

Изготовление цветовой калибровочной меры для компьютеризированного гистологического анализа

Г. Р. Сагателян, Е. Р. Пискунова, А. С. Кузнецов

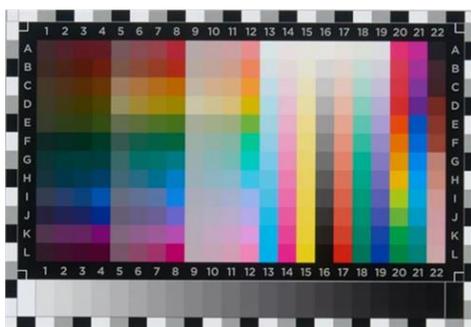
Московский государственный технический университет им. Н. Э. Баумана, Москва, Россия

Разработаны конструкция и технологический процесс мелкосерийного производства цветовой калибровочной меры для корректировки показаний, считываемых с ПЗС-матрицы компьютеризированных оптических микроскопов перед проведением гистологического анализа биотканей в автоматическом режиме. В отличие от применяемых в настоящее время аналогов, изготовленных на полимерном носителе, разработанная калибровочная мера создана на основе применения стандартизованных оптических цветных стёкол. Это позволяет идентифицировать реальные цвета гистологических красителей при больших увеличениях, избегая ошибок, связанных с зернистостью изображения, создаваемой пигментами эмульсии окрашенных полимеров. Разработанный технологический процесс включает разрезание пластин на прямоугольные длиной 4 мм, толщиной 1 мм и шириной 2-5 мм, их двухстороннюю групповую шлифовку и полирование с использованием промежуточного носителя и наклеивание на два покровных стекла. В результате создаётся набор цветных полей в габаритах предметного стекла 75×25 мм толщиной 2 мм.

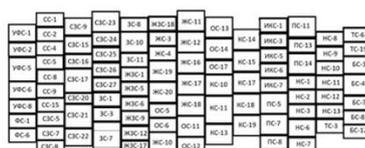
Ключевые слова: Оптическая микроскопия, гистологический анализ, цветные калибровочные меры, цветные оптические стёкла, предметные и покровные стёкла, склеивание бальзаминол; двухсторонняя шлифовка; двухстороннее полирование.

Цитирование: Сагателян, Г. Р. Изготовление цветовой калибровочной меры для компьютеризированного гистологического анализа / Г. Р. Сагателян, Е. Р. Пискунова, А. С. Кузнецов // HOLOEXPO 2023: 20-я Международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям : Тезисы докладов. — СПб.: Изд-во СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2023. — С. 347–350.

Автоматизированная калибровка оптических микроскопов при поведении компьютеризированного гистологического исследования и анализа биотканей невозможна без применения цветных эталонов (цветных калибровочных мер). В настоящее время в этих целях используют стандартизованные калибровочные меры (КМ), предназначенные для настройки цветных принтеров [1]. Такие КМ изготавливают на основе окрашенных полимерных плёнок, что создаёт принципиальные затруднения идентификации цвета при характерных для гистологии больших увеличениях вследствие создания пигментами красок зернистой структуры на изображении эталона. Для решения данной проблемы предлагается вместо КМ на окрашенной полимерной основе (рис. 1, а), разработать и изготавливать КМ на основе цветных оптических стёкол (рис. 1, б).



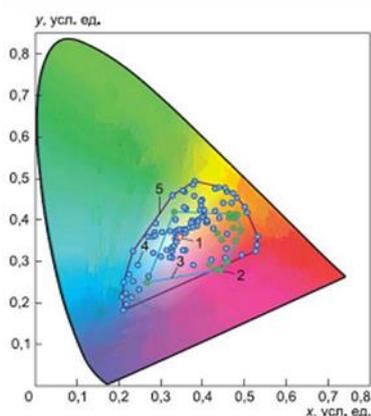
а)



