

Утверждаю

Директор Техноинфо Лимитед

Микуленко Наталья Евгеньевна



Дата 26 июля 2010 г.

Руководство по эксплуатации.

Система лабораторная медицинская для автоматизированного цитогенетического анализа
CytoVision/Genus Product Family.

2010 г.

Genetix

CytoVision®

Работа, съёмка и анализ

www.genetix.com

Содержание

Введение	4
Управление данными в среде CytoVision.....	5
Шаблоны папок.....	5
Шаблоны препаратов.....	6
Создание новых папок	6
Открытие папок	7
Навигатор.....	8
Редактирование описания папки.....	8
Заккрытие папок.....	9
Управление библиотеками.....	9
Удаление.....	9
Переименование	9
Синхронизация.....	9
Блокировка	9
Съёмка	10
Установка и настройка микроскопа.....	10
Настройка режима съёмки	11
Съёмка.....	11
Установка камеры (автоустановка).....	11
Область исследований.....	11
Установка порогов.....	12
Дополнительные опции установки порогов.....	12
Автоматическая установка порогов.....	14
Повторная съёмка метафазных клеток.....	14
Защита от «случайных» хромосом.....	15
Анализ снимков	16
Доступные операции.....	16
Работа с изображениями.....	16
Загрузка изображений.....	16
Сохранение изображений.....	16
Очистка рабочих окон.....	16
Перемещение изображений	16
Зумирование.....	16
Отмена операций.....	17
Аналитическая система CaseView	17
Работа с каталогами.....	17
Планировка..	17
Анализ	18
Очистка	18
Идентификация	19
Создание отчёта	19
Свойства режима анализа метафазных клеток	21
Обработка комбинированных снимков.....	21
Подсчёт метафазы.....	21
Нумерация метафазы.....	22
Последовательная нумерация гомологичных хромосом	23
Нумерация отдельных хромосом с использованием правой кнопки мыши.....	23
Сегментация хромосом	23
Предиктивная сегментация.....	23

Сегментация и опции отображения информации.....	26
Кариотипирование.....	26
Классификатор	26
Автоматическое кариотипирование.....	26
Кариотипирование в ручном режиме.....	27
Корректировка хромосом в кариотипе.....	27
Разметка кариотипа.....	28
Очистка.....	28
Результаты кариотипирования.....	28
Дополнительные функции кариотипирования	29
«Ластик»	29
Выпрямление.....	30
Масштабирование и отражение.....	30
Настройки контрастности и резкости хромосом.....	30
Расширенный анализ хромосом и кариотипа	33
Сравнение клеток	33
Администраторский режим просмотра результатов.....	33
Комментарии.....	35
Режим составного экрана	37
Завершающая обработка.....	37
Печать.....	37
Архивация и восстановление данных	38
Приложение А. Установка микроскопа.....	41
Зелёный интерференционный фильтр	41
ИК-фильтры.....	41
Настройка конденсора для подсветки по Кёхлеру	41
Регулировка подсветки	45
Парфокальность камеры	45
Приложение В. Настройка режимов съёмки.....	46
Настройка лампы микроскопа.....	46
Автоустановка и Автонастройка.....	46
Настройка степени контрастности	47
Настройка съёмки.....	47
Увеличение	48
Приложение С. Макросы и «горячие» клавиши в системе CytoVision	49
Введение	49
«Горячие» клавиши.....	49
Программирование «горячих» клавиш.....	49
Макросы	50
Запись макросов	50
Советы по использованию макросов.....	51
Устранение возможных проблем	52
Контактная информация.....	54

Введение

Данное руководство предназначено для ознакомления с возможностями и функциями системы CytoVision[®], используемой для съёмки и анализа клеток, находящихся в метафазе.

Руководство создано на основе модельных операций и действий в среде Cytovision на примере хромосом человека.

Управление данными в среде CytoVision

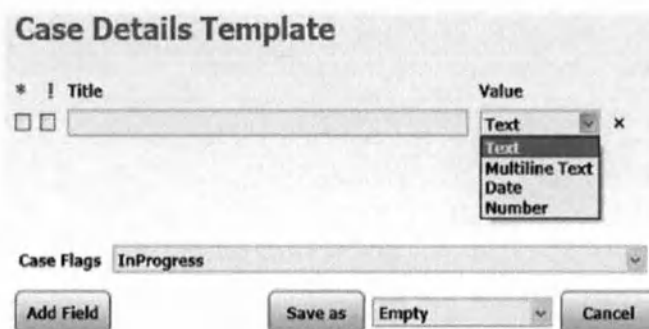


Система CytoVision использует каталоговую структуру базы данных; каждая папка содержит один пакет собранных данных в следующей иерархии: **Папка-препарат-клетка/изображение**. Таким образом, для любых операций со снимками (или для записи новых) вам всего лишь необходимо открыть или создать соответствующую папку.

Шаблон папки

CytoVision использует шаблоны папок для надежного хранения и передачи данных, а так же для более удобного ведения отчётности по проведённым операциям. Если папка создаётся при помощи интерфейса LIMS (CWS/CTS), где описание папок задаётся системой LIMS, то шаблоны используются для настройки полей свойств папки.

Выберите в текстовом меню **Папка>Шаблон папки** (или Alt-C и затем M на клавиатуре).



Нажмите Add Field для выбора необходимого вам пункта меню и введите необходимое вам описание папки. Это может быть любое описание на любом языке или просто набор символов (максимально возможная длина определяется настройками ОС Windows®).

Выберите необходимый формат из выпадающего справа меню:

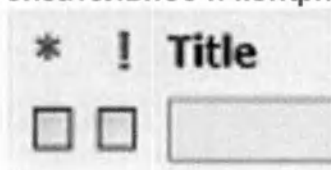
Text – одна текстовая строка.

Multiline Text – неограниченное количество строк текста.

Date – дата вводится при помощи выпадающего меню календаря

Number – В поле могут быть введены только числа, 0 вводится автоматически.

Обязательное и конфиденциальное поля



Если вы поставите флажок в поле «*» рядом с заполняемым полем, то оно будет отмечено как **обязательное** – это означает, что при создании папки в CytoVision данное поле должно быть заполнено перед тем, как вы сможете продолжить. Флажок «!» отмечает выбранное поле как **конфиденциальное** для системы CytoNET, и описание не будет загружено с использованием функционала системы CytoNET.

После завершения данных операций введите имя шаблона и нажмите кнопку **Сохранить как**. **Информация по умолчанию** о папке представляет собой то же самое, что и пункт **свойства папки** в более ранних версиях CytoVision.

Шаблоны препаратов

Одной из опций системы CytoVision является возможность добавления описания препаратов, что позволяет вводить и сохранять необходимую информацию, основанную на том или ином снимке или типе культуры клеток. Описание препаратов настраивается и сохраняется таким же образом, как и в случае описания папок, приведённого выше.

Если информация препарата заранее записана при помощи интерфейса LIMS (CWS/CTS) или является частью штрих-кода (для GSL-устройств), то она не будет автоматически предварительно вписана в соответствующие поля, поэтому необходимую информацию необходимо вводить вручную через **Навигатор** (клик правой кнопкой мыши на препарате, выбрать в всплывающем меню пункт **Details**) после создания каждого препарата.

Если в шаблоне препарата не будет указана никакой информации, то в данном случае в окне **Properties** будет отображаться число метафазных клеток, кариотип или количество обработанных фотографий данного препарата.

Slide Details:

Properties			
Cell Count	2	Metaphase Count	2
Karyotype Count	1	Probe Count	0

Details Template: Empty

OK Cancel

Создание новой папки

Клик на иконке **"New Case"** на главной панели инструментов открывает окно **Create New Case** («Создать новую папку»). Если же ранее не было заполнено поле описания, то в дальнейшем будет использоваться «пустой» шаблон (в более поздних версиях систем).

Выберите в выпадающем меню пункт **Details Template** и поставьте описание «по умолчанию» («**Default Details**») или те данные, которые были введены вами ранее.

Create New Case

Name:

Keywords:

Status:

Details Template:

OK Cancel

Если поле имени папки не будет корректно заполнено, то справа вы увидите символ . Значок * рядом с заполняемыми полями означает, что они являются обязательными для заполнения. В случае, если какое-либо из обязательных полей не будет заполнено, то высветится предупреждение, сообщающее вам об этом. Знак ! рядом с полем означает, что для папки установлен режим конфиденциальности при работе в системе CytoNET.

Любые данные введённые в поле описания папки могут использоваться для поиска в то время, пока папка является активной или находится в меню **«Case Open»** («открыть папку»). Главным предназначением описания папки является использование его при создании отчёта и печати необходимой информации, поэтому в отчёте может использоваться любая вводимая вами информация. Ключевые слова и Статусы могут использоваться в независимости от выбранного для работы шаблона.

- **Ключевые слова** являются постоянной базой данных для поиска внутри библиотеки (поиск необходимых папок). Предлагаемая база данных включает в себя полный список наименований кариотипов, образцов и идентификаторов или стандартизованных названий болезней и синдромов по системе ISCN.

- **Окно статуса** предназначается для комментариев пользователя (пользователей) в ходе работы. По умолчанию установлен флажок **InProgress** («обрабатывается»), так же вы можете установить статусы **ForReview** («для просмотра») и **Completed** («завершено»). Дополнительные статусы могут быть созданы при помощи **CV User** и **Logging Config**.

Статус может быть изменён так же и с помощью навигатора через клик правой клавишей мыши на папке (препарате) и последующего клика левой клавишей на необходимом статусе (текущий будет отмечен галочкой).

ForReview

✓ Completed

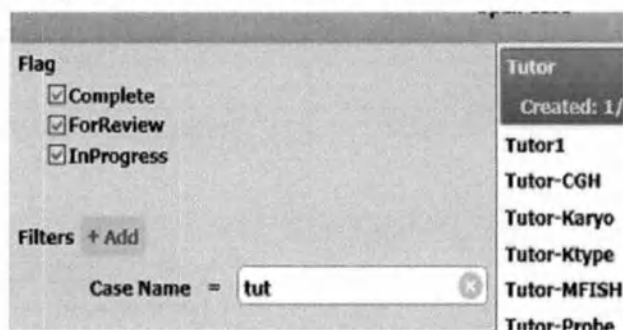
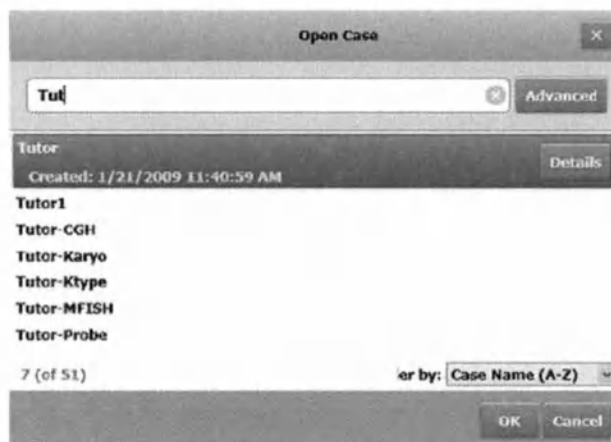
InProgress

Открытие папок

Меню «Открыть папку» показывает вам список активных папок с SQL-базе данных CytoVision. Вы можете прокрутить список для выбора необходимого каталога и открыть его кликом левой кнопки мыши (для того чтобы выбрать несколько каталогов используйте клавиши CTRL и SHIFT). Для более целенаправленного выбора используйте функцию поиска для выбора только интересующих вас каталогов.

Самым простым способом является ввод полного названия искомой папки или его части в специальном поле вверху списка. Фильтрация списка производится синхронно с введением названия, поэтому вы сразу увидите папки, которые содержат в названии или описании введенный вами текст.

Для того, чтобы изменить параметры поиска нажмите кнопку «**Advanced**» («**дополнительно**»), что позволит вам осуществлять поиск по индивидуальным комментариям к каждой папке (включая также имя). Необходимо также обратить внимание на то, что для поиска доступны любые названия, которые были использованы в системе.

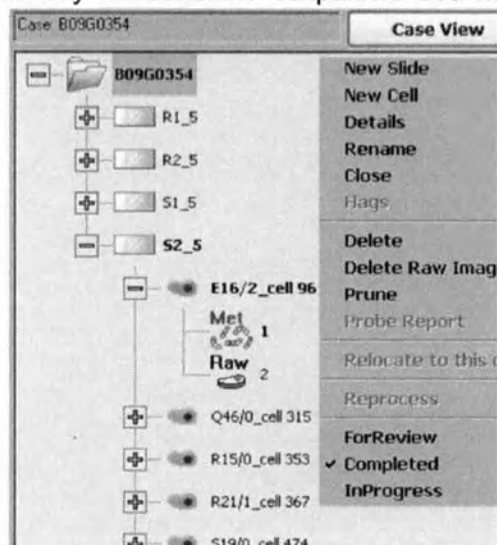


Последний использованный вами фильтр будет автоматически запоминаться системой, что в дальнейшем значительно облегчит процесс поиска, поскольку невозможно сохранять все поисковые запросы в данной системе.

