



УДК 58.086+576.08+57.086.88

ДНК-цитометрия изображений в исследовании растений: обзор

М. Г. Куцев^{1, 2, 3*}, М. В. Скапцов^{1, 4}, А. М. Колтунова^{1, 5}, О. В. Уварова^{1, 6}

¹ Алтайский государственный университет, пр. Ленина, д. 61, г. Барнаул, 656049, Россия

² Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, д. 79, г. Красноярск, 660041, Россия

³ E-mail: m_kucev@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2284-6851>

⁴ E-mail: mr.skaptsov@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4884-0768>

⁵ E-mail: koltunova.anas@yandex.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3753-7958>

⁶ E-mail: uwarowa@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-3318-5163>

* Автор для переписки

Ключевые слова: гибриды, полиплоиды, проточная цитометрия, размер генома, растения, цитометрия изображений, FCM, ICM.

Аннотация. В обзоре основное внимание уделено цитометрии изображений растительных клеток, используемой для установления уровней ploidy и размера генома растений. Представлены примеры основных исследований растений с применением метода анализа статических изображений ядер, используемые красители, методы пробоподготовки, анализа данных, используемое лабораторное оборудование и программное обеспечение. Также приводятся области применения цитометрии изображений в исследовании сосудистых растений. Немаловажным параметром любого метода является воспроизводимость и сравнительные характеристики относительно других методов. В статье приводится сравнение абсолютных значений измерений размера геномов растений, произведенных методами цитометрии изображений и проточной цитометрии, а также необходимые минимальные параметры, обеспечивающие точность измерений и ограничения метода. Обзор будет полезен при планировании эксперимента по анализу содержания ДНК без использования дорогостоящего оборудования – проточных цитометров, а только на основе данных оптической или флуоресцентной микроскопии.

DNA imaging cytometry in plant analysis: a review

M. G. Kutsev^{1, 2}, M. V. Skaptsov¹, A. M. Koltunova¹, O. V. Uvarova¹

¹ Altai State University, Lenina Pr., 61, Barnaul, 656049, Russian Federation

² Siberian Federal University, Svobodny Pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russian Federation

Keywords: FCM, flow cytometry, genome size, hybrids, ICM, image cytometry, plants, polyploids.

Summary. The review focuses on image cytometry of plant cells, used to determine the ploidy level and genome size of plants. The review presents examples of basic plant studies using the method of analyzing static images of nuclei, the dyes used, sample preparation methods, data analysis, laboratory equipment and software. It also provides an application of the image cytometry in the study of vascular plants. An important parameter of any method is reproducibility and comparative characteristics relative to other methods. The article compares absolute values of plant genome size

measurements made by image cytometry and flow cytometry, as well as the necessary minimum parameters to ensure measurement accuracy and limitations of the method. The review will be useful when planning an experiment on DNA content analysis without using expensive equipment – flow cytometers, but only on the basis of optical or fluorescence microscopy data.

Введение

Применение ДНК-цитометрии в систематике растений, клеточной биологии, физиологии и биологии развития включает в себя изучение регуляции цикла клеточного деления и эндоредупликации в развитии растений, а также эффектов абиотического и биотического стресса на эти процессы. Проточная цитометрия привела к широкомасштабным исследованиям и формированию понятия о нуклеотипе, т. е. фенотипическом влиянии количества ядерной ДНК, независимо от ее информационного содержания, на объем ядра, продолжительность митоза и мейоза, размер семян и минимальное время генерации. Проточная цитометрия полезна для выявления полиплоидии, процессов гибридизации, миксоплоидии и химеризма. В таксономии и систематике проточная цитометрия имеет неопределимое значение при анализе способов размножения, исследованиях видообразования и репродуктивной изоляции, описании динамики популяций в гибридных зонах, открытии новых цитотипов и структуры цитотипов в популяции, обнаружении и определении границ видов растений для выявления биоразнообразия, исследовании механизмов эволюции генома растений с акцентом на причины и последствия вариации содержания ядерной ДНК. Результатом анализа в большинстве случаев являются данные об относительном или абсолютном содержании ДНК в ядрах клеток.

Анализ плоидности является фундаментальным методом измерения содержания ДНК в геноме. На протяжении десятилетий основным способом проведения анализа плоидности была проточная цитометрия. Проточный цитометр – это специализированный инструмент для анализа клеток или их органоидов в потоке жидкости. Это удобный лабораторный метод, но дорогостоящий в плане используемого оборудования и не позволяющий на большинстве цитометров сохранять исходный анализируемый материал для последующего или повторного анализа. Система анализа на основе изображений является альтернативой проточной цитометрии, а данные проточной цитометрии возможно использовать в качестве эталона для калибровки системы на

основе изображений. Цель этой статьи – показать применимость цитометрии изображений в анализе растительных объектов, провести сравнение накопленных данных, полученных двумя методами, и оценить возможность широкого применения системы на основе цитометрии изображений в определении плоидности растений и применении в других областях.

Цитометрия изображений (Image cytometry – ICM) представляет собой объединение методов микроскопии и анализа статичных цифровых изображений (Vilhar et al., 2001), особенно полезное для пространственных и денситометрических измерений в цитологии (Chieco et al., 2001; Pektaş et al., 2006). Этот метод широко использовался в изучении плоидности ДНК в медицинских исследованиях и при определении абсолютного значения C-value у растений (Greilhuber, Ebert, 1994; Greilhuber, Obermayer, 1997; Baranyi, Greilhuber, 1999), животных (Gregory, 2001, 2003), исследованиях кинетики ДНК в клеточном цикле, определении состава гетерогенных клеточных популяций и т. п. (Pichugin et al., 2012). Альтернативным названием цитометрии изображений является денситометрия или фотометрическая цитометрия, отличающиеся по способу измерения светопропускания окрашенных ядер, когда измерение производится не на основе фотоснимка ядер, а с помощью денситометра, измеряющего фотопропускание у статичных ядер непосредственно, без получения изображения.

Принимая во внимание эти задачи, производители микроскопов, фотокамер и программного обеспечения интегрировали технологии ICM в обработку данных, но, вместе с тем, она используется не столь широко как проточная цитометрия (Flow cytometry – FCM).

Основное отличие ДНК-цитометрии изображений от проточной цитометрии в том, что анализируется статичное фотоизображение всех ядер одновременно (рис. 1А). В проточной ДНК-цитометрии измерения проводятся последовательно, при этом в классическом варианте регистрируются только импульсы флуоресценции от проходящих через проточную ячейку ядер (рис. 1Б).

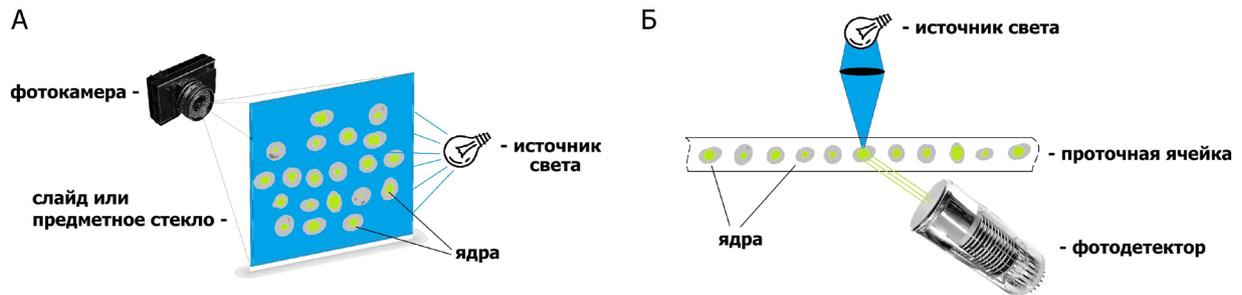


Рис. 1. Принципиальные различия методов цитометрии: А – ДНК-цитометрия изображений; Б – проточная цитометрия.

Основным преимуществом по сравнению с другими методологиями, такими как FCM, является то, что ICM выполняет анализ в образцах с относительно небольшим количеством ядер (Greilhuber, 2008), что позволяет визуально распознавать объекты полуинтерактивным способом для мониторинга интересующих структур (Rodenacker, Bengtsson, 2003) и является экономически доступным для большинства специализированных лабораторий ввиду несоизмеримо низкой стоимости по сравнению с проточными цитометрами. Сообщалось о различных примерах исследований ICM по качественному и количественному анализу ДНК в следующих областях: патология человека, в основном при скрининге онкогенеза на основе анеуплоидии и нестабильности размера генома, диагностика и мониторинг злокачественных меланом и плоскоклеточного рака, неоплазия, количественная оценка размера генома животных и растений, особенно применяемая в таксономических и эволюционных исследованиях и растениеводстве для определения абсолютных значений ядерной ДНК и уровня пloidности у хозяйственно-ценных видов (Rosado et al., 2005; Abreu et al., 2008) и видов естественной флоры (Temsch et al., 1998). Помимо размера ядерного генома, с помощью ICM также определялось содержание ДНК в каждой отдельной хромосоме, что недоступно большинству современных проточных цитометров. Кроме того, часто непреодолимой проблемой проточной цитометрии является автофлуоресценция компонентов растительных клеток, вносящая большие погрешности в измерения содержания ядерной ДНК. Автофлуоресценция – флуоресценция клеточных стенок и внутриклеточных гранул, приводящая к переэкспонированию ядер и завышению показаний цитометра, наблюдается в спорангиях *Gelidium chilense* Santelices et Montalva (Salvador Soler et

al., 2016), а также возможна флуоресценция метаболитов сосудистых растений (Galbraith et al., 2021). При этом цитометрия изображений позволяет визуально вычленить объекты, несвязанные с флуоресценцией ядерной ДНК, которые могут быть ошибочно идентифицированы как целевой сигнал на гистограмме при проведении проточной цитометрии.