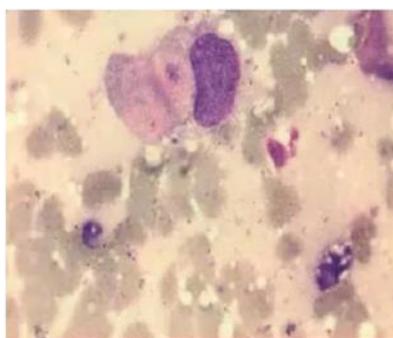
б)

Рис. 1. Цветовые калибровочные меры: IT8 эталон, изготовленный окрашиванием полимера (а) и набор полей, составленных из комплекта цветных оптических стёкол (б) [2]

Целью калибровки цвета является измерение и настройка цветового отклика устройства до известного состояния, которое задаётся диаграммой цветности ху (рис. 2, а), построенной для стандартного осветителя D_{50} . Первым шагом настройки оптической системы микроскопа является задание цвета в виде координат стандартного белого для стандартного осветителя с минимизацией отклонения реально считанного сигнала, содержащего искажения, обусловленные применением конкретного осветителя микроскопа в сочетании со спектром чувствительности его ПЗС-матрицы. Внесённые поправки координат запоминаются. Далее считывается сигнал с поля КМ, цвет которого расположен наиболее близко к цвету использовавшегося красителя на диаграмме (см. рис. 2, а). Стандартные координаты этого цвета известны из проведённых ранее исследований [2].



а)



б)



в)

Рис. 2. Диаграмма цветности (а), окрашивание цитоплазмы при коллоидном раке (б) и набор цветных стёкол для светофильтров оптических приборов (в): 1 – точка белого для стандартного осветителя D_{50} ; 2 – координаты цветности гистологических красителей; 3 – целевая область для разработки гистологических КМ; 4 – координаты цветности стёкол набора; 5 – область идентифицируемых разработанной КМ цветов

Рассчитываются отклонения цветовых координат считанного сигнала от стандартных для данного поля. Краситель оказывается идентифицированным, если отклонения цветовых координат, считанные с красителя, оказываются не более соответствующих отклонений

ближайшего цветового поля КМ. Технологический процесс мелкосерийного производства разработанных КМ может быть реализован как в производственных, так и в лабораторных условиях. Он включает следующие основные технологические операции:

- склеивание стёкол набора в пачки (рис. 3, а). Стандартным размер стёкол 40x40 мм, а толщина их различна и составляет 2 – 6 мм. Пачки получаются разновысотными, но их высота не должна превышать ширины стандартного предметного стекла размером 75x25 мм;

- разрезание пачек на полосы (рис. 3, б). Ширина полос из соображений технологичности одинакова и принята равной 4 мм с тем, чтобы обеспечить размещение на стандартном предметном стекле все стёкла набора. Формируются комплекты полос (рис. 3, в) из склеенных цветовых полей;

- наклеивание двух комплектов полос на два предметных стекла с в соответствии с эскизом на рис. 1, б с последующим склеиванием обоих предметных стёкол по свободным от цветовых полей поверхностям. Образуются склеенные сборочные единицы (блоки), содержащие обращённые наружу два комплекта цветовых полей, наклеенных на сердцевину, образованную двумя склеенными предметными стёклами;

- групповая двухсторонняя доводка (шлифовка), выполняемая на станке эксцентриковом станке настольного исполнения, описанном в работе [3]. Доводимая группа состоит из шести заготовок, размещённых по две в трёх сепараторах диаметром 100 мм, которые, в свою очередь, размещают в общем сепараторе. Одновременно доводятся шесть заготовок, из которых в дальнейшем получают двенадцать КМ;

- двухстороннее полирование на станке, прототип которого описан в работе [3]. Станок позволяет полировать одновременно два блока, размещённых в описанном выше сепараторе диаметром 100 мм;

- переблокировка, заключающаяся в расклеивании друг от друга предметных стёкол, наклеивании на отполированные поверхности наборов цветовых полей покровных стёкол размером 25x75 мм, отклеивании предметных стёкол от своих наборов цветовых полей и склеивании между собой двух покровных стёкол с образованием новых блоков.