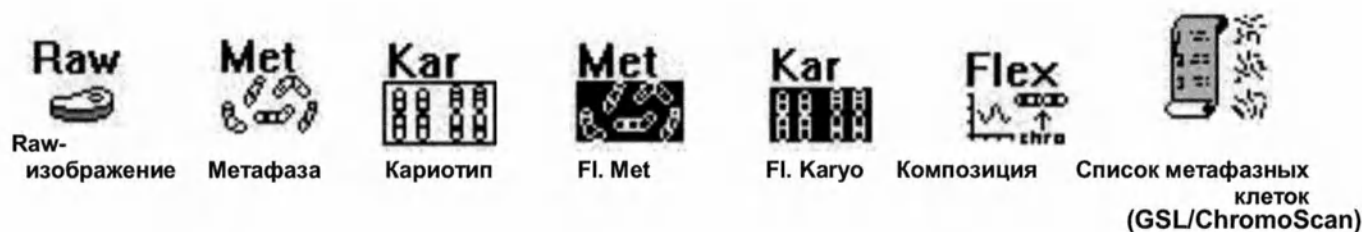
Навигатор



Навигатор отображает открытые и активные папки, а так же используется для загрузки изображений и выбора места для их сохранения. Загруженные изображения показываются в виде иконок в дереве папок и могут быть открыты двойным кликом на необходимой вам иконке, либо нажатием на кнопку **Load** («Загрузить») или **Load Cell** (в режиме **Classic** или **Large Navigator**). Щелчок правой кнопкой мыши на иконке в навигаторе вызывает контекстное меню, которое позволяет осуществлять выбор изображений, их анализ и редактирование.



Абсолютно каждое изображение, которое загружено в систему, будет отображаться в навигаторе как иконка. Активные изображения всегда будут выделяться цветом на фоне всех остальных. Обработываемые изображения сохраняются в активной ячейке навигатора.



Также существует возможность прикрепления файлов, которые не являются файлами системы CytoVision, для этого их всего лишь необходимо «перетащить» в меню навигатора. Такие файлы, как Word или PDF или какие-либо изображения (например формата TIF или JPG) могут быть просто скопированы в необходимую папку и станут частью уже существующей структуры базы данных (их архивация, соответственно, будет проводиться вместе с папкой).

NB!: внешние изображения, добавленные в систему CytoVision, могут быть открыты только оригинальными приложениями.

Существует три режима отображения рабочего окна системы CytoVision: **Classic**, **Large Navigator** и **Full Screen**, переключаясь между которыми, можно настроить навигатор для максимально удобной работы (переключение производится через меню Layout, расположенном над главной панелью инструментов). На широкоформатных мониторах (соотношение сторон 16:10) рекомендуется использовать полноэкранный режим **Fullscreen**, что позволит отображать все детали навигатора и фотографий в максимальном размере, в то время как режим Classic несколько снижает отображаемый размер снимков, но увеличивает размер рабочего окна системы. На обычных мониторах (соотношение сторон 5:4) режим **Fullscreen** даст возможность работы в окне максимального размера, но при этом навигатор будет скрыт, а два оставшихся режима будут давать схожие размеры снимков и будут различаться небольшими изменениями в панели навигатора.

Редактирование описания папки

Описание папки может быть вызвано при помощи клика правой кнопкой мыши на оконке папки в навигаторе и последующем выборе пункта **Details** (необходимо отметить, что при правом клике на иконке препарата и выборе пункта меню **Details** вы увидите описание препарата, а не нужной вам папки) или нажатием на кнопку Details на главной панели инструментов.

Все поля, за исключением имени папки, легко могут изменены. Также вы можете изменить шаблон описания папки, выбрав его в выпадающем меню, однако это приведёт к сбросу всех данных, записанных в данной папке.

Case Details: Print-Standard

Patient name	Jane Smith		
Date of birth	07/01/1972		
Specimen Type	Peripheral Blood		
Referral reason	Recurrent Miscarriage		
Technologist	KSL		
Date	01/07/2009		
Case Comment			
Result			
Keywords			
Status	InProgress	Archives	
Details Template	DefaultDetails		
			OK Cancel

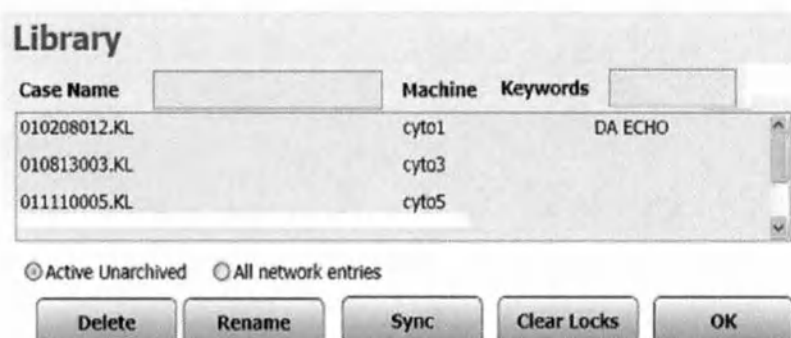
Заккрытие папок

После завершения анализа папка может быть закрыта нажатием на кнопку **Close Case** («Закреть папку») на главной панели инструментов или правым кликом мыши на иконке папки в навигаторе и последующим выбором пункта **Close** («Закреть») в меню.

Если какие либо изображения были обработаны, но не были сохранены сделанные изменения, то автоматически высветится предупреждение. После этого нажмите **OK** и сохраните или отмените перед сохранением внесённые изменения.

Менеджер библиотек

Менеджер библиотек CytoVision доступен через иконку Библиотеки на главной панели инструментов. Библиотека отображает историю создания папок в сети CytoNET, а так же активные незаархивированные папки (в текущий момент в базе данных системы) или все события, происходящие внутри сети (любые изменения в папках, в том числе и активных).



В отличие от обычной библиотеки, данный менеджер библиотек используется для поиска и проверки папок, созданных внутри сети.

Остальные опции будут доступны только в случае использования CytoVision с администраторским паролем. Удаление папки и её переименование может производиться только в том случае, когда папка является **активной** и **незаархивированной**. Заархивированные папки не могут быть переименованы и удалены из истории библиотеки.

Delete —полностью удаляет папку из системы и библиотеки. После подтверждения удаления папки, вы не можете отменить совершённое действие. Название удалённой папки вы сможете использовать в дальнейшей работе в случае необходимости.

Rename —изменяет имя папки в базе данных.

Sync —используется для обновления базы данных SQL для любой «зависшей» папки (удалённой всеми пользователями, но не исключённой из базы данных) из базы данных каталогов, где доступна информация о папках (препаратах, клетках). Синхронизация включает название папки в основную базу данных и позволяет видеть папку в общем списке. Однако, синхронизация исключает возможность восстановления подробного описания папки до тех пор, пока поля описания содержат какую-либо информацию (в версиях программного обеспечения новее v3.9 и после архивации).

Clear Locks используется в случае, если папка некорректно открывается в системе, это означает, что папка будет доступна в режиме «только для чтения» в процессе анализа. Некорректная работа может быть вызвана отсутствием прав доступа, проблемами в работе сети или сбоем в системе CytoVision.

Съёмка

Для получения снимков метафазных клеток вы должны переключиться в режим съёмки (**Capture Screen**), используя иконку на главной панели инструментов. Некоторое время после включения режима CytoVision будет активировать необходимое для работы оборудование (микроскоп, фотокамера), по умолчанию будет установлен последний выбранный режим съёмки, который вы можете изменить используя кнопку настройки режимов съёмки. Данное руководство на использовании цифровой камеры JAI® CV-M4 и CytoVision Imaging system для съёмки метафазных клеток и предполагает оптимальные для работы настройки микроскопа.

Камера JAI CV-M4 даёт полноразмерное изображение, при использовании крепления объектива с кратностью 1.0x, с увеличением 100x или 60x (эквивалентного оптическому микроскопу, режим binning-1).

Если камера используется в режиме Binning-2, или адаптером 0.7x, то работа возможна лишь при использовании объектива с кратностью 100x, что обеспечит приемлемое разрешение снимка. Для улучшения качества снимков также можно использовать адаптер с кратностью 1.25x.

Ниже приведён порядок действий для оптимальной работы микроскопа:

А) Установка микроскопа

1. Зелёный интерференсный фильтр
2. ИК-фильтр
3. Конденсор и подсветка по Кёхлеру
4. Регулировка освещения
5. Парфокальность камеры

Не следует...

- ☐ ... применять флуоресцентные фильтры, меняющие цветность изображения на отличную от зелёного.
- ☐ ... использовать конденсор при полностью открытой или полностью закрытой диафрагме.
- ☐ ... ставить лампу под микроскопом слишком низко или слишком высоко, а так же изменять её положение в процессе съёмки.

В) Настройка режима съёмки

1. Подстройка лампы
2. Автоматическая установка и настройка параметров съёмки
3. Настройка контрастности изображения
4. Уточнение параметров установленных съёмки

Не следует...

- ☐ ... использовать автонастройки, сдвигающие баланс цвета в сторону синего цвета, после того как параметры съёмки были предварительно установлены по текущему изображению.
- ☐ ... применять значения степени контрастности, не входящие в рабочий диапазон (0.8 – 1.0).

С) Съёмка

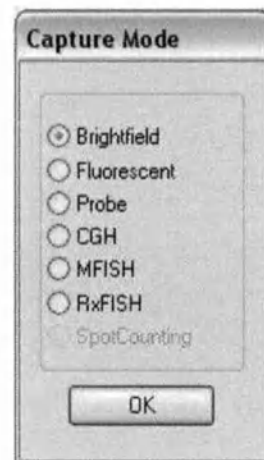
1. Настройка камеры
2. Установка пороговых ограничений
3. Обработка полученного изображения

Не следует...

- ☐ ... вручную устанавливать экспозицию – доверьтесь автоматической настройке.
- ☐ ... блокировать изменения настроек режима съёмки и работы лампы подсветки, в противном случае автоматическая подстройка контрастности изображения будет невозможна.
- ☐ ... использовать высокочувствительные режимы съёмки без сохранения изображения в формате RAW.

Настройка микроскопа

См. Приложение А данного руководства

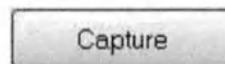
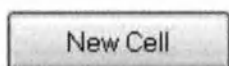


Настройка режима съёмки

См. Приложение В данного руководства

Съёмка

Для создания нового раздела для новой клетки для фотографии нажмите на кнопку **New Cell**; необходимая вам папка в данный момент должна быть открыта в меню навигатора. При нажатии на кнопку **Live** в главном окне начнёт показываться текущее изображение с фотокамеры. Передвигайте объектив микроскопа для того чтобы отцентрировать метафазные клетки (убедитесь, что исследуемый объект находится в фокусе). Если метафазные клетки слишком рассеяны по образцу, что исключает возможность сделать одну фотографию, то можно использовать специализированные соединительные поля, что позволит вам сделать составную фотографию (см. ниже).



Любое размытие красных и синих цветов, видимое на экране, будет указывать на ту или иную степень насыщенности цветов. Все области изображения, которые на текущей картинке с фотокамеры отображаются в синем цвете, при съёмке будут зафиксированы как чёрные. Аналогичным образом красные области будут зафиксированы белым цветом. Такой приём используется по причине того, что самая тёмная часть метафазной клетки на текущем изображении отображается в чёрном цвете, а самая светлая – в белом. Постарайтесь не допускать смещения цветового баланса изображения в сторону синего или красного цветов, особенно в области нахождения хромосом, поскольку это может привести к потере детализации снимков.

Установка камеры (автоустановка)

Чувствительность, скорость съёмки и время реакции камеры JAI таковы, что всегда можно использовать автоматические установки для определения оптимальных настроек режима съёмки для каждого отдельного снимка. Данная функция активируется установкой флажка на панели настройки контраста или посредством меню "Customize", после чего камера автоматически настроится при нажатии на кнопку **Live**. Если автоматическая настройка не удаётся, то скорее всего это связано со слишком высоким или слишком низким уровнем освещённости. Иконка лампы будет мерцать синим или красным цветом в зависимости от того, находится ли уровень освещённости в пределах рабочего диапазона или нет. Если индикатор продолжает мерцать синим или красным цветом во время автоматической установки (с выводом сообщений об ошибке или без них), то это свидетельствует о том, что лампа микроскопа нуждается в дополнительной регулировке, либо на пути светового пучка находится светофильтр или иное препятствие. Ручная настройка (окно **Capture Setup**) не рекомендуется и не требуется, кроме случая ошибки в автоматической настройке или в том случае, если изображение содержит большое количество фоновых объектов, которые могут исказить уровень контраста хромосом метафазных клеток.

Экспозиция. Для наилучшего результата не рекомендуется ручная настройка экспозиции. Максимально подходящие настройки экспозиции всегда будут рассчитаны автоматически.

Яркость. Если требуется больший (или меньший) уровень насыщенности красного цвета на изображении, то яркость может быть скорректирована вручную. Также допустим лёгкий оттенок красного цвета на фоне, если он не заходит на границы изображения хромосом.

Затемнение. В том случае, если требуется больший или меньший уровень насыщенности синего цвета, то данный параметр может быть вручную отрегулирован при помощи ползунка затемнения. Синий оттенок фоновых объектов и центромер хромосом допустим, но это может повлиять на резкость изображения хромосом.

Рабочая область изображения (ROI, Region of Interest)

В главном рабочем окне на панели текущего изображения вы можете выделить интересующую вас рабочую область, зажав на левую кнопку мыши и перетаскив рамку на необходимую область изображения.