Цитометрия изображений используется для измерения содержания ДНК путем оценки оптической плотности ядер (с помощью непосредственной денситометрии или анализа степени затемнения клеточных ядер на изображении), окрашенных по Фельгену, либо оценки уровня флуоресценции ДНК в ядрах, при окрашивании специфическими красителями. В отличие от цитометрии изображений, FCM основана на динамическом измерении флуоресцентного сигнала ядер в потоке жидкости. Оптические измерения ICM проводятся с использованием трех основных инструментов: микроскопа, цифровой фотокамеры и программного обеспечения для анализа изображений. Поскольку ICM применялась в анализе растительных объектов не столь широко, как в клинической диагностике, некоторые авторы отметили, что необходимо провести большое количество статистически значимых исследований, прежде чем этот метод можно будет принять в качестве точного метода определения размера геномов растений (измерения абсолютного содержания ДНК в ядрах). При этом было оценено значение метода при определении пloidности (относительного содержания ДНК в ядрах) растений, которые широко используются в качестве стандартов при количественном определении ДНК каскадным способом: от самых маленьких геномов *Arabidopsis thaliana* L. до средних и крупных – *Solanum lycopersicum* L., *Glycine max* (L.) Merr., *Zea mays* L., *Pisum sativum* L., *Vicia faba* L., *Allium cepa* L. (Praça-Fontes et al.,

2011a, b). Также ДНК-цитометрия на основе изображений ранее была использована при анализе клеточного цикла (Zhao et al., 2022).

Для оценки размера генома видов трибы *Cestreae* (Solanaceae) использовали цитометрию изображений интерфазных и телофазных ядер, окрашенных по методу Фельгена, а в качестве первичного стандарта использовали корневую меристему *Secale cereale* L. 'Dankovske'. Значения размера генома других проанализированных видов трибы *Cestreae* варьировали от 17,61 до 24,95 пг (2С). Кроме того, результаты исследования подтвердили, что цитометрия изображений является альтернативным методом проточной цитометрии, который позволяет определять размер генома практичным и экономичным способом (Frossasco et al., 2015). Также измерение размера генома является неотъемлемой частью исследований растений с применением метода полногеномного секвенирования как для оценки необходимого количества прочтений, так и для выбора алгоритма сборки генома. Для оценки размера генома в ходе полногеномного секвенирования *Olea europaea* L. subsp. *europaea* и *O. paniculata* Roxb. использовалась цитометрия изображений профазных ядер, окрашенных по Р. Фельгену (Mascagni et al., 2022).

Цитометрия изображений может быть использована в селекции растений для выявления полиплоидных комплексов и гибридов. Например, исследования методом анализа статичных изображений бразильских местных видов из рода *Paspalum* L. (Poaceae) позволили охарактеризовать цитогенетический и репродуктивный режим, поскольку его знание важно для программ межвидовой гибридизации (Caceres et al., 1999). ICM также используется при выявлении гибридных сортов и видов растений с разными размерами геномов материнских растений. С помощью ДНК-цитометрии изображений был определен размер ядерного генома материнских растений и соответствующих им семян для выявления уровня плоидности и потенциальных доноров пыльцы. На основании значений 2С все материнские растения имели один из трех уровней плоидности, которые соответствуют октоплоидному *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr. var. *japonica*, гексаплоидному *F. × bohemica* (Chrtek et Chrtková) J. P. Bailey и тетраплоидному *F. sachalinensis* (F. Schmidt) Ronse Decr. На основе анализа размера геномов семян были выявлены основные материнские виды – дооры пыльцы (Strgulc, Dolenc, 2015).

Измерение содержания ДНК в ядрах с помощью ICM используется и для нестандартных применений. В частности, сочетание красителей FDA и PI и визуализация с помощью флуоресцентной микроскопии позволили дифференцировать жизнеспособную, мертвую и стерильную пыльцу у всех из проанализированных видов растений из разных таксономических групп (*Solanum lycopersicum*, *Clivia miniata* (Lindl.) Regel, *Malus domestica* (Suckow) Borkh., *Magnolia stellata* Maxim., *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev., *Olea europaea* L., *Quercus suber* L., *Corylus avellana* L.), а автоматизированный анализ изображений и автоматическая классификация изображений значительно увеличили статистическую мощность анализа жизнеспособности пыльцы (Ascari et al., 2020).

Приборная база

Для количественных измерений ядерной и хромосомной ДНК с помощью ICM система в основном включает компьютер с программным обеспечением для анализа изображений, соединенной с микроскопом с цифровой фотокамерой (Chiarini-Garcia, Melo, 2011; Didenko, 2017). Цифровые изображения получают с препаратов, окрашенных с помощью реакции Фельгена или флуоресцентными красителями, а затем сохраняются на жестком диске.

Большое количество исследований в конце XX – начале XXI вв. проводилось с использованием фотометра, сопряженного с микроскопом – Leitz MPV, или аналогичных приборов, позволявшего в реальном времени измерять светопропускание каждого окрашенного ядра без получения фотоснимков, перемещая предметное стекло от объекта к объекту (рис. 2А). При достаточно высокой точности это рутинный процесс, требовавший сотен замеров и представляющий из себя пример классической денситометрии. Получение промежуточных цифровых фотоснимков и их анализ с помощью специализированного программного обеспечения является дальнейшей эволюцией метода, позволяющего одновременно анализировать сразу десятки и сотни объектов на одном изображении (рис. 2Б).

Примером специализированного оборудования для проведения ICM-анализа на основе световых микроскопов и цифровых изображений может являться DNA Image Cytometer MotiSavant, используемый в клинической диагностике совместно с программным обеспечением Motic Imaging Software (MotiClassify, Motic Inc., Китай).

При соответствующих калибровках, разработке лабораторных протоколов и использовании стороннего программного обеспечения в качестве цитометра изображений возможно исполь-

зовать и обычные микроскопы, работающие в проходящем свете (при окраске ядер по Фельгену) или флуоресцентные и конфокальные микроскопы (при использовании флуорохромов).

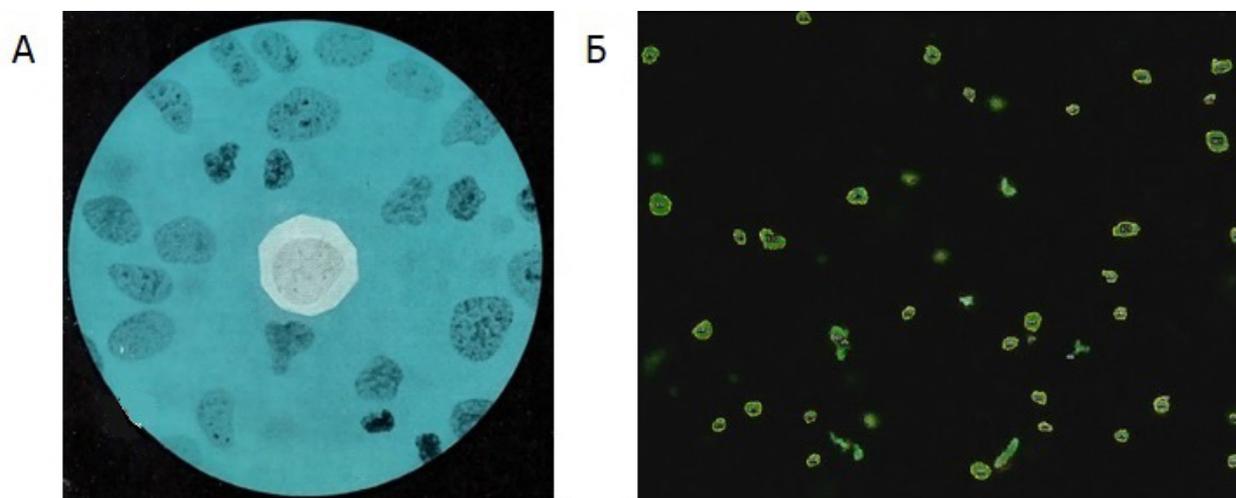


Рис. 2. Принцип измерения параметров светопропускания и флуоресценции ядер: А – ядра, окрашенные по Р. Фельгену в поле зрения денситометра (в центре – пятно измерения) (MPV microscope..., 1994); Б – фрагмент флуоресцентной микрофотографии ядер после полуавтоматической сегментации в ImageJ (не оконтурены объекты неправильной формы).

В частности, в одном из исследований (Praça-Fontes et al., 2011a) измерения ICM проводились с использованием оптического микроскопа, фильтров оптической плотности, цифровой видеокамеры CCD и программного обеспечения для анализа изображений. Тринокулярный фотомикроскоп (Olympus BX-60) был оснащен стабилизированным светом, объективом кратностью $\times 40$ с числовой апертурой 0,75, конденсором Arplanat Achromat с апертурой 1,4, фильтром нейтральной плотности (ND6) и еще одним интерференционным фильтром зеленого цвета (пропускание 550–570 нм). Этот микроскоп был соединен с монохромной цифровой CCD-видеокамерой с разрешением 12 бит, которая, в свою очередь, была соединена с компьютером с программным обеспечением Pro-Plus 6.1 (Media Cybernetics). Для настройки и построения калибровочной прямой микроскопа и цифровой системы использовались ряд фильтров с различной оптической плотностью (Praça-Fontes et al., 2011b).

Из более современных специализированных приборов, работающих не только в проходящем свете, но и с флуоресцирующими объектами стоит отметить цитометры изображений Cellometer™ и Celigo™ (Revvity, США), позволяющие производить анализ процессов апопто-

за, отслеживание клеточного цикла. Также они могут быть использованы как дополнительный инструмент к проточной цитометрии для проверки выделенных популяций клеток (Kuksin et al., 2016). Недостатком данного оборудования является его адаптированность преимущественно для работы с клеточными суспензиями и отсутствие лабораторных протоколов для работы с растительными тканями.

