприятен выбор стандартов, обладающих меньшей концентрацией ДНК в ядрах, имеющих большие размеры. Это обеспечивает условия, при которых дифракционная ошибка невелика (см. рис. 4).

Факт зависимости дифракционной ошибки от размера ядра и его пропускания, а также её систематичность побудили нас искать способ её учёта в калибровочных кривых, построенных с помощью биологических тестовых объектов.

Алгоритм цифровой обработки позволяет определить интегральную оптическую плотность D_n микроизображений, искажённых дифракцией. Учёт дифракционных эффектов в приближении Френеля даёт возможность рассчитать относительную погрешность S_n , если известны размеры ядра и его среднее пропускание. В этом случае можно внести поправку в найденное экспериментально значение D_n , используя формулу (9):

$$D_{\text{geo}} = D_n / (1 - S_n). \quad (10)$$

Если такую поправку сделать в значениях плотностей, найденных для тестовых препаратов нескольких стандартных видов, удаётся внести дифракционную поправку в калибровочную зависимость. На рис. 6 показаны расчётные и экспериментальные данные для построения калибровочной зависимости (треугольники — экспериментальные данные [4, 8] без корректировки дифракции, 1 — степенная линия тренда, 2 — калибровочная зависимость, построенная с учётом дифракционной ошибки, кружки — скорректированные данные). Для удобства сравнения хода линий стандартные ошибки средних значений не показаны.

Поведение линий калибровки следует из (10). Пусть \bar{S}_n — среднее значение погрешности по выборке стандартных видов. В нашем случае $\bar{S}_n = 0,141$. Тогда для отдельно взятого вида $S_n = \bar{S}_n + \delta S$. Величина скорректированного значения оптической плотности составит

$$D_{\text{geo}} = \frac{D_n}{1 - \bar{S}_n} \left(1 + \frac{\delta S}{1 - \bar{S}_n} \right). \quad (11)$$

Первое слагаемое описывает сдвиг линии калибровки в целом, второе — изменение наклона.

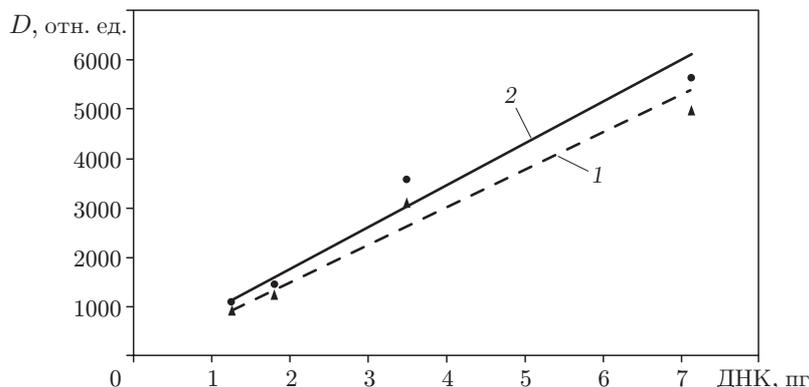


Рис. 6. Калибровочные зависимости, использующие содержание ДНК в ядрах клеток крови стандартных видов

Из рис. 6 видно, что учёт дифракционной ошибки привёл к подъёму калибровочной линии в целом на некоторую среднюю величину и изменению её наклона. Интерполяция линии 2 в направлении уменьшения значений абсциссы выявляет её пересечение с нулём, в то время как линия 1 этого не демонстрирует. Интерполяция калибровочных линий даёт возможность использовать их для оценки количества ДНК в ядрах малого размера.

Заключение. В результате рассмотрения влияния дифракции на точность определения количества ДНК в ядре клетки найдены аналитические выражения, позволяющие провести математическое моделирование дифракции при построении микроизображения и рассчитать распределения интенсивности и оптической плотности в изображении модельного объекта при когерентном и некогерентном освещении. Показано, что относительная погрешность, вносимая дифракцией, существенно зависит от размера объекта и его поглощения, достигая 50 % при значительном поглощении (~ 90 %) и малом размере объекта (менее 2 мкм). Определено, что в компьютерной цитофотометрии для измерения длины геномов различных организмов благоприятен выбор стандартов, обладающих меньшей концентрацией ДНК в ядрах, имеющих большие размеры.

В данной работе найден способ корректировки дифракционной ошибки для линий калибровки, связывающих содержание ДНК (пикограммы) в ядрах клеток крови стандартных видов с измеренным значением интегральной оптической плотности, полученной путём обработки цифровых микроизображений по алгоритму из [4, 7]. Теоретически и экспериментально доказана возможность учёта и уменьшения (вплоть до исключения) систематической ошибки, вносимой дифракцией, без цифровой обработки микроизображений, связанной с выполнением процедуры деконволюции с ФРТ микроскопа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Агроскин Л. С., Папаян Г. В.** Цитофотометрия. Аппаратура и методы анализа клеток по светопоглощению. Л.: Наука, 1977. 295 с.
2. **Darzynkiewicz Z., Halicka H. D., Zhao H.** Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. **676**. P. 137–147.
3. **Rasch E. M.** Feulgen-DNA cytophotometry for estimating C-values // *Drosophila Cytogenetics Protocols. Ser. Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press, 2003. Vol. 247. P. 163–201.
4. **Пальчикова И. Г., Омелянчук Л. В., Пальчиков Е. И. и др.** Особенности применения цифровых камер для цитофотометрического определения количества ДНК в ядрах клеток // *Датчики и системы*. 2012. № 3. С. 2–12.

5. **Puech M., Giroud F.** Standardisation of DNA quantitation by image analysis: Quality control of instrumentation // *Cytometry*. 1999. **36**. P. 11–17.
6. **Wyngaard G. A., Rasch E. M., Connelly B. A.** Unusual augmentation of germline genome size in *Cyclops kolensis* (Crustacea, Copepoda): further evidence in support of a revised model of chromatin diminution // *Chromosome Res.* 2011. **19**, N 7. P. 911–923.
7. **Омелянчук Л. В., Семешин В. Ф., Алексеева А. Л. и др.** Интегральный метод измерения количества ДНК в клетке с использованием цифровой микрофотографии // *Цитология*. 2010. **52**, № 4. С. 349–353.
8. **Семешин В. Ф., Омелянчук Л. В., Алексеева А. Л. и др.** Содержание ДНК в ядрах *Cyclops kolensis* и *C. insignis* (Crustacea, Copepoda) // *Цитология*. 2011. **53**, № 3. С. 285–289.
9. **Goodman J. W.** Introduction to Fourier Optics. N. Y.: McGraw Hill Book Company, 1968. 363 p.
10. **Nyssonen D.** Linewidth measurement with an optical microscope: the effect of operating conditions on the image profile // *Appl. Opt.* 1977. **16**, N 8. P. 2223–2230.
11. **Haroske G., Meyer W. D., Theissig F., Kunze K. D.** Increase of precision and accuracy of DNA cytometry by correcting diffraction and glare errors // *Analytical Cellular Pathology*. 1995. **9**, Is. 1. P. 1–12.
12. **Animal Genome Size Database.** URL: <http://www.genomesize.com> (дата обращения: 03.05.2012).
13. **Suda J., Leitch I. J.** The quest for suitable reference standards in genome size research // *Cytometry A*. 2010. **77**, N 8. P. 717–720.

Поступила в редакцию 3 мая 2012 г.