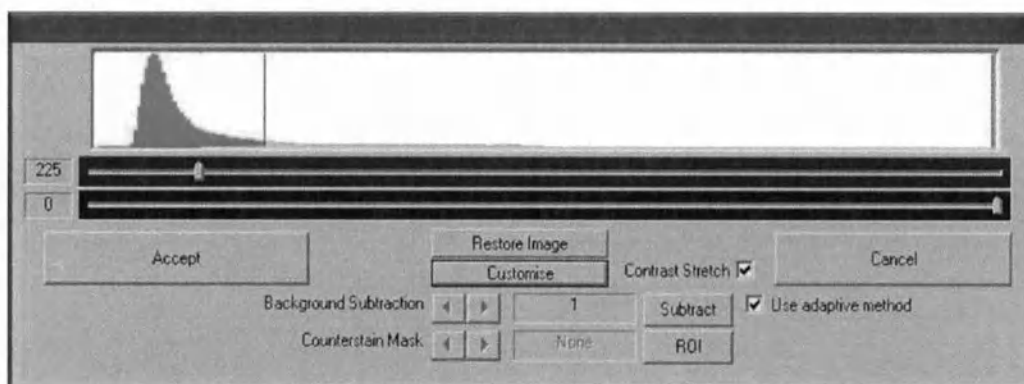
Таким образом вы можете получить фотографию только интересующей вас части образца. В окне настроек режима съёмки (**Capture Setup**) выделение рабочей области (**ROI**) включается простой установкой галочки в соответствующем поле. Если данный флажок не будет включен, то перед каждым последующим снимком система будет выводить сообщение с предложением включения данной функции. При нажатии на кнопку **Capture** зафиксированное изображение и будет запущена настройка пороговых ограничений.

Установка порогов

CytoVision является системой визуализации, основные функции которой (съёмка и анализ) оптимизированы для работы с несколькими отдельными объектами на одном изображении. Поэтому установка порогов является неотъемлемой частью процесса анализа в системе CytoVision, поскольку данная функция позволяет убрать избыточную информацию (фон) с изображения, которая не потребуется для дальнейшего анализа.

Анализ начинается с первичной сегментации метафазных клеток. Установка порогов ведёт к дополнительному разделению и подгонке (по размеру) метафазных клеток.

Если автоматический запуск данной функции отключен, то при нажатии на кнопку **Capture** появится окно настройки порогов (**Threshold Window**).



Для удаления фона с необработанной RAW-фотографии достаточно лишь отрегулировать ползунок порога. Таким образом, из конечного изображения будет удалено всё, что находится под синей или зелёной пороговой маской. Удалённые элементы изображения не могут быть восстановлены до того, как вы сохраните изменения изображения и перенастроите ограничения. Поэтому вы можете быть уверены, что ни одна часть хромосомы не будет случайно удалена.

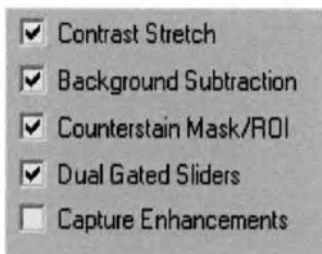
Восстановление изображения

Данная опция позволяет вам заново начать настройку порогов без необходимости пересъёмки образца. К восстановлению изображения прибегают в случае использования выделения более узкой рабочей области или после удаления фона.

Нажмите кнопку **Accept** (принять изменения) и фотография метафазы будет сохранена и начнёт отображаться в навигаторе.

Дополнительные опции установки порогов

При нажатии на кнопку **Customize** («Настроить») будет открыто окно настройки дополнительных параметров установки порогов. При помощи данного меню вы сможете скрыть или вывести на панель инструментов опции, связанные с установкой порогов изображения.



Выравнивание контрастности

Установка флажка около данного пункта меню после применения пороговой маски влечёт за собой увеличение контрастности всех объектов на фотографии. Рекомендуется включить данную функцию, если уровень усиления сигнала (**Enhance on Capture**) во время съёмки был установлен на 0. В случае использования усиления сигнала, повышение чёткости изображения может дать различные результаты на разных объектах фотографии. Таким образом, в общем и целом результаты зависят от каждой конкретной фотографии.

- ☐ При включенном выравнивании контрастности конечное изображение будет иметь высокую чёткость внутренней части хромосом и меньшую четкость краёв.
- ☐ При выключенном выравнивании контрастности хромосомы с бледными плечами будут более заметны.

Удаление фона

Иногда наложение пороговой маски вокруг хромосом и удаление фона или посторонних объектов без вмешательства в целостность изображения хромосомы может включать в себя некоторые трудности, такие как:

- ☐ Остатки цитоплазмы вокруг метафазных клеток, которые могут поглощать краситель Гимза и вызывать появление пятен, более тёмных, чем некоторые части хромосом.
- ☐ Слабая окраска клеток заставляет прибегать к специфическим настройкам камеры и приводит к низкому уровню контрастности изображения.
- ☐ Использование препаратов без покровного стекла или «сухого» объектива ведёт к чрезмерному уровню контрастности фона.
- ☐ Техники подготовки препаратов и культур, приводящие к «грязному» фону.

Данная функция позволяет удалить с фотографии «мусор» и фоновый шум. Для стандартного препарата размер хромосомы на фотографии составляет примерно 20-30 пикселей; данная оценка позволяет системе распознавать посторонние объекты и удалять их.

Рабочая область (ROI, Region of interest)

Опция позволяет выделять объекты, которые вы хотите сохранить и удалять все лишние объекты, присутствующие на фотографии. После выделения всей области, лежащая снаружи, удаляется, а в внутренней части применяется стандартная процедура настройки порогов.

Комбинируя удаление фона и выделение объектов можно добиться более широких возможностей при наложении пороговых масок перед анализом изображения. В данном случае удаления фона следует произвести в первую очередь после выделения интересующих вас объектов.

Двойной ползунок

Данная функция активирует дополнительный (красный) ползунок в меню наложения пороговой маски. Использование данного ползунка позволяет повышать контрастность тёмных областей изображения, усиливая насыщенность чёрного цвета. Такой приём может быть использован в случае низкой контрастности изображения метафазных хромосом или их бледной окраски и является эквивалентным настройкам контрастности во время анализа.

Улучшение качества изображения

Эта опция даёт возможность регулировать контраст и резкость непосредственно перед наложением масок на изображение. Данная функция является альтернативой обычным методам настройки контраста и резкости изображения, доступных в процессе анализа в системе

CytoVision, и устанавливается активной по умолчанию. Также усиление можно применить и после наложения пороговой маски на фотографию. Фон изображения удаляется при помощи маски, которая отображается белым цветом и оставляет нетронутыми объекты (хромосомы), необходимые для анализа.

Высветление/Затемнение. Здесь используется линейная функция контрастности изображения, в отличие от стадии анализа, где применяется кривая распределения степени контрастности. Такой приём обеспечивает более мягкое и плавное затемнение или высветление и предоставляет возможность более аккуратного изменения контраста в различных областях фотографии. Например, данная функция позволяет затемнить границы хромосомы без затемнения внутренней её части.

Резкость. В системе используется двойной контроль за глубиной (**Depth**) и радиусом (**Radius**) резкости для повышения качества изображения.

Радиус резкости должен быть скорректирован с учётом разрешения камеры и уровня мелких элементов изображения.

В режиме Binning 1 (максимальное разрешение) оптимальное значение радиуса примерно равно 3.

Для режима Binning 2 (половина максимального разрешения) достаточное значение радиуса будет примерно равняться 2.



Глубина резкости. Рассматривая данную характеристику следует отметить, что с большими значениями радиуса резкости следует использовать малые значения глубины резкости и наоборот, применяя малые значения радиуса, лучший результат достигается при больших значениях глубины резкости. На основании сказанного выше можно выделить следующее:

Для режима Binning 1 (максимальное разрешение) оптимальные значения глубины резкости составляют 0.5-1.

Для режима Binning 2 (половина максимального разрешения) наиболее подходящие значения глубины резкости находятся в интервале от 1 до 2.

Для каждого последующего обрабатываемого снимка по умолчанию будут использоваться настройки, установленные в предыдущем. Отключение функции улучшения изображения скрывает соответствующее окно, но последние использованные настройки будут применяться ко всем последующим обрабатываемым фотографиям.

Автоматическое наложение порогов

Если для обработки фотографий метафазных клеток используется автоматическое наложение пороговых масок, то для удаления фона система использует функцию предиктивного наложения пороговой маски. Если данная операция приемлема для проводимой работы (хорошие результаты будут обеспечены при использовании хорошо окрашенных препаратов с равномерным распределением метафазных клеток и низким фоновым шумом препарата), то вы можете контролировать любые настройки и характеристики функций, предназначенных для коррекции и улучшения качества изображения, используя меню **Zero Enhancements**.

Как и в случае применения методики FISH, рекомендуется сохранить первоначальное изображение, если используется автоматическое наложение пороговой маски, что позволяет в последствии ещё раз наложить маску перед проведением анализа.

Полученные фотографии сохраняются в **активной** (открытой) папке. Вам необходимо лишь выбрать в меню навигатора необходимый вам препарат (или создать новый при помощи нажатия правой кнопкой мыши) и нажать кнопку **New Cell**, которая находится под окном, показывающим текущее изображение (и так для каждого нового снимка).

Повторная съёмка метафазных клеток

В каждой ячейке сохраняется лишь одна фотография клеток, находящихся в метафазе. При пересъёмке новый снимок записывается поверх предыдущего.

- ☐ Выберите необходимую ячейку в меню навигатора (она будет выделена голубым цветом).
- ☐ Клик левой кнопкой мыши на текущем изображении без выбора новой клетки. После этого появится сообщение, оповещающее о том, что изображение записано в соответствующую ячейку.
- ☐ Для перезаписи изображения выберите пункт **Recapture Metaphase** и повторите описанные выше операции.

Будьте осторожны при выборе клетки в меню навигатора и перезаписи фотографий, поскольку новые снимки будут записаны **поверх** старых.

Защита от «случайных» хромосом

Кариотип связан с определённой клеткой и может быть создан только с использованием объектов, находящихся на одной фотографии, однако объекты-«предохранители» могут быть скопированы в фотографию метафазы для кариотипирования в процессе анализа. Если все метафазные хромосомы не вмещаются в один снимок, то возможно их копирование в качестве объектов-«предохранителей».

Убедитесь в том, что на данный момент в навигаторе выбрана необходимая вам клетка (она будет выделена синим цветом)

Не выбирая новой клетки, нажмите левой кнопкой мыши на текущее изображение. После данного действия появится сообщение, напоминающее вам о том, что фотография записана.

Выберите пункт «Join» (присоединить), переместите предметный столик микроскопа для поиска и просмотра «выпавших» хромосом. Все последующие процедуры абсолютно те же, что описаны выше.

После съёмки и наложения пороговой маски полученное изображение каждой клетки будет отображаться в навигаторе. Вы можете сохранить несколько «составных» фотографий каждой клетки. Во время анализа метафазных хромосом «дополнительные» хромосомы необходимо всего лишь «перетащить» в область анализа.

Анализ снимков

Фотографии, полученные в системе CytoVision, обрабатываются в окне анализа, которое вы можете выбрать нажатием на **Analysis** на главной панели инструментов.



Выбранный инструмент отображается на обоих экранах: сверху главной панели инструментов и по центру панели инструментов анализа. Всего открывается шесть окон для просмотра обрабатываемых изображений; самое большое – окно анализа, где производятся необходимые операции над изображением.

Доступные операции

Анализ фотографий проводится использованием функций системы **CaseView**, которые были разработаны на основе стандартных операций, проводимых после съёмки необходимых объектов. В окне анализа CaseView доступны функции подсчёта, нумерации и кариотипирования метафазных клеток и автоматическая загрузка обрабатываемых фотографий.

Работа с изображениями

Загрузка изображений

Изображения автоматически загружаются из открытой в навигаторе папки.

Указания для ручной загрузки:

- ☐ Двойной клик на иконке необходимого изображения в меню навигатора, после того, как курсор примет вид знака вопроса, кликнуть на окне номер 6.
- ☐ Выберите изображение в меню навигатора и нажмите на кнопку **Load** («Загрузить»), расположенную под навигатором и укажите окно, в котором будет отображаться выбранная фотография.
- ☐ Выберите ячейку в навигаторе и затем нажмите кнопку **Load Cell** («Загрузить ячейку»), расположенную под навигатором. Данная команда загружает до 6 изображений одновременно в доступные для просмотра окна.

Сохранение изображений

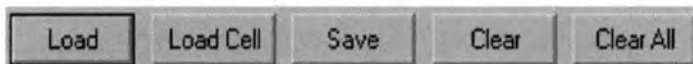
Все полученные данные автоматически сохраняются при переходе в меню **Case View** («Просмотр папки»). Для того, чтобы сохранить изображения вручную, произведите следующие операции:

- ☐ Нажмите на кнопку **Save** («сохранить»), расположенную под навигатором и выберите изображение, которое вы хотите сохранить.
- ☐ Правый клик на любом месте фотографии откроет всплывающее меню, в котором следует выбрать пункт **Save** («сохранить»).