Дальнейшее развитие ICM в плане увеличения чувствительности связано с использованием такого инструмента, как лазерный сканирующий цитометр (LSC) – цитофлуориметр на базе микроскопа, способный обеспечить быстрое, чувствительное и точное измерение флуоресценции отдельных клеток (Pozarowski et al., 2013). Преимущество данной технологии – увеличение скорости получения изображения по сравнению с обычными камерами за счет использования высокочувствительных фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) для считывания сигнала. Этот подход обеспечивает более высокую светочувствительность и динамический диапазон, чем у традиционной цитометрии. В таком устройстве используется в качестве источника излучения лазер, проходящий свет измеряется с помощью фотодиода для создания изображений в светлом поле, а боковой рассеянный свет собирается

с помощью ФЭУ для создания изображений в темном поле. В каждом образце при использовании этого оборудования было зарегистрировано около 4000 событий (Diebold et al., 2013; Munoz, 2020). Однако данный метод имеет большее сходство с проточной цитометрией, а оборудование для его реализации еще более дорогостоящее по сравнению с обычными проточными цитометрами.

Вместе с тем, огромным преимуществом цитометров на основе анализа изображений является то, что они могут быть разработаны в виде портативных приборов, в отличие от проточных цитометров, имеющих очень сложную юстировку оптического блока и подверженных механическим воздействиям (Yang et al., 2017). К настоящему времени апробированы несколько подходов для реализации подобных устройств с возможностью применения вне лаборатории: на основе камеры смартфона (Aslan et al., 2023); с применением микрофлюидных чипов (Yuan et al., 2022); на основе визуализирующей проточной цитометрии, представляющей из себя оптическую микроскопию потока жидкости и анализирующей отдельные фотоизображения (Son et al., 2023).

Реагенты и пробоподготовка

Окрашивание клеток на предметных стеклах в случае применения ИСМ исключает их потерю, которая происходит при пробоподготовке для проточной цитометрии. Таким образом, ИСМ дает преимущество при ее применении к образцам с малым количеством клеток. Еще одним преимуществом ИСМ является то, что он предлагает возможность отбора изображений интересующих клеток во время первоначального измерения для их последующего анализа путем визуализации или окрашивания другими флуорохромами (Didenko, 2017).

Первоначально для ИСМ-анализа окрашивание ДНК в ядрах проводилось с помощью реакции Фельгена с реактивом Шиффа. Альтернативным вариантом проведения измерений в цитометрии изображений является денситометрия или фотометрическая цитометрия, отличающиеся по способу измерения светопропускания окрашенных ядер, когда измерение производится не на основе фотоснимка ядер, а с помощью денситометра, измеряющего светопропускание у статичных ядер непосредственно, без получения изображения.

Реакция Фельгена – классический цитохимический метод, который позволил исследова-

телям обнаружить ДНК как компонент хроматина и хромосом. Положительные по Фельгену изображения имеют пурпурный (красно-фиолетовый) цвет при наблюдении под обычным световым микроскопом или красный цвет при флуоресцентной микроскопии. Предложенная сто лет назад Робертом Фельгеном и Генрихом Россенбеком (Feulgen, Rossenbeck, 1924) реакция Фельгена по-прежнему даёт возможность для новых открытий в различных научных сферах. Реакция Фельгена состоит из двух стадий: кислотный гидролиз, обычно проводимый с использованием раствора HCl; обработка реагентом Шиффа – лейкопроизводным основного фуксина. Содержание ДНК по Фельгену в отдельных ядрах можно измерить и выразить в условных единицах или пикограммах, в зависимости от эталона, с которым сравниваются значения. Классификация содержания ДНК по Фельгену (наименование классов – 1С, 2С, 4С и т. д.), соответствует уровням пloidности гаплоидных, диплоидных, тетраплоидных и т. д. ядер одного и того же вида и используется в большом количестве исследований. Также можно определить промежуточные классы пloidности, которые часто связаны с анеупloidией, потерей ДНК, полиплоидией, функционированием ядер (Mello, de Campos Vidal, 2017).

Окрашивание с помощью реактива Шиффа также применялось при проведении цитогенетического анализа *Passiflora megacoriacea* K. Port.-Utl. с использованием цитометрии изображений, при этом метод ИСМ позволил охарактеризовать не только содержание ДНК в ядрах, но и в отдельных хромосомах, что недоступно методу проточной цитометрии (Lacerda et al., 2019). Аналогичная процедура окрашивания использовалась в ИСМ-исследовании хромосом на примере разных сортов рода *Coffea* L., в результате чего были выявлены различия в содержании ДНК гомологичных хромосом близкородственных сортов (Oliveira, 2017). Метод окрашивания по Фельгену использовался при определении содержания ядерной и хромосомной ДНК в диплоидном и триплоидном цитотипах *Aloe vera* (L.) Burm. f. с использованием *Allium cepa* в качестве калибровочного стандарта, а значения 2С и 4С (33,9 и 67,8 пг соответственно) диплоидного *Aloe vera*, оцененные с помощью цитометрии изображений в данном исследовании, соответствуют более ранней оценке, сделанной на основе проточной цитометрии (Rao et al., 2015).

В качестве альтернативы измерениям поглощения света при окрашивании по Фельгену

можно количественно оценить флуоресценцию ДНК-специфического красителя. Этот метод реализуется путем использования соответствующего источника света для стимуляции излучения определенной длины волны молекулами красителя при связывании его с ДНК клеточных ядер. Количественное определение ДНК в клетках с использованием флуоресцентных красителей является неразрушающим и позволяет сочетать анализ плоидности и S-фазовых параметров с многоцветным анализом антигенов или флуоресцентно-меченных зондов. Преимуществом также является визуальная локализация и характеристики распределения окрашивания внутри клеток и ядер. Кроме того, особенности текстуры хроматина могут быть проанализированы с использованием AT- или GC-специфичных красителей. В одном из первых сравнительных исследований ДНК-специфичных флуорохромов, проведенном с использованием флуоресцентного микроскопа, количественный анализ ДНК в ядрах позволил получить гистограммы с бимодальным распределением ядер с одним 2С и 4С пиками с семью флуорохромами: Hoechst 33342, митрамицином, актиномицином Д, оливомицином, этидий бромидом, пропидий иодидом и квинокрином. Значения CV, рассчитанные по всем клеткам, принадлежащим пику 2С, находились в диапазоне от минимальных 6,7 % для Hoechst 33342 и 8,7 % для митрамицина до максимальных 16 % для квинакринина. Второй тип гистограмм представлял собой непрерывное распространение событий от 2С до 4С пика, наблюдаемое для акридинового оранжевого, хромомицина А3 и DAPI. Эти результаты показывают, что после используемой авторами процедуры фиксации (главным образом в буфере МакИлвейна, рН 7, 10 mM MgCl₂) разные флуорохромы давали гистограммы ДНК, разные по CV, но очень похожие по соотношению флуоресценции 4С/2С (равное 2 или близкое к 2). В условиях этих экспериментов акридиновый оранжевый, хромомицин А3 и DAPI явно не подходили для воспроизводимых измерений ДНК (Santisteban et al., 1992). Однако, при фиксации ядер в смеси уксусная кислота/этанол краситель DAPI зарекомендовал себя наилучшим образом при проведении флуоресцентной цитометрии изображений с целью определения плоидности, а CV составил от 6,1 до 14,4 % при анализе одних и тех же образцов с помощью ICM против 4,9–7,3 % в FCM-анализе (Maciorowski et al., 1997). Таким образом, при

оптимизации протоколов пробоподготовки, в зависимости от типа флуорохрома, потенциально возможно добиться точности измерений с помощью цитометрии изображений сравнимой с проточной цитометрией.

Имеются данные по применению в качестве флуоресцентного красителя при проведении цитометрии изображений бромистого этидия в конечной концентрации 10 мкг/мл после фиксации выделенных ядер в 40 % этаноле. При этом значение CV измеренного относительного содержания ДНК в ядрах стручкового перца достигало 39 %. Но несмотря на это, соотношение G2/G1-стадий клеточного цикла достоверно различалось в зависимости от времени суток на основании критерия Стьюдента. Также авторами дается подробный протокол пробоподготовки ядер (Kolomiets, Glushen, 2019). Бромистый этидий был использован в качестве флуоресцентного красителя при разработке экспресс-метода определения плоидности томатов на основе ICM (Glushen et al., 2013). В отличие от предыдущего исследования, где в составе буфера для выделения ядер перца использована лимонная кислота и тритон X-100, при экстракции ядер томатов использованы сложные буферные растворы, используемые в проточной цитометрии растений (Loureiro et al., 2007). Следует отметить, что бромистый этидий используется иногда в качестве ядерного красителя и в проточной цитометрии, однако имеет значительно худшие показатели по квантовому выходу по сравнению с пропидием иодидом и DAPI. Сильное влияние способа пробоподготовки на результат анализа отмечено вне зависимости от типа используемых красителей – Hoechst 33342, YoPro или пропидий иодидом. При этом оптимальным фиксатором ядер при пробоподготовке и окрашивании являлся этанол (Benchaib et al., 1996).

В то время как проточная цитометрия позволяет быстро измерить уровень плоидности большого количества клеток, она не обеспечивает достаточного пространственного разрешения для анализа неразрушенных тканей. ДНК-денситометрия и анализ изображений флуоресцентно окрашенных ядер с помощью количественных ДНК-красителей позволяют получить подробные пространственные карты эндополиплоидности отдельных тканей, но они довольно трудоемки и имеют низкую производительность в связи с необходимостью подготовки большого количества срезов. В ряде публикаций приводятся результаты исследования с помо-

щью цитометрии изображений морфологии ядер и выявлена корреляция между размерами клеточных структур и эндоредупликацией. При этом наилучшие результаты получены с применением обычной флуоресцентной (Bhosale et al., 2018) или конфокальной микроскопии с окрашиванием ядер DAPI или вообще без окрашивания на примере *Nicotiana tabacum* L. и *Arabidopsis thaliana* (Katagiri et al., 2016; Lavrekha et al., 2017; Pasternak et al., 2017). Окрашивание ядер DAPI с последующей конфокальной микроскопией было применено также в количественной оценке увеличения размера ядра – отличительного признака событий эндоредупликации в корнях *Medicago truncatula* Gaertn. (Carotenuto et al., 2019).