- повторение операций шлифовки и полирования;

- расклеивание друг от друга склеенных ранее покровных стёкол и наклеивание по второму предметному стеклу на только что отполированные поверхности наборов цветовых полей.

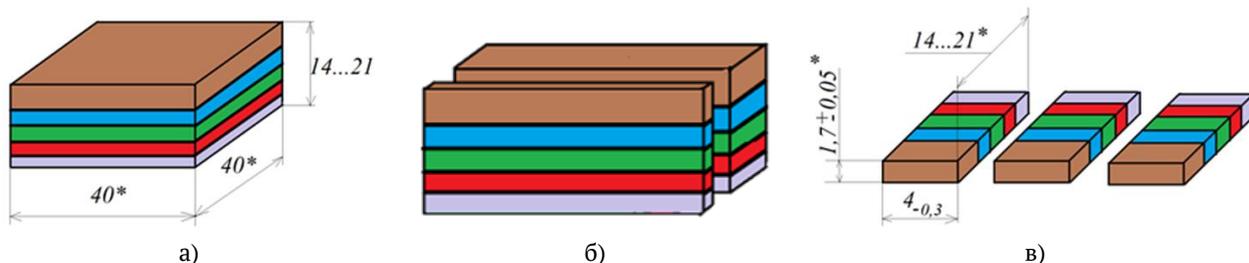


Рис. 3. Склеивание стёкол набора в пачку (а), разрезание пачки (б) и полученные полосы (в)

Таким образом, аналитически обоснована возможность применения для изготовления цветowych полей калибровочной меры стёкол из набора цветowych фильтров оптических приборов. Показана возможность мелкосерийного производства в лабораторных условиях калибровочных мер, создающих достаточное количество полей в требуемом цветовом диапазоне, используя набор из 97 светофильтров, представляющих собой плоскопараллельные пластины из оптических стёкол с известными спектрами пропускания размером 40x40 мм.

Список источников

- [1] **ISO 12641:2016-1.** Graphic technology - Prepress digital data exchange – Color targets for input scanner calibration - Part 1: Color targets for input scanner calibration.
- [2] **Махов, Д. С.** Цветовая мера для калибровки систем цифровой микроскопии / Д. С. Махов, Г. Р. Сагателян, А. В. Самородов // Измерительная техника. – №10, 2021. – С. 60 – 63.
- [3] **Сагателян, Г. Р.** Станок новой конструкции для двухстороннего полирования оптических плоскопараллельных пластин прямоугольной формы / Г. Р. Сагателян, Е. Р. Пискунова, Н. Н. Дубовик, А. С. Кузнецов // HOLOEXPO 2022: Тезисы докладов. XIX международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям, Санкт-Петербург, 20–22 сентября 2022 года. – Барнаул: Индивидуальный предприниматель Колмогоров Игорь Александрович, 2022. – С. 435-440. – EDN VEBGFG.

Making of the color target for computerized histological analysis

G. R. Sagatelian, E. R. Piskunova, A. S. Kuznetsov

Bauman Moscow State Technical University, Moscow, Russia

The design and technological process of small-scale production of a color calibration standard for correcting the readings read from the CCD array of computerized optical microscopes before conducting histological analysis of biological tissues in an automatic mode have been developed. Unlike currently used analogues made on a polymer carrier, the developed calibration standard was created on the basis of the use of standardized optical colored glasses. This makes it possible to identify the real colors of histological stains at high magnifications, avoiding errors associated with the graininess of the image created by the pigments of the colored polymer emulsion. The developed technological process includes cutting the plates into rectangular plates 4 mm long, 1 mm thick and 2-5 mm wide, their double-sided group grinding and polishing using an intermediate carrier, and gluing onto two cover slips. As a result, a set of color fields is created, in the dimensions of a standard glass slide 75x25 mm 2 mm thick.

Keywords: Optical microscopy, Histological analysis, Color calibration standards, Colored optical glasses, Slides and coverslips, Balsam bonding; Double-sided grinding; Double sided polishing.