Очистка рабочих окон

Для того, чтобы очистить рабочие окна программы, вам следует:

- ☐ Нажать кнопку **Clear** в нижней части навигатора и кликнуть по знаку вопроса, после чего изображение будет удалено.
- ☐ Для очистки всех окон нажмите кнопку **Clear All** («удалить всё») в нижней части меню навигатора.



Перед тем, как окончательно удалить обрабатываемые изображения, CytoVision предложит сохранить все сделанные изменения.

Перемещение изображений

При помощи клика левой кнопкой мыши фотографии из второстепенных окон можно переместить в главное окно. Клик средней кнопкой мыши и последующее нажатие левой кнопки на одном из второстепенных окон поменяют местами изображения в данном и главном окнах.

Зумирование

Колесо прокрутки предоставляет возможность изменять масштаб изображения в главном окне. Увеличение масштаба производится относительно положения курсора (геометрический центр

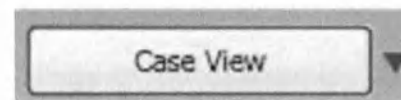
увеличиваемой области фотографии) и имеет 14 фиксированных позиций. Каждое нажатие на колёсико вызывает увеличение масштаба на 50%. Максимальное значение увеличения составляет 800% (8x).

Отмена операций

Возможность использования отмены операций особенно полезна в случае, если над каким-либо объектом были совершены ошибочные действия. Необходимо отметить, что применение данной функции предусматривает отмену только ПОСЛЕДНЕГО действия. В случае если было сделано несколько неверных операций, то вам потребуется функция полного восстановления (**Restore**).

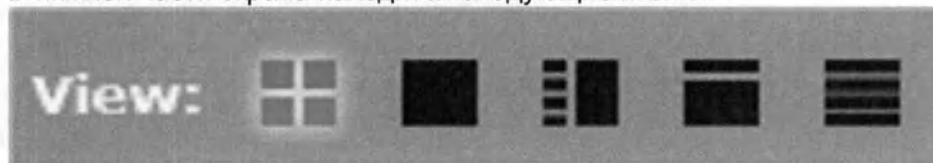
Аналитическая система CaseView

Меню просмотра папок (для вызова нажмите кнопку **Case View** в верхней части навигатора в режиме анализа) предназначено для максимально эффективной работы с образцами: начиная от просмотра фотографий метафазных клеток, заканчивая полным анализом и созданием отчёта по каждой отдельной папке. Некоторые функции данного раздела ссылаются на обычные функции кариотипирования системы CytoVision, однако многие являются специфическими и встроены только в данный раздел.



Работа с каталогами

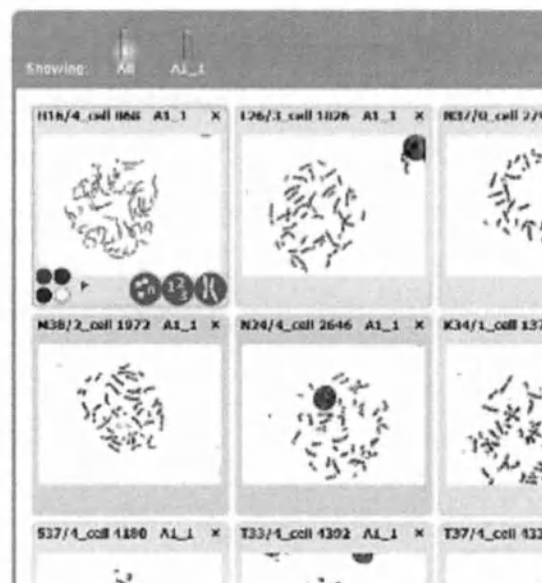
В нижней части экрана находятся следующие иконки:



Планировка Анализ Очистка Идентификация Отчёт

Планировка – данная функция даёт возможность просмотра снимков метафазных клеток, а так же позволяет пометать каждую отдельную клетку зелёным, синим, красным или белым цветом. Используйте масштабирование для установки необходимого уровня детализации изображения, подходящего для проведения анализа (не подходит для идентификации отдельных хромосом или их сегментов).

Каждый цвет не связан непосредственно ни с какой программной функцией. Однако вы можете использовать их, например, в целях сортировки (выбор цвета осуществляется в выпадающем меню в соответствующем пункте **Color**). Рекомендуется использовать зелёный цвет для маркировки клеток, достаточно достоверных для начала анализа, синий – для клеток-кандидатов, подготовленных к анализу, красный – для клеток, которыми стоит пренебречь или удалить, и белый цвет для неотсортированных клеток, которые впоследствии могут быть отнесены к «синим» или «зелёным».



Также в данный раздел программы включены следующие функции: **Slide (препарат)**, **Colony (колония)** (для препаратов, сканированных с применением функции поиска колоний), **Navigator** (поиск по базе данных имён клеток), которые можно применять к проанализированным клеткам, независимо от того были ли они пронумерованы, посчитаны и кариотипированы, или нет.

Нажатие на красный крест в верхней части окна запускает удаление нескольких клеток.

Для удаления нескольких объектов выберите вышеуказанным способом необходимые клетки и нажмите на кнопку **Delete Marked Cell(s)** (удалить помеченные клетки), расположенную внизу экрана.

Анализ. Данный раздел системы даёт полноразмерное изображение клетки, выбранной на странице планировщика. Панель инструментов в нижней части экрана включает в себя стрелки для выбора предыдущей или следующей клетки (в порядке, установленном на странице планировщика) и отображает информацию о выбранной клетке. На той же панели инструментов присутствуют ещё 3 кнопки: ручной подсчёт хромосом, нумерация хромосом (в данных разделах числовые значения могут быть введены вручную). Третья кнопка (**Karyotype**) открывает страницу анализа и загружает необходимую метафазную клетку для сегментации и кариотипирования. Если для какой-либо клетки были записаны дополнительные изображения (см. предохранение от потерь хромосом), то для их загрузки на страницу анализа вам необходимо нажать кнопку **Merge Fuses** до того, как вернуться к странице просмотра папок.



Число рядом с каждой кнопкой показывает количество обработанных клеток (общее количество метафазных клеток отображается между стрелок). Зелёный цвет числа показывает количество клеток, которые были подвергнуты данной операции. Если оно выделено красным цветом, то данное число показывает, что к текущей клетке данная операция не была применена.

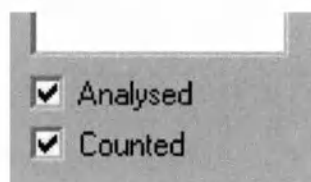
Данные числа изменяются согласно следующим правилам:

Подсчитываются только клетки, помеченные соответствующим образом.

Анализируются и подсчитываются только пронумерованные клетки.

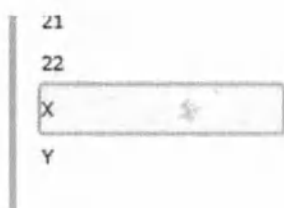
Число около кнопки **Karyotype** показывает количество кариотипированных, подсчитанных и проанализированных клеток.

Поле «Текущее состояние анализа» для каждой клетки может быть отредактировано на странице анализа системы CytoVision с использованием функции «Отчёт по кариотипу».



Очистка. Данная функция используется для «выделения» отдельных хромосом, что сделано согласно требованиям анализа в некоторых странах, в которых оговорено, что не менее двух пар хромосом должны иметь p- и q-плечи в обоих гомологах, как минимум распознаваемых, но ни в коем случае не наложившихся друг на друга.

При нажатии на кнопку **Clear** система отображает иконку подходящего набора хромосом из выбранной группы.



Повторное нажатие кнопки **Clear** применительно к кариотипу или метафазной клетке приводит к добавлению дополнительных иконок и выделяет номер группы зелёным цветом. Идея данной операции заключается в том, что папка может быть заполнена только в том случае, если среди всех наборов хромосом выделено хотя бы две клетки (они не обязательно должны быть схожими).

Идентификация используется для отображения каких-либо комментариев, оставленных к снимку, или пометок о нестандартном подсчёте хромосом в клетке в процессе анализа (использование **Ctrl-K** (оставить комментарий) или **Ctrl-B** (многократный подсчёт)). Эта функция будет весьма полезна при анализе клеток костного мозга или анализе разрывов, или при анализе кариотипа, отличающегося от обычных случаев.

Отчёт является последней стадией анализа. На странице «Отчёт по папке» выводятся результаты всей проведённой работы.

	Colonies	Counted	Analyzed	Karyotyped	Male	Female	Processed Cells	All Cells
Totals:	15	3	3	2	0	3	4	54

В строке **Totals (Итого)** показаны все данные, полученные в процессе анализа.

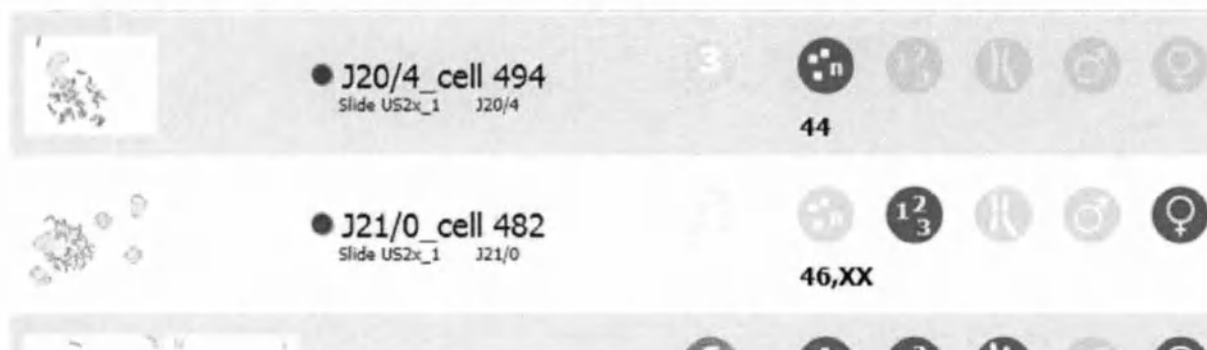
Колонки **Counted** (подсчитано) и **Analyzed** (проанализировано) совпадают для каждой обработанной клетки.

Колонка **Karyotyped (кариотипировано)** всегда отображает количество созданных и сохранённых изображений кариотипов в папке.

Колонки **Male & Female** появляются только в случае правильного заполнения (XX or XY) полей результатов подсчёта, нумерации и кариотипирования.

Колонка **Processed Cells (обработанные клетки)** показывает количество клеток, при анализе которых была применена хотя бы одна из аналитических функций.

Колонка **All Cells (все клетки)** отображает общее количество снятых метафазных клеток.



Каждая клетка отображается вместе с иконкой метафазы (и кариотипа, если таковой имеется), после чего добавляется краткий отчёт по анализу данной клетки и наименование препарата. Также отображаются результаты любых подсчётов или какие-либо оставленные комментарии.

Перемещение курсора на иконку вызовет увеличение окна, содержащего информацию по данной клетке, по центру экрана.

При нажатии на иконки **Counted** или **Analyzed** будут вызваны, соответственно, диалоговые окна функций ручного подсчёта и нумерации хромосом, в то время как нажатие на иконку **Karyotyped** откроет окно просмотра снимков клеток и кариотипов.



Очистка папки

Delete Unprocessed Cells

На экране создания отчёта присутствует кнопка, отвечающая за удаление необработанных изображений клеток, которые не подлежат сохранению в требуемой папке и последующей архивации.

Нажмите указанную кнопку для открытия окна удаления, в котором будут показаны все фотографии, не подвергнутые подсчёту, нумерации или кариотипированию. Если вы хотите исключить из этого списка какие-либо клетки, то для этого достаточно щёлкнуть по соответствующей иконке. После этого выбранные изображения будут перемещены в другой раздел.

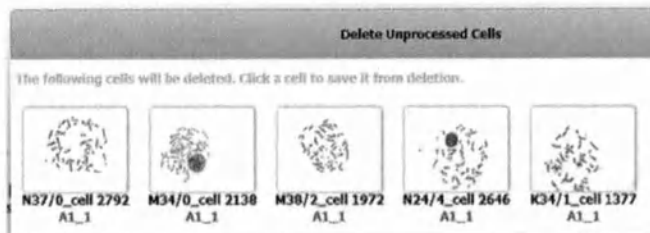
После этих процедур вы можете удалить ненужные вам снимки. Следует отметить, что удалённые файлы нельзя восстановить, действие данной функции системы аналогично удалению файлов в меню навигатора.

Печать отчёта. Данная функция выводит на экран все сводные данные по проведённому анализу.

Так же эти данные будут отображаться в описании папки относительно каждой отдельно взятой клетки.

Количество отображаемой информации зависит от заданного пользователем уровня, для этого выберите необходимый пункт в выпадающем меню. В конце отчёта автоматически будет добавлено имя препарата и клетки.

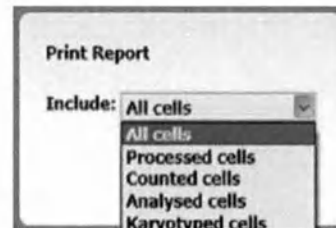
Для печати отчёта в окне настройки параметров печати выберите установленный и настроенный принтер.