Детальный протокол ICM – пробоподготовки (фиксации ядер, окраски DAPI), обработки изображений, статистического анализа – приводится Рафаэлем Мартин-Мартином с соавторами (Martín-Martín et al., 2023). Предложенный протокол флуориметрического анализа содержания ядерной ДНК позволяет идентифицировать размер генома и уровни пloidности различных жизненных фаз и тканей, измерить до тысячи ядер за один сеанс окрашивания, что позволяет быстро проанализировать изучаемый вид (Martín-Martín et al., 2023). Также метод фиксации и окрашивания с DAPI, подходящий для разных групп растений и апробированный на *Arabidopsis thaliana*, *Raphanus sativus* L., *Pisum sativum* L., *Solanum lycopersicum*, *Vicia faba* и *Allium cepa*, использован для получения в дальнейшем изображений ядер и их цифровой обработки (Carvalho et al., 2011). Стадии клеточного цикла отдельных клеток возможно выявить с помощью флуоресцентной микроскопии. Популяцию клеток в каждой фазе клеточного цикла (G1, S, G2/M) можно определить, применив пороговые значения к интегрированной интенсивности DAPI или с помощью моделирования полученных гистограмм с использованием программного обеспечения для анализа клеточного цикла (Roukos et al., 2015).

В настоящее время появилось значительно большее количество красителей ДНК (более 200 различных коммерческих продуктов), которые потенциально могут быть использованы в цитометрии изображений. При этом основной проблемой их широкого применения является необходимость проведения исследований на разных группах растений для выявления повторяемости, пропорциональности уровня флуоресцен-

ции от размера генома. При испытании новых флуорохромов нужно учитывать их неселективность в окрашивании нуклеиновых кислот (большинство красителей могут взаимодействовать как с ДНК, так и с РНК), поэтому необходимо включать стадию обработки рибонуклеазами для устранения дополнительных ошибок. Также необходима оптимизация параметров выделения ядер, состава сред для их окрашивания, т. к. возможна фотоконверсия флуорохромов с изменением спектральных характеристик (например, DAPI начинает флуоресцировать в зеленом канале) и последующим внесением ошибки в количественные измерения (Żurek-Biesiada, 2015). Это касается и проточной цитометрии даже в большей степени, т. к. исследователь не может визуально оценить смещение спектра флуоресценции флуорохрома, в отличие от цитометрии изображений, которая позволяет при использовании цветных фотокамер оценить изменение цветности флуоресценции.

Альтернативным вариантом окраски ядер с помощью ДНК-специфичных красителей является флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Для исследования эндополиплоидии в плодах томата на клеточном уровне был разработан новый метод, основанный на мечении ДНК с помощью флуоресцентных ДНК-зондов, который позволил напрямую определять уровень пloidности ДНК отдельных ядер в тканях томатов, в отличие от окрашивания DAPI, не имеющего достаточной точности при анализе *in situ* (Bourdon et al., 2011). В случае применения FISH-технологии используемые ДНК-зонды очень специфично связываются с ядерной ДНК, а их уровень флуоресценции строго пропорционален количеству, что, по-видимому, должно было повысить точность измерений. Кроме того, при разработке ДНК-зондов возможно использовать флуорофоры, спектры которых не перекрываются со спектрами автофлуоресценции растительных клеток, что уменьшит фоновую помеху и ошибку измерений.

Сбор и анализ данных

Основными первичными данными ICM являются цифровые изображения ядер. Существует ряд различных пакетов программного обеспечения для анализа изображений, которые можно использовать для широкого спектра измерений. Целью автоматизированной системы получения изображений является сбор, сохранение данных и последующий количественный анализ. Для

точной количественной оценки изображения корректируются с учетом фона путем вычитания изображения, не содержащего окрашенных объектов и изменений эффективности системы по площади изображения (должно быть учтено затенение на краях изображений, вызванное неравномерностью освещения). Затенение оценивается путем измерения стандартного флуоресцентного объекта в разных положениях области изображения (например, флуоресцентных частиц). Ядра клеток автоматически обнаруживаются путем записи их изображений, корректировки изображений по фону и затенению, а также сегментации изображений на области, соответствующие окрашенным ядрам и неокрашенному фону. После обнаружения отдельных ядер можно непосредственно количественно оценить многочисленные свойства отдельных ядер. К этим свойствам обычно относятся площадь, периметр, общая интенсивность флуоресценции при окрашивании ДНК и изменение окраски ДНК внутри ядра. Результатом работы алгоритмов является изображение, показывающее области, автоматически определяемые как ядра. Часто используют дополнительные алгоритмы для представления результатов в виде гистограмм – распределения плоидности ДНК и диаграмм рассеяния для сравнения распределения одного свойства по отношению к другому (Slavík, 1996). В этом случае возможно вычленение нужной области на точечной диаграмме, что часто позволяет повысить точность анализа за счет исключения артефактов.

Поскольку изображения записываются с использованием цифровой пиксельной матрицы, систему необходимо откалибровать, чтобы получить изображения с известными пространственными и денситометрическими параметрами. Так как пиксели не имеют собственного значения, которое зависит от разрешения системы, им приписывают значения пространственной и оптической плотности (ОП) из микрометрической и серой эталонных шкал. Чтобы найти интересующее измерение, площадь ядра или хромосомы умножается на их среднюю ОП, в результате чего получается интегральная оптическая плотность (ИОП). Как правило, значения ОП автоматически оцениваются с помощью программных алгоритмов (Oberhammer et al., 1993; Kajstura et al., 2007). Поскольку показатель ИОП образца эквивалентен содержанию ДНК, это значение можно преобразовать в пикограммы, рассчитав соотношение ИОП растения с

известным размером генома и исследуемого образца. В ряде исследований описаны протоколы ISM для калибровки и настройки системы, а также для количественного определения содержания ДНК в ядрах растений и хромосомах растений (Chiarini-Garcia, Melo, 2011). Представленные протоколы были воспроизводимы в повседневной практике и оформлены в качестве руководства для цитогенетических и цитометрических лабораторий (Heitkam, Garcia, 2023).

Обычно основным результатом анализа в проточной цитометрии является гистограмма, отображающая распределение количества объектов (ядер) по гейтам (уровням поглощения или уровням флуоресценции) в логарифмическом или линейном масштабе. В отличие от проточной цитометрии, которая напрямую собирает интегрированную интенсивность флуоресценции каждой клетки, метод ISM выполняет визуализацию с субклеточным разрешением для большой популяции клеток. В результате сначала выполняется сегментация клеток, а затем агрегируют сигналы поглощения или флуоресценции внутри каждой области клеток, чтобы провести цифровой цитометрический анализ отдельных клеток (Cheng et al., 2021). Обычно это возлагается полностью на компьютерную программу, но при этом пользователю необходимо ввести параметры сегментации (вычленения отдельных объектов) на изображении. Цитометрия изображений имеет сходство с проточной цитометрией в том, что операции гейтирования могут выполняться на популяции объектов непосредственно после обработки изображения и представляться в виде, аналогичном проточным цитометрам. Кроме того, цитометр изображений способен захватывать флуоресцентные изображения, что позволяет измерять данные о площади ядер и интенсивности флуоресценции, что может являться аналогами таких показателей в проточной цитометрии, как прямое рассеивание и флуоресценция объектов.

Примером бесплатного программного обеспечения может являться BlobFinder (Allalou et al., 2009), которое предназначено для ограниченного типа приложений, что делает его простым в использовании, легким в освоении и оптимизированным для конкретной задачи. BlobFinder может выполнять пакетную обработку данных изображения и количественно определять, а также локализовать клетки и точечные источники сигналов на изображениях флуоресцентной микроскопии быстрым и простым способом.

Примерами коммерческих программ для анализа изображений могут являться FCS Express (совместная разработка De Novo Software и Thermo Fisher Scientific, США), а также программное обеспечение для анализа изображений Columbus и Acapella Studio (PerkinElmer, США).

Достаточно мощным инструментом для анализа изображения является программное обеспечение CellProfiler (McQuin et al., 2018), при этом последующая обработка первичных данных – построение точечных диаграмм и гистограмм содержания ДНК – производится с помощью сопутствующего ПО – CellProfiler Analyst, бесплатного, удобного для пользователя инструмента для контролируемой классификации, не требующего навыков программирования (Dao et al., 2016).

Для анализа изображений ядер, окрашенных флуоресцентными красителями, используется программное обеспечение MetaMorph (Molecular Devices, Канада). Это связано с тем, что данный пакет программ используется во многих работах. Кроме того, это программное обеспечение содержит все необходимые инструменты для простого и точного измерения интегральной флуоресценции и многих других параметров окрашенных ядер (например, площади, из которой можно экстраполировать объем ядра, и т. д.). Тем не менее, это коммерческий продукт, и, следовательно, он не может свободно использоваться из-за своей стоимости. Однако существует несколько альтернатив бесплатного программного обеспечения, сравнимых (по функциям и результатам) с MetaMorph. Примерами альтернативных программ являются ImageJ или Fiji (Schindelin et al., 2012), которые способны проводить те же измерения, но изначально являются бесплатными и с открытым исходным кодом, что позволяет многим программистам постоянно их совершенствовать. Из надстроек ImageJ, специализированных для обработки количественных признаков в цитометрии изображений следует отметить FISHji – макросы ImageJ для количественного определения флуоресценции изображений с окрашиванием пропидием иодида (Fontenete et al., 2016). Результаты исследования *Medicago truncatula* указывают на то, что 3D Object Counter является наиболее эффективным скриптом анализа изображений Fiji/ImageJ в толстых срезах корней растений, а его применение надежно выявляло процессы эндоредупликации (Carotenuto et al., 2019).