Case 2007.0498a

Cells: 1 (of 4)
Total Processed: 1
Colonies: 0

- 1 Colony number
- Counted cells: 1
- Analysed cells: 1
- Karyotyped cells: 1
- Male cells: 0
- Female cells: 1



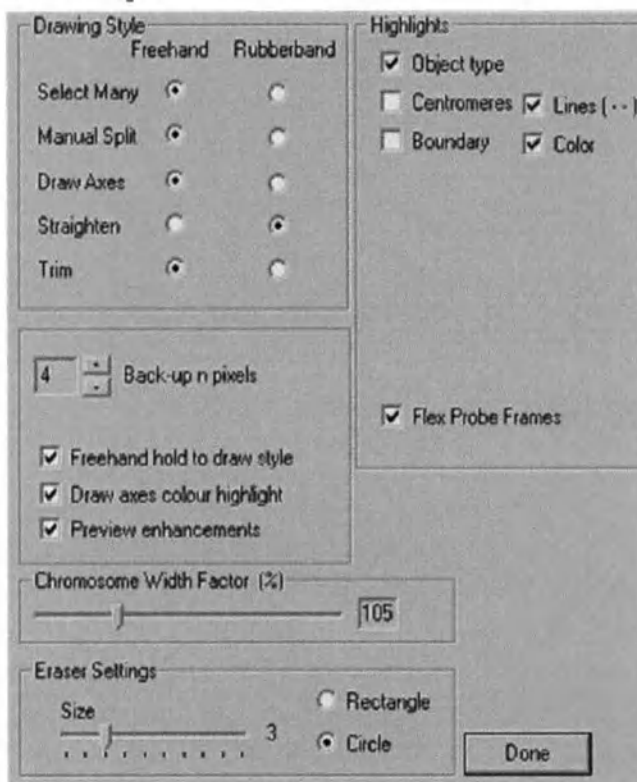
originalev3.92

Slide: essai

47,XX,+21

Свойства режима анализа метафазных клеток

Вся нижеприведённая информация показана на примере настроек, проиллюстрированных на вставке справа. Изменение данных параметров приведёт к результатам работы, отличающимся от представленных в данном руководстве. Для получения дополнительной информации о настройках воспользуйтесь файлом справки (пункт **Help** в меню **Analysis>Options>Customize analysis**).



Обработка комбинированных снимков

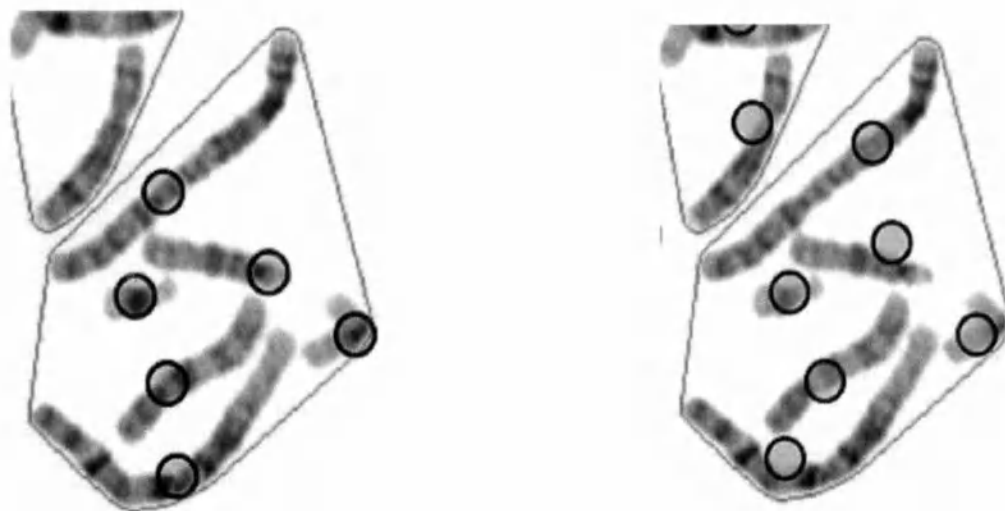
Для составления кариотипа используются только хромосомы, зафиксированные на фотографии исследуемой клетки. Если разделённые хромосомы были сняты с применением комбинированной съёмки, то их фотографии сохраняются в системе как отдельные файлы, поэтому перед составлением кариотипа необходимо скопировать данные изображения на основное.

- ☐ Дополнительное изображение загружается в главное окно, основной снимок метафазной клетки – во второстепенное.
- ☐ Убедитесь, что «комбинированные» хромосомы сегментированы (проверка разделения, наложения хромосом и определение их осевой линии).
- ☐ Выберите все хромосомы на дополнительных снимках таким образом, чтобы они были выделены цветной рамкой.
- ☐ Перетащите (удерживая нажатой клавишу Ctrl) выделенные хромосомы на основной снимок, открытый во второстепенном окне.
- ☐ Хромосомы будут перенесены на такое же место, где они находились на дополнительном снимке, выделены цветной рамкой и помечены литерой 'F' (если в настройках включена опция **Object Type**). Вы можете перемещать выделенные хромосомы на любое подходящее вам место в пределах основного снимка посредством простого «перетаскивания» их мышкой.
- ☐ После проведённых операций клетка готова к кариотипированию.



Подсчёт метафазы

Экран подсчёта открывается при нажатии на кнопку **Count** на главной странице аналитической программы CaseView или нажатием на иконку **Manual Count** на панели инструментов программы анализа. Кликните на изображении, чтобы поставить красный маркер на хромосому, каждый последующий клик добавляет по одному маркеру на месте, где был курсор. В нижней левой части экрана отображается общее количество отмеченных хромосом (там же находится кнопка **Clear** для сброса счётчика). Кнопка **Count** находится под счётчиком, также в левом нижнем углу экрана. Для того, чтобы удалить один из маркеров, достаточно щёлкнуть по нему левой или правой кнопкой мыши (рекомендуется использовать правую кнопку, поскольку вы не поставите ещё один маркер в случае «промаха»). Все маркеры станут зелёными, когда их количество достигнет 46.



Либо вручную введите количество хромосом и для сохранения результата нажмите **OK**. После нажатия на кнопку **count** для того, чтобы ввести результаты ручного подсчёта в соответствующее поле, или впишите его непосредственно в кариотип или комментарии к нему. После этого клетка помечается, как посчитанная и заносится в результаты в окне «Результаты Кариотипирования» (**Karyotype Result**).



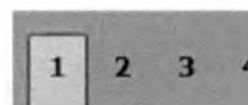
Если маркеры чересчур перекрывают хромосомы или скрывают их детали, то при помощи ползунка вы можете изменить их размер или сделать их прозрачными при помощи кнопки **Transparency** («прозрачность»).



Нумерация метафазы

Откройте экран подсчёта при помощи кнопки **Analyze** на странице анализа или нажатием на иконку **Chromosome Numbering** на главной панели инструментов. В нижней части экрана отображается количество пронумерованных хромосом в каждом классе, зелёным цветом выделяются гомологичные классы, красным – все остальные. Жёлтым цветом выделяется класс, в котором на данный момент ведётся последовательный подсчёт.

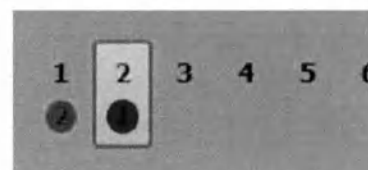
При нажатии на кнопку **Show all markers** будут выделены все маркеры, поставленные на данном изображении, в противном случае будет выделен только отображаемый класс. При перемещении курсора на любой маркер остальные будут выделены автоматически.



В системе есть 2 способа нумерации. Вы можете воспользоваться любым на ваш выбор.

Последовательная нумерация гомологичных хромосом

Данный метод подразумевает, что вы располагаете двумя гомологичными наборами хромосом. Смысл заключается в том, что вы методично и последовательно ищите каждую хромосому и помечаете её как «проанализированную». Начиная с 1 набора кликните на обе 1С хромосомы на изображении. Каждый клик ставит на хромосоме маркер и изменяет значение счётчика около каждого класса, после двух полных подсчётов для хромосомы 1 жёлтым цветом выделяется следующий класс.



Повторяйте все действия для каждого класса до тех пор, пока не будет найдена X-хромосома. Если клетка является мужской, то после этого следует переключить режим выделения на Y-хромосому, перед тем, как её выбрать.

Если вы обнаружили отсутствие некоторых хромосом, то передвиньте выделение вручную, просто кликнув на иконке следующего класса.

Для перемещения выделения можно использовать дополнительную цифровую клавиатуру. Для этого достаточно нажать номер гомологичного набора, который вам необходим. Для 10-19 наборов вторую

цифру следует вводить сразу за первой (так же для наборов 20-22). Кнопка «-» - для выбора Y-хромосомы, Кнопка «+» - для X-хромосомы.

Нумерация отдельных хромосом при помощи правой кнопки мыши

Данный метод предполагает, что вы будете идентифицировать каждую хромосому независимо от её класса и позиции. Принадлежность каждой хромосомы к классу определяется визуально при помощи курсора, после этого следует нажать правую кнопку мыши для того, чтобы открыть окно подсчёта. Наведите курсор на необходимый класс и кликните по нему левой кнопкой. Повторите эти действия для каждой хромосомы. В любой момент вы можете закончить подсчёт и полученные результаты будут автоматически сохранены, но клетка будет помечена как «проанализированная» только после нажатия на кнопку **Result** перед закрытием окна подсчёта.

1	2	3	4	5
6	7	8	9	10
11	12		13	14
15	16	17	18	19
20	21	22	X	Y

1 2 3

Сегментация хромосом

Перед тем, как составлять кариотип, требуется, чтобы все хромосомы в метафазе были выделены в качестве отдельных объектов. Для того, чтобы сделать это, Вам следует воспользоваться инструментами, описанными ниже. В нижней части экрана отображается графа **Count**, в которой указывается общее количество отдельных объектов, присутствующих на изображении.

Count 37

Предиктивная сегментация

Некоторые инструменты сегментации (разделение, наложение и объединение) могут применяться как в ручном, так и в автоматическом режиме. Автоматический режим связан с меньшими затратами времени и включается в системе по умолчанию, когда вы выбираете указанные инструменты. Система выделяет цветом предполагаемые действия над объектами – и если вы согласны с предложенным вариантом, кликните левой кнопкой для начала работы. Если вы не согласны – нажмите правую кнопку мыши, тем самым переключив систему в ручной режим.

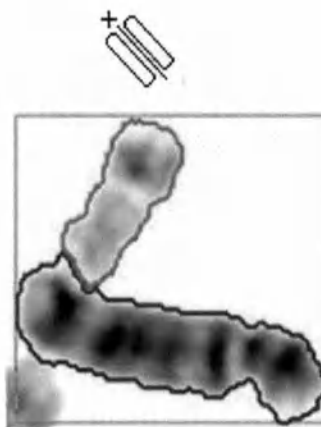


Инструмент разделения

Данный инструмент предназначен для разделения объектов (но не наложения их друг на друга).

После выбора данного инструмента курсор приобретает следующий вид:

Автоматический режим – Наведите курсор на группу хромосом на изображении. После этого предлагаемый вариант разделения хромосом будет выделен границами синего и зелёного цветов. Для подтверждения операции нажмите левую кнопку мыши (после разделения цвета границ станут несколько бледнее) и переходите к следующим хромосомам. На каждый клик происходит однократное применение инструмента разделения, если вы допустили многократное нажатие кнопки мыши, то это может повлечь за собой неправильное разделение хромосом.



Ручной режим – Правый клик поменяет цвет выделения на фиолетовый и курсор примет вид небольшого креста. Это означает, что функция разделения переведена в ручной режим и выделение границ хромосом производится мышью, удерживая нажатой левую клавишу (техника **Freehand Hold to Draw**). Нарисованная линия фиксируется на изображении в тот момент, когда вы отпустите левую

клавишу мыши. Повторяйте указанные действия до полного выделения границ хромосомы, после чего нажмите правую кнопку мыши для завершения операции – хромосомы будут разделены и курсор вернётся в режим автоматического разделения.



Инструмент обработки наложения хромосом

Данный инструмент позволяет разделять хромосомы, наложенные друг на друга, оставляя область перекрывания в обоих объектах.

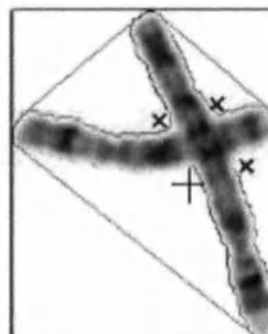
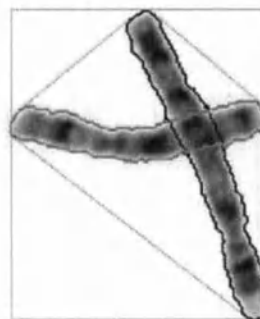
При выборе этого инструмента курсор приобретает следующий вид:



Автоматический режим – Наведите курсор на хромосомы, наложенные друг на друга. При этом предполагаемый вариант разделения хромосом будет выделен цветом. Для подтверждения операции достаточно кликнуть по объектам левой кнопкой мыши, после чего цветное выделение границ хромосом станет более бледным и при последующем перемещении курсора будут выделены следующие наложенные друг на друга хромосомы. Если одна из границ выделится красным, то это значит, что система CytoVision не может точно указать место наложения хромосом. Для разрешения данной проблемы необходимо воспользоваться ручной разметкой границ хромосом или применить инструмент создания осевой линии.

Ручной режим – Клик правой кнопкой мыши сменит цвет выделения на фиолетовый и курсор примет вид небольшого креста. Укажите 4 узловых точки около области пересечения хромосом (с наружной их стороны)

В данной главе приведены примеры для Х-образного пересечения хромосом (обычно для 2 штук). Для таких более сложных случаев больше подходит инструмент создания осевой линии.



Инструмент разметки осевой линии

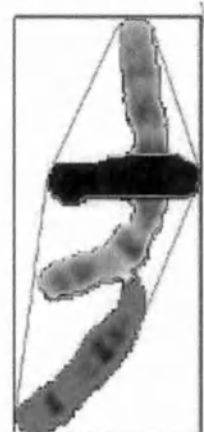


Данный инструмент позволяет разделять сложные случаи пересечения хромосом или случаи, где требуется многократное применения инструментов разделения и обработки наложения хромосом. Инструмент создания осевой линии не имеет автоматического режима работы, поэтому никаких вариантов в системе при его использовании предлагаться не будет.

При использовании данного инструмента курсор будет выглядеть следующим образом:



Клик **левой кнопкой** на группе объектов, которые вы хотите разделить, вызовет появление рамки фиолетового цвета, выделяющей данную группу, одновременно с этим курсор примет вид маленького креста. Удерживая левую кнопку мыши нажатой, проведите курсором вдоль первой хромосомы, для того, чтобы выделить её. Отпустив кнопку, вы тем самым закончите эту операцию. Повторите то же действие для остальных хромосом из данной группы. Каждая из них будет выделена своим цветом (жёлтый, красный или зелёный). Клик правой кнопкой завершит указанную операцию и, тем самым, группа хромосом будет разделена.



Примечание – в отличие от предыдущих версий CytoVision, разметка осевой линии хромосомы, не входящей в выделенную группу, не может быть отменена.



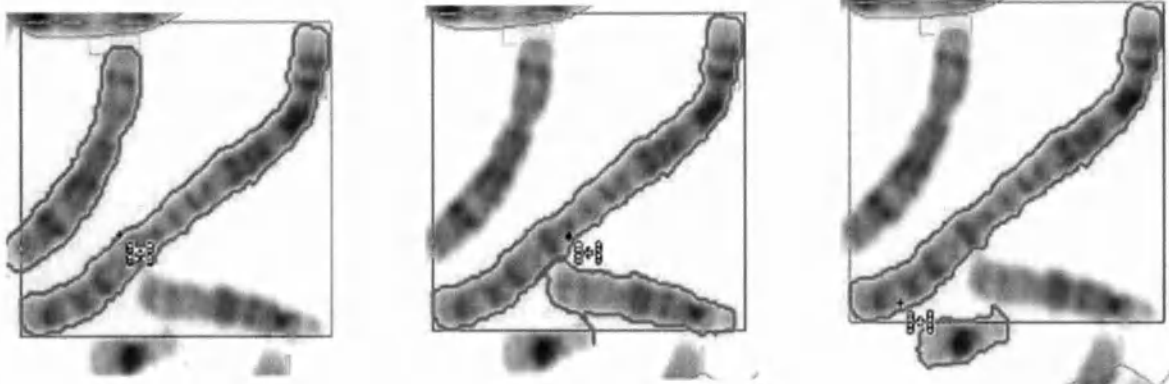
Инструмент соединения

Данный инструмент позволяет объединить два объекта метафазы в один.



Курсор при выборе этой функции примет следующий вид:

При перемещении курсора на какой-либо объект, он, вместе со вторым ближайшим к нему, будет выделен зелёным цветом. Для того, чтобы объединить два выделенных объекта, вам необходимо нажать левую кнопку мыши. Если в качестве второго объекта выделена неверная хромосома, переместите курсор ближе к необходимому вам объекту, как показано ниже:



Либо вы можете объединить два объекта вручную, щёлкнув по каждому правой кнопкой мыши.

Удаление

Использование данного инструмента даёт возможность не учитывать выделенный объект при последующем анализе. Удалённый объект не будет отображаться в кариотипе, но останется на снимке метафазы (объект не будет нигде учитываться и будет выделен красным цветом, если в системе включено цветовое выделение объектов).



Вид курсора при выборе инструмента удаления:

Для удаления какого-либо объекта достаточно лишь кликнуть по нему мышкой. Для одновременного удаления нескольких объектов нажмите на иконку **Select group** (Выбор группы) и проведите линию, касаясь ею объектов, предназначенных для удаления (не соединяйте концы линии, поскольку это приведёт к ПОЛНОЙ потере объектов внутри нарисованной области). Нажатие на кнопку **Select All** при выделенных объектах приведёт к их удалению всех объектов. Также не забывайте отключать функцию удаления при завершении работ с объектами.



Инструмент «хромосома»

Данный инструмент используется для восстановления удалённых объектов или распознавания неклассифицированных объектов (например, ввиду их малого размера), после чего они будут доступны для подсчёта и кариотипирования. Для этого нажмите на иконку **Chromosome** и кликните левой кнопкой мыши по необходимому объекту.

Сегментация и опции отображения информации

В процессе анализа можно использовать контекстное меню для быстрого переключения между основными инструментами сегментации (не забывайте, что курсор должен стоять на фоне изображения, и ни в коем случае не на объекте).

При вызове контекстного меню объекта (правый клик на нём) в меню настроек выберите пункт **Object type** (Тип объекта), где вы можете выбрать один из трёх типов цветового выделения объектов метафазы:

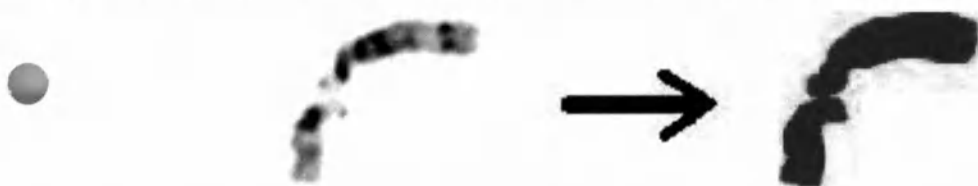
Зелёным цветом выделяются слишком большие или имеющие неправильную форму объекты, которые вряд ли являются отдельными хромосомами.

Красным цветом выделяются объекты, которые подготовлены к удалению.

Коричневым цветом выделяются неклассифицированные или неучтённые объекты.

Альтернативным вариантом является заливка объектов каким-либо цветом, что позволяет легко увидеть, что необходимо «подрезать» в объекте перед кариотипированием.

После применения опции **Colorize** (покрасить) будет выполнена заливка каждого исследуемого объекта каким-либо ярким цветом (функция основана на наложении пороговой маски). Подобное действие облегчит задачу по удалению слишком больших фоновых объектов или «подрезку» объектов.



Для большей простоты использования и быстрого доступа к инструментам обработки изображений вы можете использовать горячие клавиши или макросы (см. Часть С данного руководства).

Кариотипирование

Кариограмма создаётся на основе сегментированного изображения метафазы при помощи автоматических классификаторов. Изображение кариотипа в зависимости от установленных вами настроек может быть создано как в альбомной (**Short**), так и в книжной (**Extended**) ориентации.

Примечание – Система CytoVision в процессе создания кариотипа автоматически анализирует размер хромосом и корректирует размер изображения кариотипа согласно полученным результатам (настройки размера снимка, **Magnification settings**). Обычно ожидается, что разрешение полученного изображения будет примерно таким же, как и разрешение фотографии метафазы, за исключением случаев, когда снимки сделаны с использованием объектива с кратностью менее 60х. Если разрешение кариограммы значительно меньше, чем разрешение исходного снимка (которое зависит от используемой камеры), то это значит, что исходное изображение было получено с некорректными настройками увеличения микроскопа.



Классификатор

Откройте меню классификатора и выберите одну из 4 общих классификаций, представленных в системе CytoVision, которые позволяют вам незамедлительно начать обработку снимков:

- ☐ **G-band short.** Для слабо окрашенных препаратов (костный мозг).
- ☐ **G-band long.** Для хромосом, окрашенных по методу Гимза.
- ☐ **R-band.** For the Reverse band staining technique.
- ☐ **Inverted DAPI.** Для образцов, окрашенных по методикам DAPI или CGH.

Для каждого следующего кариотипа система по умолчанию будет использовать последний выбранный классификатор.



Автоматическое кариотипирование

CytoVision будет производить кариотипирование с использованием выбранного вами классификатора. Экран в данном режиме будет переключен на шаблон кариотипа и система начнёт классифицировать хромосомы по их размеру, форме и структуре. Каждой хромосоме присваивается классификационный

номер согласно группе, в которой она находилась. На начальном этапе к каждой группе будут приписаны только 2 хромосомы, а если в последствии к этой же группе будет отнесена третья, то она будет отображена внизу экрана, помеченная номером этой группы и литерой "с". Вы можете внести любые исправления в классификацию при помощи мыши. Поскольку хромосомы в процессе кариотипирования изменят своё местоположение, то на начальном этапе все хромосомы будут размещены в нижней части экрана и будут заполнять группы постепенно, с появлением свободного места.



Кариотипирование в ручном режиме

Кариотипирование в ручном режиме является отличным и весьма полезным инструментом для обучения, хотя в обычной практике он применяется достаточно редко.

После выбора ручного режима кариотипирования во второстепенном окне откроется пустой шаблон кариограммы. Для вывода контекстного меню, в котором указаны классы хромосом, вам всего лишь нужно кликнуть правой кнопкой по интересующей вас хромосоме.левой кнопкой щёлкните по соответствующему номеру группы, после чего он будет размещён на кариограмме и выделен розовым цветом в метафазе.

По завершении процесса нажмите правую кнопку мыши и в контекстном меню выберите пункт **Done** или просто щёлкните мышкой на любом свободном месте экрана. При этом все неклассифицированные хромосомы будут помещены в нижнюю часть экрана.



Корректировка хромосом в кариотипе

До того момента, пока методика выделения позволяет выделять хромосомы без их наложения друг на друга, в кариотипе всегда будут присутствовать неточности. Использование неверного классификатора вкупе с неправильно установленным увеличением при съёмке или плохой настройкой порогов вокруг хромосом также приводит к снижению точности в определении кариотипа.

Финальная корректировка хромосом заключается в их перемещении и правильном расположении, изменении размера (с использованием инструментов аналитической системы) и корректировки их окончательной формы (подрезка и выравнивание).

Перемещение хромосом

При наведении курсора на хромосому вокруг неё появится рамка голубого цвета, после чего вы можете провести следующие действия:

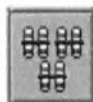
Переместить хромосому – нажмите левую кнопку мыши, не отпуская её перетащите хромосому на необходимое место и отпустите кнопку.

Вращение хромосомы – нажмите правую кнопку мыши и, не отпуская её, сдвиньте мышью вправо или влево.

Инvertировать хромосому – однократный клик правой кнопкой мыши повлечёт за собой поворот хромосомы на 180°

Swap Chromosomes – нажмите и удерживайте левую кнопку мыши, после чего перетащите хромосому на место другой для обмена их местами (для этого ищите контур красного цвета).

Примечание – Эффективная работа строится на том, что начиная с хромосом первой группы, вы удостоверитесь, что в данную группу не входят другие классы хромосом. После этого переходите к следующей группе, вместо того, чтобы искать «недостающую» хромосому 1s-набора. И так далее по всем группам. По мере продвижения, в числе оставшихся хромосом вы найдёте и «недостающие» хромосомы из предыдущих групп и сможете разместить их необходимым образом.



Разметка кариотипа

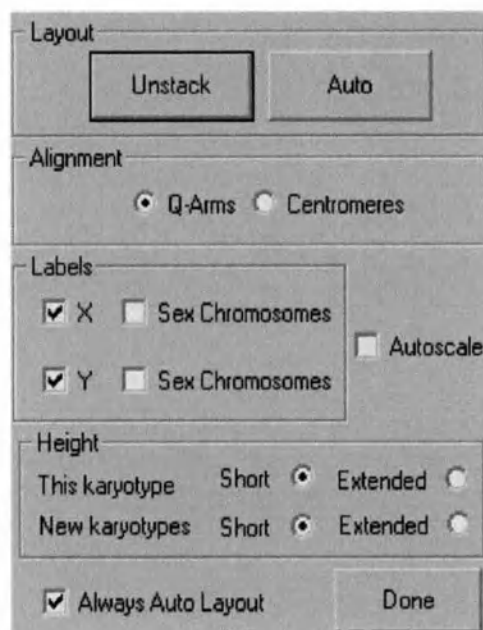
Окно разметки содержит в себе настройки отображения и размещения хромосом в кариотипе, включая возможность выравнивания центромер хромосом по одной линии или по нижней границе Q-плеча, а также их классификацию по половой принадлежности клетки.

Автоматическая разметка

Данная функция применяется автоматически после каждого произведённого над какой-либо хромосомой действия (изменение размера, формы и пространственной ориентации) и эффективно корректирует их высоту и расстояние между ними во всех 24 группах. Эта функция весьма полезна при анализе анеуплоидных и полиплоидных метафаз, где вам необходимо дополнительное пространство для дополнительных хромосом в группе.