Оригинальный подход к обработке данных ИСМ в программном обеспечении для FCM был

реализован, когда данные после сегментации изображения и первичной обработки были импортированы непосредственно в FlowJo V10.6 (FlowJo), который автоматически преобразовал файлы .CSV в формат файла Flow Cytometry Standard (FCS). Пиковые средние значения, CV и пропорции фаз клеточного цикла были определены с помощью FlowJo в соответствии с моделью Watson-Pragmatic для фазовой деконволюции (Jónás et al., 2022). Однако необходимость использования последовательно нескольких приложений часто ставит под угрозу простоту метода. Кроме того, выигрыш в скорости анализа часто снижается из-за времени, затрачиваемого на изучение сложного программного обеспечения.

Перспективным направлением в анализе данных ИСМ является применение искусственного интеллекта для сегментации изображения. Ранее успешно была применена система классификации изображений хромосом растений с помощью глубокого обучения искусственного интеллекта (ИИ), с которым могут легко работать неспециалисты. С помощью этой системы на базе Create ML можно было легко построить модели, подходящие для собственных образцов. В качестве примеров могут служить модели, построенные путем обучения с использованием изображений хромосом различных видов растений. Далее после обучения ИИ стало возможным классифицировать изображения, содержащие митотические клетки, среди образцов изображений ядер растений, ранее не используемых для обучения (Nagaki et al., 2021).

Сравнение с данными проточной цитометрии

Для проверки надежности цитометрии изображений и измерения содержания ядерной ДНК в растительном материале были проведены независимые эксперименты в двух лабораториях с использованием различных инструментов анализа изображений для денситометрического измерения количества ядерной ДНК в окрашенных по Фельгену препаратах кончиков корней (Vilhar et al., 2001). Содержание ядерной ДНК (2С) у девяти изученных видов различалось в 100-кратном диапазоне (приблизительно от 0,3 до 33 пг). Оценки содержания ядерной ДНК, измеренные методами цитометрии изображений, были сопоставимы со значениями, полученными ранее с использованием как фотометрической цитометрии, так и проточной цитометрии. Методы цитометрии изображений показали небольшие различия между повторными экс-

периментами в каждой лаборатории или между разными операторами, использующими один и тот же прибор. Кроме того, метод интерфазного пика (измерение нескольких сотен интерфазных ядер на предметное стекло) был сопоставим с классическим подходом профазы/телофазы (измерение десяти ядер ранней профазы и десяти ядер поздней телофазы на предметном стекле). Следовательно, цитометрия изображений ДНК дает точные и воспроизводимые результаты и может использоваться в качестве альтернативы проточной цитометрии при измерении содержания ядерной ДНК растений. В этом исследовании предложено использовать два стандарта контроля качества измерения содержания ядерной ДНК в цитометрии изображений ДНК растений: коэффициент вариации CV пика должен быть ниже 6 % и соотношение 4С/2С должно находиться в пределах от 1,9 до 2,1 (Vilhar et al., 2001). При этом для обычной проточной цитометрии рекомендованы значения $CV \leq 2\%$, а при превышении порога 5 % должен быть оптимизирован протокол пробоподготовки или произведена настройка и очистка прибора (Sliwinska, 2022). Оптимальное количество проанализированных ядер с применением методов цитометрии изображений, рекомендованных для применения в медицинской диагностике, составляет не менее 250 шт. (Besse et al., 2023), что сравнимо с оптимальным количеством ядер для ДНК-цитометрии изображений растений. Анализ данных ICM паренхимы зрелых листьев перца *Capsicum annuum* показал, что оптимальное количество анализируемых клеточных ядер составляет 300–350 шт. При большем количестве измерений стандартное отклонение и среднее значение относительного содержания ДНК не менялось (Kolomiets, Glushen, 2017), при этом для метода проточной цитометрии рекомендованное минимальное количество проанализированных ядер составляет 1000 шт. (Sliwinska, 2022).

Важным аспектом любого метода измерения является межлабораторная воспроизводимость и повторяемость результатов. Сравнение методов ICM и FCM в одном эксперименте ранее не проводилось для растительных объектов, однако имеется множество исследований на человеческих тканях в ходе измерения содержания ДНК в опухолевых клетках. В частности, в исследовании V. Z. Jónás с соавт. (Jónás et al., 2022) было показано, что основная идея использования двумерных изображений вместо анализа объ-

ектов в потоке дает аналогичную информацию о содержании ДНК клеточных популяций, а метод ICM дал результаты измерения относительного содержания ДНК в клеточных популяциях, которые были сопоставимы с результатами метода FCM. Ранее была предпринята попытка стандартизации метода ICM применительно к растительным объектам, основной целью которых являлось решение проблем, связанных со стандартизацией ДНК-цитометрии на основе изображений, таких как нестабильность измерительной системы, нелинейность измерений оптической плотности, необходимость коррекции неравномерности освещенности поля зрения и однородности интегрированного измерения оптической плотности по всему полю зрения. Кроме того, авторы описали процедуры снижения воздействия электронного шума при обработке изображений и денситометрической калибровке измерительной системы, разработали макрос для ICM растений с использованием общего пакета программного обеспечения для анализа изображений, а описанные процедуры контроля качества были взяты из международных медицинских стандартов (Vilhar, Dermastia, 2002). Несмотря на детальную проработку методологии, широкого внедрения в исследованиях растений данные нормативы не получили, в отличие от жесткого регламента проведения медицинских исследований с применением цитометрии изображений (Besse et al., 2023).

Детальные исследования повторяемости измерений флуоресцентного ICM и FCM на растительных объектах проведены на примере динофлагеллят, в результате которых было выявлено, что точность и достоверность измерений ДНК с помощью ICM были значительно выше при использовании флуорохрома DAPI по сравнению с SYBR® Green I. Также было обнаружено, что Milli-Q H₂O превосходит Tris-EDTA в качестве раствора для окрашивания и подготовки слайдов для ICM-анализа, менее сильное увеличение объектива (10× по сравнению с 20×) при получении изображений для ICM обеспечивало более высокую точность измерений ядерной ДНК. Общая точность анализа ICM окрашенных DAPI клеток была сопоставима с FCM, с соответствующими коэффициентами вариации пика ДНК 1С всего лишь 6,2 % (Jónás et al., 2022). В ходе данного исследования использовался инвертированный микроскоп с флуоресцентным модулем Zeiss Axio Observer A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Йена, Германия) и проточный цитометр

BD LSRFortessa™ (BD Biosciences). В некоторых исследованиях отмечается даже более высокая точность статичной цитометрии по сравнению с проточной при окраске фиксированных ядер с помощью флуорохромного красителя DAPI. Так, анализ *Pisum sativum* дал более точные результаты содержания ДНК в случае цитометрии изображений (CV = 5,0 %) по сравнению с проточной цитометрией (CV = 6,5 %) (Levi et al., 1986).

Ошибку в измерениях может вносить не только неравномерность окрашивания, но и несовершенство оптической системы микроскопов, используемых для ICM. В тесте на стабильность измерений значений оптической плотности пикселей ядер выявлено, что при окрашивании по Фельгену коэффициент вариации между пикселями составляет CV = 0,68 %. После применения теста на линейность оптической плотности была получена линейная корреляция R² = 0,999 и стандартное отклонение CV = 1,54 % между рассчитанными и измеренными значениями оптической плотности. Для теста на однородность один и тот же набор ядер был помещен в разные позиции поля зрения, при этом рассчитанный CV был ниже 1 %, а коэффициент вариации интегральной оптической плотности для разных

ядер составил от 0 до 5,4 % (Praça-Fontes et al., 2011b).

Средние значения 2С всех растений статистически сравнивали со значениями, приводимыми разными авторами, с использованием проточной цитометрии и/или ICM (табл. 1). Эти данные продемонстрировали, что ICM является точным и надежным методом измерения значения 2С, представляя собой хорошую альтернативу проточной цитометрии. Отклонение значений 2С между FCM и ICM будет еще менее значительным, учитывая тот факт, что разные авторы использовали различные первоначальные стандарты или один и тот же стандарт, но с отличающимся содержанием ДНК (Skaptsov et al., 2024). Сравнение результатов также показало, что *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* и *Vicia faba* являются наиболее адекватным первичным стандартом ввиду наименьших отклонений значений ICM и FCM (в пределах 2,55–7,68 %). Однако содержание ДНК 2С в эталонном стандарте должно быть близко к содержанию в образце, поэтому необходим поиск большего количества стандартных видов для перекрытия всей шкалы содержания ДНК в ядрах растений (от 0,3 до 180 пг).