Автозаполнение

Функция используется для автоматического распределения хромосом из нижней части экрана по группам согласно их классификации. Данная функция полезна при анализе полиплоидной метафазы.



Параметр **Height** меняет ориентацию шаблона кариотипа между альбомной (показ и печать) и портретной. Последний вариант может быть весьма полезен при работе с прометафазными хромосомами.

На более старых версиях CytoVision процесс обработки изображения видеокарты компьютера менее оперативен и может сопровождаться мерцанием картинки при отображении кариотипа. Для предотвращения постоянной корректировки хромосом в кариотипе вам достаточно лишь отключить автоматическую разметку (убрать галочку в соответствующем поле). Однако если после изменения местоположения или размера хромосомы необходима коррекция разметки, то в окне обработки кариотипа находится кнопка **Auto**.

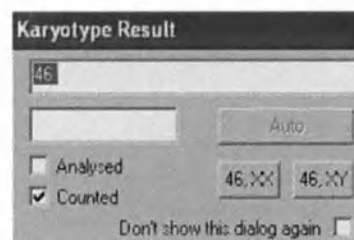


Очистка

Данная функция на панели инструментов аналитической системы запускает авторазметку без открытия шаблона. Если до этого авторазметка была включена, то запуск функции очистки не возымеет никакого эффекта.

Результаты кариотипирования

Данное окно позволяет вписывать результат анализа для каждой клетки. Эта информация будет отображаться в окне результатов системы **CaseView** и внесена в административный отчёт. Так же в данном окне можно маркировать метафазы, которые были проанализированы или просчитаны без применения соответствующих функций. Для того, чтобы полностью воспользоваться всеми преимуществами отчёта в среде CaseView, необходимо вводить результаты после каждого определённого кариотипа.



Дополнительные функции кариотипирования

После создания кариотипа вам будет доступен набор дополнительных инструментов, предназначенных для окончательной коррекции размера, формы и структуры хромосом, размещённых на кариограмме. Возможность добавления комментариев и широкий выбор настроек изображения предоставляют широкие возможности для показа, печати и экспорта изображений. Для этих настроек не существует стандартных системных настроек, поэтому вы можете использовать в любой комбинации после того, как кариотип будет полностью сформирован.

Инструменты «подрезка» и «Ластик»

Фон изображения можно отделить от хромосом в кариотипе путём «подрезки» этого изображения или при помощи одного из инструментов аналитической системы.



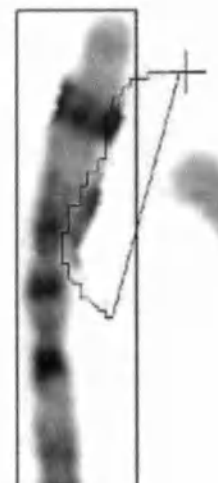
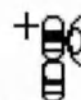
Инструмент «подрезки» изображения (Trim)



При выборе инструмента подрезки (Trim), ... приобретает следующий вид:

Кликнув левой кнопкой мыши на хромосоме, вы активируете инструмент и курсор примет вид небольшого креста. После этого начертите линию вокруг области, которую вы желаете удалить. После соединения двух концов линии всё, что находится внутри этой замкнутой области, будет удалено с изображения.

Нажав левую кнопку мыши, вы можете начертить несколько областей около одной и той же хромосомы, после чего удалить выделенные области нажатием правой кнопки мыши. Однако вы не можете таким образом обрабатывать несколько хромосом одновременно.



Инструмент «ластик»

Выбор инструмента «ластик» переводит курсор в следующий режим:

Удерживая нажатой левую кнопку мыши, проведите курсором над той частью хромосомы, которую вы хотите удалить с изображения. После того, как вы отпустите левую кнопку мыши, удаление будет завершено и вы можете переходить к следующей области или хромосоме (вы можете «подрезать» сразу несколько хромосом, просто перемещая ластик без отпускания левой кнопки мыши).

Перед использованием этих инструментов следует заранее установить нужный масштаб, поскольку во время обработки изображения колесо прокрутки мыши будет неактивно.





Выпрямление

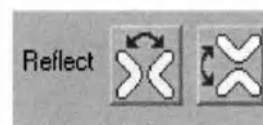
Хотя данный инструмент является довольно радикальным методом обработки изображений хромосом, он оказывается весьма полезным инструментом при прямом сравнении двух хромосом одного класса в целях поиска отклонений их от нормы. После клика левой кнопкой мыши на хромосоме система попытается перестроить хромосому и сориентировать её по вертикальной оси. Если хромосома имеет излом с большим значением угла или несколько изгибов, то необходимо произвести выпрямление хромосомы вручную, кликнув по ней правой кнопкой мыши и начертив ось вдоль всей её длины. Наилучший эффект в таком случае достигается при включенной опции **Rubber band**, что обеспечить больший контроль за направлением оси хромосомы.



Масштабирование и отражение

При необходимости вы можете изменить размер хромосом или зеркально отразить их.

Отражение. Откройте рабочее окно, выберите интересующую вас хромосому (или несколько хромосом) и примените отражение в горизонтальной или вертикальной плоскости. Этот приём может оказаться полезным как при проведении сравнительного анализа, так и при демонстрации результатов работы.



Масштабирование. По мере необходимости размер любой хромосомы в кариотипе может быть легко изменён. Откройте окно масштабирования, выберите интересующую вас хромосому (или несколько хромосом) и укажите для них новый масштаб, выбрав одно из предлагаемых значений (25-200%) или укажите более точное значение при помощи ползунка масштабирования.

Примечание

- ☐ - Функция масштабирования так же может применяться для различного рода идеограмм, стрелок и символов (настройки комментариев), но не для текста.
- ☐ - Для того, чтобы увеличить масштаб объекта более чем на 200%, его необходимо скопировать в окно для редактирования комбинированного изображения, где его текущий размер будет принят за 100%, после чего вы сможете снова его увеличить. Необходимо отметить, что это действие нельзя проводить внутри готового кариотипа.
- ☐ - Если несколько хромосом нуждаются в различном масштабировании, то это следует производить по завершению всех остальных действий с хромосомами (вращение, подрезка и выпрямление), поскольку данные функции требуют одинакового размера хромосом, поэтому их применение вызовет приведение всех хромосом к единому размеру.



Настройки контрастности и резкости хромосом

Для изображений хромосом можно скорректировать настройки контрастности и резкости, что может заметно улучшить их качество. Для того, чтобы изменения отображались в окне предварительного просмотра, необходимо включить опцию **Preview Enhancements** (предпросмотр изменений) в меню настроек.

Для настройки контрастности рекомендуется использовать гистограмму, которая предоставляет полный контроль над всеми проводимыми операциями. Резкость настраивается при помощи специального ползунка или при помощи расширенных настроек фильтра Гаусса.

Абсолютно все настройки контрастности и резкости можно изменять как для всех объектов на изображении (**Full mode**), так и в отношении отдельных объектов (**Object mode**).

Эффективность настроек будет зависеть от уровня детализации изображения хромосомы, поэтому одинаковые настройки будут давать различный эффект на разных объектах.

Object mode- настройки контрастности и резкости в данном режиме будут подбираться для каждого объекта индивидуально на основе регулировки уровней серого цвета, поэтому конечный результат для каждого объекта не зависит от первоначального качества его снимка.

- Для каждой хромосомы доступно 256-канальное выравнивание контрастности, где самая тёмная часть отвечает за насыщенность чёрного цвета, а самая светлая – белого. Но при применении одних и тех же настроек яркости одни хромосомы будут темнее других, хотя уровень контрастности для всех будет одним.

Full mode- данный режим даёт более глобальный эффект – каждая хромосома распознаётся как часть единого изображения, поэтому к ним применяются общие регулировки данных параметров. Поэтому уровень общий контрастности изображения будет более равномерным, так как хромосомы будут выглядеть несколько ярче, чем на первоначальном изображении. Поэтому самые тёмные хромосомы будут иметь наиболее полный спектр уровней цветности (ч/б).

Контраст

При настройке яркости и затемнения изображения вы можете установить одно из 10 значений при помощи специальных ползунков, но в основном для работы потребуются низкие значения этих параметров (1-4).

Яркость – увеличивает количество белого цвета, выделяет бледно-серые оттенки.

Darken – увеличивает количество чёрного цвета, выделяет тёмно-серые оттенки.

Количество чёрного и белого цветов измеряется в % и регулируется при помощи индивидуальных ползунков.



Данные параметры сдвигают баланс цветов отображаемых объектов сторону более тёмной или более светлой окраски, то есть выставив крайние значения, вы получите абсолютно чёрную или абсолютно белую окраску объекта. Ползунок для регулировки насыщенности чёрного цвета может оказаться полезным в случае необходимости выделить тёмные диски в хромосоме. Так же его можно применить для уменьшения чрезмерной контрастности очень тёмных объектов. Ползунок регулировки насыщенности белого цвета может использоваться в качестве альтернативы порогового эффекта при наличии бледного фона на границе с объектами.

Для полного удаления всех оттенков серого вы можете использовать ползунки расширенных цветовых настроек, но в обычной практике данная функция применяется достаточно редко.

Резкость изображения

При увеличении резкости изображения хромосомы, система затемняет тёмно-серые участки, осветляет светло-серые участки хромосомы и более чётко выделяет её границы. Таким образом уменьшается количество оттенков серого цвета, но в целом получается более лёгкое для восприятия изображение. Если до этого была скорректирована контрастность изображения, то перед настройкой резкости следует сохранить все внесённые изменения. Аналогично этому, вы должны сохранить все внесённые изменения при настройке резкости изображения перед дальнейшей обработкой снимка. Ползунок настройки резкости имеет 9 фиксированных положений, хотя наиболее часто при кариотипировании используются значения 3,4 и 5. Для хромосом, окрашенных по методике DAPI рекомендуется использовать значения 4,5 или 6.

Примечание – использование правильных настроек в процессе съёмки снизит необходимость в коррекции резкости изображения в процессе анализа.

Сглаживание (дополнительная опция). Данная функция является обратной относительно функции настройки резкости. В данном случае контраст между тёмными и светлыми областями уменьшается, что позволяет несколько «смягчить» зернистость изображения хромосом. Данная функция полезна при обработке снимков слабо окрашенных образцов, настройка резкости изображения которых даёт зернистость изображения или иной негативный эффект.

Инвертирование (дополнительная опция). Функция инвертирования позволяет получать негатив обрабатываемого изображения. Применяя данную опцию можно обнаружить области объектов, слабо

отличимые от фона по их окраске (например, теломеры). Результатом применения инвертирования на образцах с R-окраской или DAPI станет изображение, изображению образца с G-окраской, и наоборот.

Также для создания эффекта улучшения резкости вы можете воспользоваться различными фильтрами изображения (Фильтр Гаусса или Лапласа). Математическая основа данных функций не будет обсуждаться в рамках данного руководства, но их эффект будет существенен при анализе очень слабо окрашенных хромосом, и особенно заметен при работе с образцами, окрашенными по DAPI и инвертированной-DAPI методикам. Как правило наилучший эффект даёт фильтр Гаусса 7x7 или 9x9, другие варианты, как правило, меньше подходят для наиболее часто используемых методик окраски хромосом. Улучшения в случае G-окраски будут очень незначительны, однако при желании пользователь волен применить и более «тонкие» эффекты обработки изображений.



Восстановление

В случае выполнения нескольких операций подряд, вы можете отменить только последнюю из них. Для отмены всех операций необходимо восстановление изображения до первоначального состояния. Для этого нажмите на иконку **Restore** (восстановление) и кликните по объекту. Если необходимо восстановить несколько объектов, то после выбора функции восстановления нажмите на кнопку **Select All** (выбрать все объекты). Стоит отметить, что восстановление отменяет все изменения, внесённые при помощи функций подрезки, выпрямления и отражения.

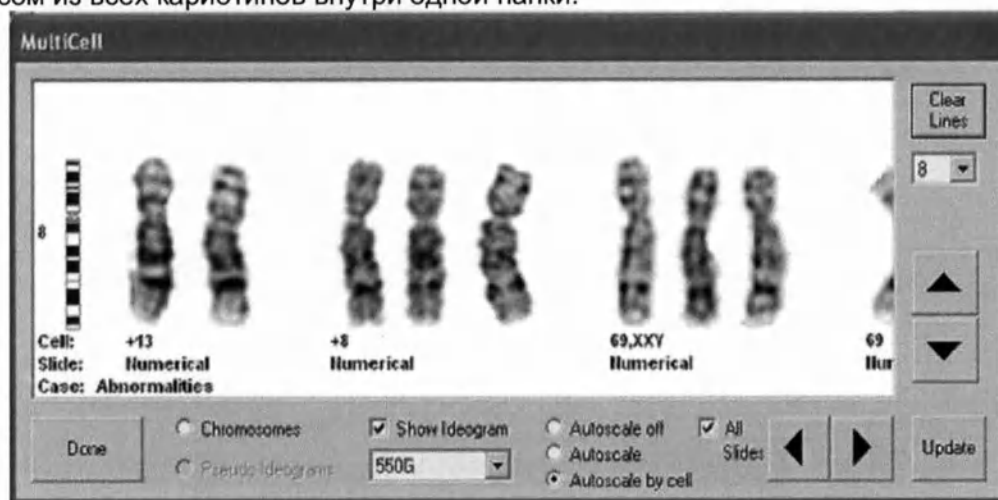
Расширенный анализ хромосом и кариотипа

Вся последующая работа, проводимая после стандартного анализа, заключается в проведении сравнительного анализа хромосом и кариотипа (используя специальные инструменты для этого анализа) или в добавлении необходимых комментариев и использовании иных специальных адаптивных функций.