Таблица 1

Сводные данные размеров геномов, полученные на основе цитометрии изображений и проточной цитометрии

Объект исследования	Данные проточной цитометрии (Leitch et al., 2019), пг	2С, пг (Vilhar et al., 2001)	2С, пг (Praça-Fontes et al., 2011a)	2С, пг (Praça-Fontes et al., 2011b)	Отклонение значений ICM и FCM (%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,32 (Bennet et al., 2003)	0,33	0,33	0,33	+3,10
<i>Raphanus sativus</i>	1,11 (Doležel et al., 1992)	1,02	1,06	1,19	От -7,27 до +8,18
<i>Solanum lycopersicum</i>	2,12 (Kron et al., 2012)	–	1,95	2,10	От -0,94 до -8,02
<i>Glycine max</i>	2,26 (Greilhuber, Obermayer, 1997)	2,34	2,41	2,65	От +3,54 до +17,26
<i>Zea mays</i>	5,50 (Bennett, Smith, 1976)	5,32	5,57	5,64	От -3,27 до +2,55
<i>Pisum sativum</i>	9,80 (Bennett, Smith, 1976)	8,84	9,35	9,35	От -9,80 до -4,59
<i>Vicia faba</i>	26,70 (Bennett, Smith, 1976)	25,59	28,75	27,70	От -4,16 до +7,68
<i>Allium cepa</i>	33,50 (Van't Hof, 1965)	30,83	37,55	37,22	От -7,97 до + 11,10

В исследовании *Eucalyptus globulus* Labill., *E. grandis* W. Hill и *E. urophylla* S. T. Blake с помощью FCM и ICM статистический анализ выявил несоответствие содержания ядерной ДНК в зависимости от использованного стандартного вида и от того, использовался ли FCM или ICM. Результаты показали, что значения ДНК 2С, полученные с помощью FCM и ICM, были

наиболее однородными, когда в качестве стандарта использовался *Solanum lycopersicum*. При этом полученные значения варьировали в пределах 12 % при применении FCM и в пределах 13 % при использовании метода ICM. Разница измерений размера генома с помощью FCM и ICM составляла для разных видов эвкалипта от 8 до 14 %. Основной причиной несоответствия

авторы считают влияние метаболитов и разную пробоподготовку материала (Praça-Fontes et al., 2009). Часто широкое применение того или иного метода связано с начальными этапами его внедрения, техническими ограничениями или традиционными предпочтениями исследователей. Так, например, до настоящего времени в исследованиях размеров геномов грибов основную долю занимают анализ с помощью цитометрии изображений и полногеномное секвенирование, и лишь незначительное количество данных (менее 5 %) получено с применением проточной цитометрии (Čertnerová, 2021), в то время как в исследованиях растений диаметрально противоположная ситуация – с подавляющим преобладанием методов FCM, несмотря на то, что первые измерения размера генома выполнялись с использованием денситометрических методов. Основная причина, по-видимому, отражена в простом тезисе – «Загадочным недостатком статической цитометрии (т. е. в основном денситометрии по Фельгену), который не объясняется ни пресловутым малым размером выборки, ни техническими трудностями, является тот простой факт, что многие опубликованные результаты ненадежны по неизвестным и не отслеживаемым причинам» (Greilhuber et al., 2005). По-видимому, это не так в сопоставлении с данными FCM, а преимуществом статической цитометрии является отсутствие «мусора», поскольку

ку измеряются только ядра (Dolezel et al., 2007). Обычно эталоном для оценки настроек приборов являются флуоресцентные калибровочные частицы. Проведенные исследования зеленых флуоресцентных частиц с помощью проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, США) и флуоресцентного микроскопа дали сходные показатели CV на уровне 8,26–9 %, что указывает на потенциальные технические возможности цитометрии изображений, сравнимые с проточной цитометрией по точности (рис. 3). Проблемами, общими для обеих технологий, являются систематическая ошибка, вызванная изменением компактности хроматина и вмешательством вторичных метаболитов в процесс окрашивания. Одна из особенностей FCM состоит в том, что измерения ядер проводятся без визуального отбора, что можно считать более объективным из-за отсутствия человеческого фактора, хотя в последнее время все ICM исследования, в том числе, проводились с использованием программной идентификации ядер на изображении, что также уменьшает субъективность. Однако в критических случаях для однозначной интерпретации результатов FCM необходимо получить данные световой микроскопии, например, когда пик гистограммы нереплицированных ядер мал и его можно не заметить, или, когда размер генома очень мал и много клеточных обломков (Dolezel et al., 2007).

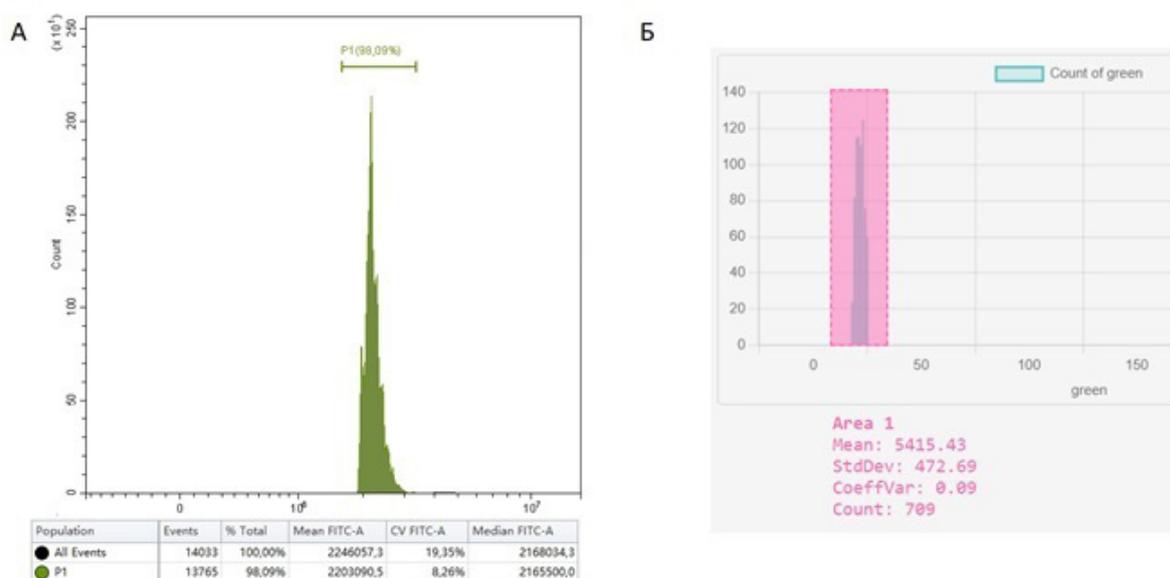


Рис. 3. Сравнение результатов измерения стандартных флуоресцентных частиц с помощью проточной цитометрии (А) и цитометрии изображений (Б) (Koltunova et al., 2024).

Заключение

Цитометрия на основе изображений является проверенной жизнеспособной альтернативой традиционным методам подсчета хромосом и проточной цитометрии. Оборудование для цитометрии на основе статичных изображений часто требует меньше ресурсов и обслуживания по сравнению с проточной цитометрией, обеспечивая при этом получение результатов всего за несколько минут. В связи с этим, капитальные затраты на цитометрию на основе изображений могут быть в пять раз меньше, чем на проточную цитометрию: затраты на оборудование для ИСМ составляют около 10 000–20 000 долларов США, для FCM – от 25 000 до 500 000 долларов США. Кроме того, цитометрия статичных изображений – более простой в плане реализации, настроек и калибровок оборудования метод, что обеспечивает более низкие требования к квалификации персонала по сравнению с проточной цитометрией (Kennedy, Kevin, 2022).

В случае исследовательских лабораторий, которые имеют ограниченные ресурсы, но готовы развиваться в направлении цитометрии, или при большой загруженности исследователи могут рассмотреть возможность использования подхода ИСМ в качестве технологии дополнения или замены FCM. В случае ИСМ изучение пloidности может быть проще, поскольку в процессе

подготовки необходимо произвести только размещение образца на предметных стеклах и покраску. В отличие от проточной цитометрии, ИСМ для определения оптической плотности или флуоресценции анализирует статичные изображения клеточных ядер, что дает возможность визуальной оценки исследуемого материала. Еще одним важным аспектом, который следует учитывать, является возможность хранить образцы в течение неопределенно долгого времени, а цифровые изображения могут иметь большое значение в качестве базы данных для последующих исследовательских проектов. Основным недостатком метода ИСМ является несколько большая погрешность по сравнению с методом проточной цитометрии, что затрудняет анализ абсолютного содержания ядерной ДНК, хромосомных мутаций и анеуплоидий у видов с небольшими хромосомами, что не столь важно при проведении анализа содержания ДНК в изучении процессов полиплоидии, гибридизации и исследовании сельскохозяйственных видов растений, в тех случаях, когда наблюдаются значительные различия в размерах геномов анализируемых образцов.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-20100, <https://rscf.ru/project/24-26-20100/>.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Abreu I. S., Carvalho C. R., Clarindo W. R.** 2008. Chromosomal DNA content of sweet pepper determined by association of cytogenetic and cytometric tools. *Plant Cell Rep.* 27: 1227–1233.
- Allalou A., Wählby C.** 2009. BlobFinder, a tool for fluorescence microscopy image cytometry. *Comput Methods Programs Biomed.* 94(1): 58–65. DOI: 10.1016/j.cmpb.2008.08.006
- Aslan M. K., Ding Y., Stavrakis S., Demello A. J.** 2023. Smartphone imaging flow cytometry for high-throughput single-cell analysis. *Anal. Chem.* 95(39): 14526–14532.
- Ascari L., Novara C., Dusio V., Oddi L., Siniscalco C.** 2020. Quantitative methods in microscopy to assess pollen viability in different plant taxa. *Plant Reprod.* 33(3–4): 205–219.
- Baranyi M., Greilhuber J.** 1999. Genome size in *Allium*: in quest of reproducible data. *Ann. Bot. Fenn.* 83: 687–695.
- Benchaib M., Delorme R., Bryon P. A., Souchier C.** 1996. Fluorescence image cytometry of DNA content: a comparative study of three fluorochromes and four fixation protocols. In: *Fluorescence microscopy and fluorescent probes*. Boston, MA: Springer US. Pp. 197–201.
- Bennett M. D., Leitch I. J., Price H. J., Johnston J. S.** 2003. Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of ~125 Mb. *Ann. bot.* 91(5): 547–557.
- Bennett M. D., Smith J. B.** 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 274(933): 227–274.
- Besse L., Rumiac T., Reynaud-Angelin A., Messaoudi C., Soler M. N., Lambert S. A., Pennaneach V.** 2023. Protocol for automated multivariate quantitative-image-based cytometry analysis by fluorescence microscopy of asynchronous adherent cells. *STAR protocols* 4(3): 102446. DOI: 10.1016/j.xpro.2023.102446
- Bhosale R., Boudolf V., Cuevas F., Lu R., Eekhout T., Hu, Z., De Veylder L.** 2018. A spatiotemporal DNA endoploidy map of the *Arabidopsis* root reveals roles for the endocycle in root development and stress adaptation. *Plant Cell* 30(10): 2330–2351.

- Bourdon M., Coriton O., Pirrello J., Cheniclet C., Brown S.C., Poujol C., Chevalier C., Renaudin J. P., Frangne N.** 2011. In planta quantification of endoreduplication using fluorescent in situ hybridization (FISH). *Plant J.* 66: 1089–1099.
- Caceres M. E., Pupilli F., Quarín C. L., Arcioni S.** 1999. Feulgen-DNA densitometry of embryo sacs permits discrimination between sexual and apomictic plants in *Paspalum simplex*. *Euphytica* 110(3): 161–167.
- Carotenuto G., Sciascia I., Oddi L.** 2019. Size matters: three methods for estimating nuclear size in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* by image analysis. *BMC Plant Biol.* 19: 180. DOI: 10.1186/s12870-019-1791-1
- Carvalho C. R., Clarindo W. R., Abreu I. S.** 2011. Image cytometry: nuclear and chromosomal DNA quantification. In: H. Chiarini-Garcia, R. C. N. Melo (eds.). *Light microscopy. Methods Mol. Bio.* Vol. 689. New York: Humana Press, c/o Springer Science+Business Media, LLC. Pp. 51–68.
- Čertnerová D.** 2021. Meet the challenges of analyzing small genomes using flow cytometry. *Cytometry*: 1–3.
- Cheng S., Fu S., Kim Y. M., Song W., Li Y., Xue Y., Tian L.** 2021. Single-cell cytometry via multiplexed fluorescence prediction by label-free reflectance microscopy. *Sci. Adv.* 7(3): eabe0431.
- Chiarini-Garcia H., Melo R. C. N.** (eds.). 2011. *Light Microscopy. Methods in Mol. Biol.* Vol. 689. New York: Humana Press, c/o Springer Science+Business Media, LLC. 244 pp.
- Chieco P., Jonker A., Van Noorden C. J. F.** 2001. *Image Cytometry. Microscopy Handbooks* 46. Springer: New York. 116 pp.
- Dao D., Fraser A. N., Hung J., Ljosa V., Singh S., Carpenter A. E.** 2016. Cell Profiler analyst: interactive data exploration, analysis and classification of large biological image sets. *Bioinformatics* 32: 3210–3212.
- Didenko V. V.** 2017. *Fast detection of DNA damage: methods and protocols*. New York: Springer. 216 pp.
- Diebold E. D., Buckley B. W., Gossett D. R., Jalali B.** 2013. Digitally synthesized beat frequency multiplexing for sub-millisecond fluorescence microscopy. *Nat. Photonics* 7(10): 806–810.
- Doležel J., Greilhuber J., Suda J.** 2007. Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes. *Weinheim: John Wiley & Sons*: 455.
- Doležel J., Sgorbati S., Lucretti S.** 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol. Plant.* 85(4): 625–631.
- Ernst L. G.** 1994. *MPV microscope photometer with measuring diaphragm*. Germany: User manual. 16 pp.
- Feulgen R., Rossenbeck H.** 1924. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die-darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparat. *Z. Phys. Chem.* 135: 203–248. DOI: 10.1515/bchm2.1924.135.5-6.203
- Fontenete S., Carvalho D., Lourenço A., Guimarães N., Madureira P., Figueiredo C., Azevedo N. F.** 2016. FISHji: New ImageJ macros for the quantification of fluorescence in epifluorescence images. *Biochem. Eng. J.* 112: 61–69.
- Frossasco A., Trenchi A., Urdampilleta J. D.** 2015. Estimación del tamaño del genoma en especies de la tribu *Cestreae* (Solanaceae) mediante citometría de imagen. *Bol. Soc. Argent Bot.* 50(3): 353–360.
- Glushen S. V., Pavlova I. V., Kolomiets O. O., Belokurskaya E. N.** 2013. Express method for determining the ploidy of tomatoes. In: *Current problems in the study and conservation of phyto- and mycobiots. Modern problems in botanical and mycological research: Proceed. II international scientific-practical conf.* (Minsk, 12–14 November 2013). Minsk: Publishing Center of Belarus State University. Pp. 393–396. [In Russian] **Глушен С. В., Павлова И. В., Коломиец О. О., Белокурская Е. Н.** 2013. Экспресс-метод определения пloidности томатов // Актуальные проблемы изучения и сохранения фито- и микобиоты: сб. ст. II-й междунар. науч.-практ. конф. (Минск, 12–14 ноября 2013 г.). Минск: Изд. центр БГУ, 2013. С. 393–396).
- Gregory T. R.** 2001. The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates. *Blood Cell Mol. Dis.* 27: 830–843.
- Gregory T. R.** 2003. Genome size estimates for two important freshwater molluscs, the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and the schistosomiasis vector snail (*Biomphalaria glabrata*). *Genome* 46: 841–844.
- Greilhuber J.** 2008. Cytochemistry and C-values: the less-well-known world of nuclear DNA amounts. *Ann. Bot. Fenn.* 101: 791–804.
- Greilhuber J., Doležel J., Lysák M., Bennett M.D.** 2005. The origin, evolution, and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Ann. Bot. Fenn.* 95: 255–260.
- Greilhuber J., Ebert I.** 1994. Genome size variation in *Pisum sativum*. *Genome* 37: 646–655.
- Greilhuber J., Obermayer R.** 1997. Genome size and maturity group in *Glycine max* (soybean). *Heredity* 78(5): 547–551.
- Heitkam T., Garcia S.** 2023. Plant cytogenetics and cytogenomics. *Springer Nature*: 306.
- Hof J. V.** 1965. Relationships between mitotic cycle duration, S period duration and the average rate of DNA synthesis in the root meristem cells of several plants. *Exp. Cell Res.* 39(1): 48–58. DOI: 10.1016/0014-4827(65)90006-6. PMID: 5831250
- Jónás V. Z., Paulik R., Kozłowski M., Molnár B.** 2022. Calibration-aimed comparison of image-cytometry-and flow-cytometry-based approaches of ploidy analysis. *Sensors* 22(18): 6952.

Kajstura M., Halicka H. D., Pryjma J., Darzynkiewicz Z. 2007. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. *Cytometry* 71: 125–131.

Katagiri Y., Hasegawa J., Fujikura U., Hoshino R., Matsunaga S., Tsukaya H. 2016. The coordination of ploidy and cell size differs between cell layers in leaves. *Development* 143(7): 1120–1125.

Kennedy K. M. 2022. The rapid enumeration of a mixed culture of *S. cerevisiae* and *L. plantarum* in beer using image-based cytometry. *Electronic Theses and Dissertations*: 3634. URL: <https://digitalcommons.library.umaine.edu/etd/3634>

Kolomiets O. O., Glushen S. V. 2017. Factors influencing DNA measurement by static cytometry. In: T. M. Studenikina, I. A. Melnikova, V. S. Gaiduk (eds.). *Stroeniye organizma cheloveka i zhyvotnykh v norme, patologii i eksperimente* [Structure of the human and animal body in normal conditions, nature and experiment. A collection of scientific works dedicated to the 85th anniversary of the birth of Professor A. S. Leontyuk]. Minsk: Publisher Belarusian State Medical University. Pp. 290–294. [In Russian] (**Коломиец О. О., Глушен С. В.** Факторы, влияющие на измерение ДНК методом статической цитометрии // Строение организма человека и животных в норме, патологии и эксперименте: Сб. науч. работ, посвящ. 85-летию со дня рождения проф. А. С. Леонтьюка. Под ред. Т. М. Студеникиной, И. А. Мельникова, В. С. Гайдука. Минск: Изд-во Белорус. гос. мед. ун-та, 2017. С. 290–294).

Kolomiets O. O., Glushen S. V. 2019. Daily rhythm of leaf growth and cell proliferation in capsicum (*Capsicum annuum* L.). *News of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Sciences Series* 64(4): 448–455. [In Russian] (**Коломиец О. О., Глушен С. В.** Суточный ритм роста листьев и пролиферации клеток у перца стручкового (*Capsicum annuum* L.) // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук, 2019. Т. 64, № 4. С. 448–455).

Kolomiets O. O., Pavlova I. V., Glushen S. V. 2015. Cytometric analysis of ploidy and cell proliferation in vegetable lines growing *in vitro*. *Proceedings of the Belarusian State University. Series: Physiological, biochemical and molecular basis of the functioning of biosystems* 10(1): 116–121. [In Russian] (**Коломиец О. О., Павлова И. В., Глушен С. В.** 2015. Цитометрический анализ плоидности и пролиферации клеток у растущих *in vitro* линий овощных культур // Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем, 2015. Т. 10, № 1. С. 116–121).

Koltunova A. M., Panarin R. N., Uvarova O. V., Kutsev M. G. 2024. BIODECOD application for image analysis-based plant DNA cytometry. In: *Idei N. V. Pavlova glazami novogo pokoleniya botanikov: Tezisy dokladov mezhdunarodnon nauchno-prakticheskoy konferentsii molodykh uchenykh* [Idei N. V. Pavlov's glazami novogo pokoleniya botanikov: Tezisy dokladov mezhdunarodnaroynoy nauchno-prakticheskoy konferentsii molodykh uchenykh (Theses of documents of the international scientific-practical conference of molodykh scholars (Almaty, 25–27 September 2024)]. Almaty: Institut botaniki i fitointroduktsii. [In Russian] (**Колтунова А. М., Панарин Р. Н., Уварова О. В., Куцев М. Г.** Приложение BIODECOD для ДНК-цитометрии растений на основе анализа изображений // Идеи Н. В. Павлова глазами нового поколения ботаников: Тезисы докладов международной научно-практической конференции молодых ученых (г. Алматы, 25–27 сентября 2024 г.). Алматы: Институт ботаники и фитоинтродукции, 2024). [In Press]

Kron P., Husband B. C. 2012. Using flow cytometry to estimate pollen DNA content: improved methodology and applications. *Ann. bot.* 110(5): 1067–1078.

Kuksin D., Kuksin C. A., Qiu J., Chan L. L. 2016. Cellometer image cytometry as a complementary tool to flow cytometry for verifying gated cell populations. *Anal. Biochem.* 503: 1–7.

Lacerda M. M., Silva J. C., Vieira A. T., Clarindo W. R. 2019. Cytogenetic characterization of *Passiflora megacoriacea* K. Port.-Utl. employing image cytometry. *Cytologia* 84(4): 353–357.

Lavrekha V. V., Pasternak T., Ivanov V. B., Palme K., Mironova V. V. 2017. 3D analysis of mitosis distribution highlights the longitudinal zonation and diarch symmetry in proliferation activity of the *Arabidopsis thaliana* root meristem. *Plant J.* 92: 834–845.

Leitch I. J., Johnston E., Pellicer J., Hidalgo O., Bennett M. D. 2019. *Plant DNA C-values Database. Release 7.1.* URL: <https://cvalues.science.kew.org/>

Levi M., Tarquini F., Sgorbati S., Sparvoli E. 1986. Determination of DNA content by static cytofluorimetry in nuclei released from fixed plant tissue. *Protoplasma* 132: 64–68.

Loureiro J., Rodriguez E., Dolezel J., Santos C. 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Ann. Bot.* 100: 875–888.

Macierowski Z., Veilleux C., Gibaud A., Bourgeois C. A., Kljanienko J., Boenders J., Vielh P. 1997. Comparison of fixation procedures for fluorescent quantitation of DNA content using image cytometry. *Cytom.: J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 28(2): 123–129.

Martín-Martín R. P., Salvador-Soler N., Lluch J. R., Garreta A. G. 2023. Nuclear DNA content estimation of seaweed by fluorimetry analysis. In: *Plant Cytogenetics and Cytogenomics: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer US. Pp. 65–77.

Mascagni F., Barghini E., Ceccarelli M., Baldoni L., Trapero C., Díez C. M., Giordani T. 2022. The singular evolution of *Olea* genome structure. *Front. Plant Sci.* 13: 869048.

- McQuin C., Goodman A., Chernyshev V., Kamentsky L., Cimini B. A., Karhohs K. W., Doan M., Ding L., Rafelski S. M., Thirstrup D.** 2018. Cell Profiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS Biol* 16: 1–17.
- Mello M. L., de Campos V. B.** 2017. The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. *Acta Histochem.* 119(6): 603–609.
- Munoz H. E.** 2020. *Physical phenotyping of neutrophil NETosis using fluorescence-imaging deformability cytometry.* A dissertation submitted in partial satisfaction of the requirements for the degree Doctor of Philosophy in Bioengineering. Los Angeles: University of California. 157 pp.
- Nagaki K., Furuta T., Yamaji N., Kuniyoshi D., Ishihara M., Kishima Y., Takatsuka H.** 2021. Effectiveness of Create ML in microscopy image classifications: A simple and inexpensive deep learning pipeline for non-data scientists. *Chromosome Res.* 29: 361–371.
- Oberhammer F., Wilson J. W., Dive C., Morris I. D., Hickman J. A., Wakeling A. E., Walker P. R., Sikorska M.** 1993. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal degradation of DNA. *EMBO J.* 12: 3679–3684.
- Oliveira S. C.** 2017. *Origin of the allotriploid “Híbrido de Timor” through a karyotype comparison with its Coffea ancestors.* Tese apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de PósGraduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doctor Scientiae. Brasil: Espírito Santo. 60 pp.
- Pasternak T., Haser T., Falk T., Ronneberger O., Palme K., Otten L.** 2017. A 3D digital atlas of the *Nicotiana tabacum* root tip and its use to investigate changes in the root apical meristem induced by the *Agrobacterium* 6b oncogene. *Plant J.* 92: 31–42.
- Pektas Z. O., Keskin A., Ömer G., Karšlioglu Y.** 2006. Evaluation of nuclear χ morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 64: 628–635.
- Pichugin Yu. G., Semyanov K. A., Chernyshev A. V., Palchikova I. G., Omelyanchuk L. V., Maltsev V. P.** 2012. Features of cytometric methods for determining the DNA content in the nucleus. *Tsitology* 54, 2: 185–190. [In Russian] (Пичугин Ю. Г., Семьянов К. А., Чернышев А. В., Пальчикова И. Г., Омелянчук Л. В., Мальцев В. П. Особенности цитометрических методов определения содержания ДНК в ядре // Цитология, 2012. Т. 54, № 2. С. 185–190).
- Pozarowski P., Holden E., Darzynkiewicz Z.** 2013. Laser scanning cytometry: principles and applications. An update. *Methods Mol. Biol.* 913:187–212.
- Praça-Fontes M. M., Carvalho C. R., Clarindo W. R.** 2011a. C-value reassessment of plant standards: an image cytometry approach. *Plant cell Rep.* 30: 2303–2312.
- Praça-Fontes M. M., Carvalho C. R., Clarindo W. R., Cruz C. D.** 2011b. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. *Plant Cell Rep.* 30: 1183–1191. DOI: 10.1007/s00299-011-1026-x
- Praça-Fontes M. M., Carvalho C. R., Novaes C. R.** 2009. Nuclear DNA content of three Eucalyptus species estimated by flow and image cytometry. *Austral. J. Bot.* 57(6): 524–531.
- Rao B. V., Barathi M., Dev T. S., Singh M.** 2015. Image cytometric analysis of nuclear and chromosomal DNA contents in two cytotypes of *Aloe vera* (L.) Burm. f. *Nucleus (India)* 58: 53–57.
- Rodenacker K., Bengtsson E.** 2003. A feature set for cytometry on digitized microscopic images. *Anal. Cell. Pathol.* 25: 1–36.
- Rosado T. B., Carvalho C. R., Saraiva L. S.** 2005. DNA content of maize metaphasic A and B chromosomes determined by image cytometry. *Maize Genet Cooperation Newsl* 79: 48–49.
- Roukos V., Pegoraro G., Voss T. C., Misteli T.** 2015. Cell cycle staging of individual cells by fluorescence microscopy. *Nature protocols* 10(2): 334–348.
- Salvador-Soler N., Macaya E. C., Rull-Lluch J., Gómez-Garreta A.** 2016. Nuclear DNA content in *Gelidium chilense* (Gelidiales, Rhodophyta) from the Chilean coast. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 51(1):113–122. DOI 10.4067/S0718-19572016000100011
- Santisteban M. S., Montmasson M. P., Giroud F., Ronot X., Brugal G.** 1992. Fluorescence image cytometry of nuclear DNA content versus chromatin pattern: a comparative study of ten fluorochromes. *J. Histochem. Cytochem.* 40(11): 1789–1797.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T.** 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7): 676–682.
- Skaptsov M. V., Kutsev M. G., Smirnov S. V., Vaganov A. V., Uvarova O. V., Shmakov A. I.** 2024. Standards in plant flow cytometry: an overview, polymorphism and linearity issues. *Turczaninowia* 27, 2: 86–104. DOI: 10.14258/turczaninowia.27.2.10
- Slavík J.** 1996. *Fluorescence microscopy and fluorescent probes.* New York: Plenum Press. Pp. 306.
- Sliwinska E., Loureiro J., Leitch I. J., Šmarda P., Bainard J., Bureš P., Chumová Z., Horová L., Koutecký P., Lučanová M., Trávníček P., Galbraith D. W.** 2022. Application-based guidelines for best practices in plant flow cytometry. *Cytom. A: Special Issue: Best Practices in Plant Cytometry Part 2* 101(9): 749–781. DOI: 10.1002/cyto.a.24499

- Son J., Mandracchia B., Trenkle A. D. S., Kwong G. A., Jia S.** 2023. Portable light-sheet optofluidic microscopy for 3D fluorescence imaging flow cytometry. *Lab Chip* 23(4): 624–630.
- Strgulc K. S., Dolenc K. J.** 2015. Sexual reproduction of knotweed (*Fallopia* sect. *Reynoutria*) in Slovenia. *Preslia* 87(1): 17–30.
- Temsch E. M., Greilhuber J., Krisai R.** 1998. Genome size in *Sphagnum* (Peat Moss). *Bot. Acta* 111: 325–330.
- Vilhar B., Dermastia M.** 2002. Standardisation of instrumentation in plant DNA image cytometry. *Acta Bot. Croat.* 61(1): 11–26.
- Vilhar B., Greilhuber J., Koce J. D., Temsch E. M., Dermastia M.** 2001. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Ann. Bot.* 87: 719–728. DOI: 10.1006/anbo.2001.1394
- Yang D., Subramanian G., Duan J., Gao S., Bai L., Chandramohanadas R., Ai Y.** 2017. A portable image-based cytometer for rapid malaria detection and quantification. *PLOS ONE* 12(6): e0179161. DOI: 10.1371/journal.pone.0179161
- Yuan X., Darcie T., Wei Z., Aitchison J. S.** 2022. Microchip imaging cytometer: making healthcare available, accessible, and affordable. *Opto-Electronic Advances* 5(11): 210130-1–210130-15.
- Zhao P. Z., Ouyang L. L., Shen A. L., Wang Y. L.** 2022. The cell cycle of phytoplankton: A review. *J. World Aquac. Soc.* 53(4): 799–815.
- Žurek-Biesiada D.** 2015. *Photoconversion of DNA-binding dyes and its application in super-resolution microscopy (Doctoral dissertation)*. Kraków: Jagiellonian University. 105 pp.