Сравнение клеток

Инструмент сравнения клеток является важной опцией, предназначенной для проверки хромосом на наличие каких-либо отклонений от нормы и точности их классификации путём отображения каждого класса хромосом из всех кариотипов внутри одной папки.



Выберите необходимый номер класса хромосом из выпадающего меню или найдите его при помощи стрелок в правой части окна. Потянув за правый нижний угол окна вы можете увеличить его ширину, кроме того, при помощи правой и левой стрелок в нижней части окна вы можете прокручивать список хромосом, если ширина окна не позволяет отображать их в полном объёме.

При отключенном автоматическом масштабировании хромосомы отображаются в том размере, который они имеют в кариотипе, что не очень удобно для проведения сравнительного анализа.

При включенном автоматическом масштабировании каждая хромосома подгоняется под высоту идеограммы, расположенной в левой части окна, что оказывается очень полезным при сравнении нормальных хромосом (без различного рода отклонений).

Тем не менее, если в хромосоме присутствуют отклонения, влияющие на её длину, то эти данные могут быть потеряны при масштабировании, поэтому автомасштабирование в рамках одной клетки проводится в соответствии с размером первой хромосомы в каждом кариотипе (масштаб отображается на идеограмме в левой части экрана). Таким образом, все последующие хромосомы масштабируются согласно полученному эталону (что согласуется с правилами размещения аномальных хромосом справа от основного набора).

Высота идеограммы-эталона может быть отрегулирована через выпадающее меню в нижней части окна. Там же располагается флажок **All Slides**, отключение которого даст вам возможность просмотра хромосом, выделенных в одном и том же препарате.



Администраторский режим просмотра результатов

Данный режим позволяет проводить сравнительный анализ до 4 кариотипов одновременно, при этом в каждой строке находится отдельный кариотип, что значительно упрощает просмотр. Многие из инструментов, доступных в данном режиме, спроектированы так, чтобы просмотр и создание каких-либо пометок не вызывало затруднений, связанных с необходимостью знания других инструментов и

функций системы CytoVision operations, хотя ссылки на них будут весьма полезны при проведении множественного сравнительного анализа.

Данный раздел вызывается по нажатию соответствующей иконки на главной панели инструментов и может функционировать в 2 режимах:

1. При запуске не открыто ни одной папки. Это позволяет просматривать только те папки, которые необходимы на данный момент по тому или иному признаку. Фильтр папок настраивается в стандартном окне **Open** (открыть папку). По умолчанию фильтр настроен на отображение папок с установленным флажком **ForReview** (или любым другим аналогичным).

2. При запуске открыта какая-либо папка (или несколько папок). Будут показаны кариотипы и описания образцов, находящихся в этой папке, которая до этого была выбрана в навигаторе. Кариотипы из любых других открытых папок могут быть загружены непосредственно на экран администраторского просмотра результатов для их одновременного просмотра.

В обоих случаях перед открытием папки в ней должен быть сохранён как минимум один кариотип. Также в настройках данного раздела вы можете задать условие, что при условии использования режима №1 текущая папка должна закрываться по окончании всех работ с ней.

Справа от хромосом размещается панель управления:



Загрузить кариотип (Upload karyotype). Загрузка выбранного кариотипа из любой папки.

Прокрутить все строки (Scroll all rows). Отображение следующей строки всех кариотипов

Прокрутить одну строку (Scroll single row). Отображение следующей строки выбранного кариотипа

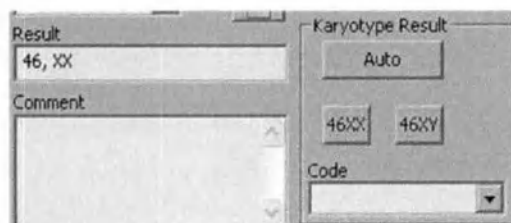
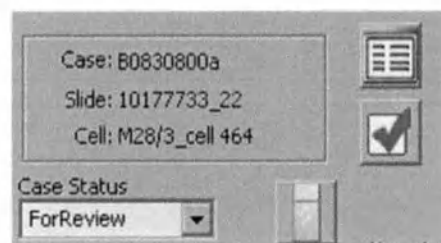
Анализ снимков (Analyze images). Загрузка снимка метафазы или кариотипа для анализа.

Печать (Print). Печать снимка с использованием шаблона, установленного в настройках печати.

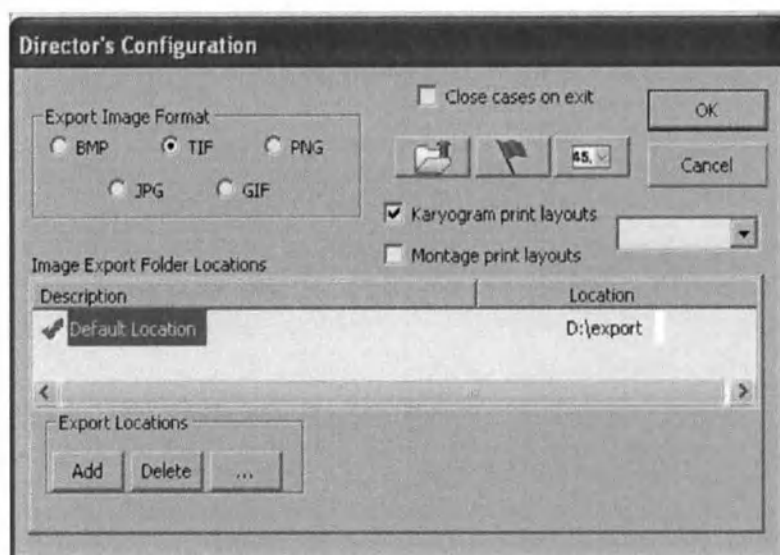
Экспорт (Export). Экспорт изображений.

Пометить изображение (Flag). Отметка изображения для последующей обработки (только при сопряжении с системой LIMS)

Остальные инструменты, доступные в данном окне позволяют вам добавлять различные комментарии или устанавливать флажок статуса (например: Завершено, утверждено и т.д.). Иконка «описание» (details) откроет свойства и описание текущей папки для просмотра и редактирования.



Отдельный раздел «Результаты анализа» добавляет результаты проведённого анализа по каждой конкретной клетке и делает их видимыми на странице отчёта и доступными при печати. Из выпадающего списка вы можете выбрать определённый код, добавляющий в итоговые результаты кариотип или какие-либо предварительные результаты анализа. Данные коды задаются в окне **Director's Configuration** («администраторские настройки»). Также в данном окне вы можете установить шаблон, используемый при печати отчёта и адреса экспорта изображений.



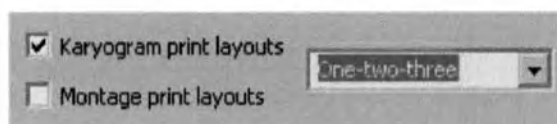
Адрес экспорт изображений. Кликните по кнопке **Add** (добавить), для того, чтобы создать новый адрес экспорта изображений. Для того, чтобы редактировать описание данного адреса, кликните по нему правой кнопкой мыши. Для выбора папки, предназначенной для экспорта изображений нажмите кнопку «Browse» (следующая после **Delete**) и укажите необходимую папку. Необходимо напомнить, что при настройке адреса экспорта изображений, вам необходимо будет настроить их формат, выбрав один из 5 предлагаемых (как правило JPG или TIF).



Коды результатов анализа. Кликните по кнопке **Add** для создания нового поля (Result Code *n*), в котором будет вписана программируемая команда. Для редактирования текста щёлкните по нему правой кнопкой мыши и введите краткое описание результата анализа или выявленного отклонения (например, **мужской, синдром Дауна**), после этого кликните по кнопке **Full Description** (полное описание) и введите текст, который должен будет отображаться при выборе заданного кода (например, **47,XY,+21**).

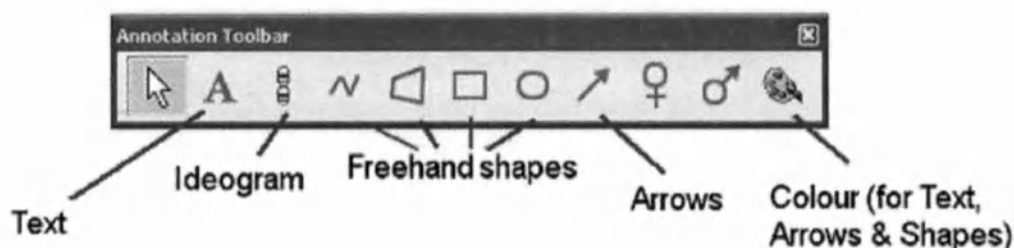
Макет печати.

Выберите один из макетов, который вы желаете использовать при печати результатов анализа. Кариограмма печатается только вместе со снимком метафазы и кариотипом. При выборе комбинированного макета в печать будет подаваться только полученный кариотип.



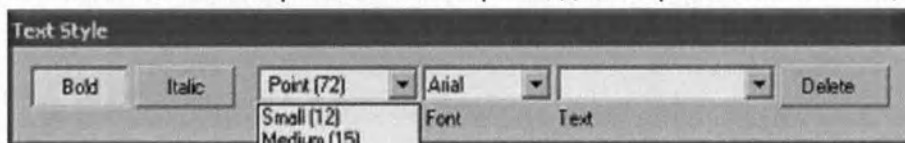
Комментарии

Панель инструментов **Комментарии (Annotation)** позволяет вставлять в изображение текстовые пояснения, различные идеограммы и рисовать геометрические фигуры, стрелки или символы для того, чтобы максимально упростить работу с полученными данными в будущем.



Текст

Кликните по иконке с изображением литеры **A**, для открытия панели ввода текста.



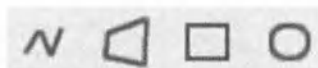
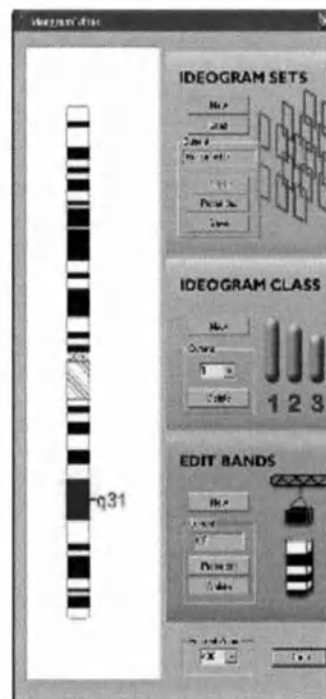
Из выпадающего списка выберите шрифт (Arial, Times New Roman, etc.), любой его стиль на ваше усмотрение (**Bold**, *Italic*), а так же его высоту, после чего кликните на изображении в главном окне, где откроется рамка для ввода текста. После этого введите необходимый вам комментарий и нажмите клавишу Enter для подтверждения. Введённый текст вы не сможете отредактировать или переформатировать, однако сможете перемещать его в пределах изображения путём простого перетаскивания (удерживая нажатой левую кнопку мыши).

Либо для ввода текста вы можете воспользоваться полем **Text**, расположенном справа в окне настроек текста и добавить его на изображение, кликнув на любом месте в главном окне. После этого введённый текст будет доступен в выпадающем списке под полем **Text**. Данное свойство будет полезно при дальнейшей работе, поскольку позволит создать список наиболее часто используемых комментариев и освободит вас от необходимости вводить один и тот же комментарий несколько раз.

Идеограммы

Нажатие на иконку идеограммы открывает редактор идеограмм (**Ideogram Editor**), где вы можете загружать, добавлять и редактировать стандартные идеограммы из системы ISCN на 300, 400, 550, 700 и 800 полос для образцов с G-окраской (400 и 550 для R-окраски). После того, как идеограмма загружена и отображается в окне редактора (после всех необходимых настроек), кликните левой кнопкой мыши на изображении в главном окне, чтобы скопировать её туда. После добавления идеограммы к изображению, вы можете изменять её размер, используя соответствующие функции, и перемещать её по изображению. Также вы можете вращать её и инвертировать, используя стандартные функции мыши, и вырезать необходимую её часть используя команду **Split** (для выполнения данной операции рекомендуется использовать инструмент выделения области для максимально точного выделения отрезаемой части). Подобная операция будет снижать разрешение изображения в целом и выделять отдельные цвета или идентификаторы.

Вы можете сохранить все внесённые изменения для облегчения будущей работы с новыми изображениями. Данное свойство позволяет создавать нестандартные идеограммы, которые помогут подчеркнуть структурные аномалии и выделить их каким-нибудь цветом, что весьма полезно при повторяющихся хромосомных перестановках.



Фигуры. Данная функция предназначена для рисования различных простых фигур (прямоугольник, круг, линия) при помощи мыши. Также доступны для вставки мужской и женский символы.



Стрелка. При выборе данной функции курсор переводится в режим рисования. Удерживая нажатой левую кнопку мыши, перетаскивайте курсор в необходимом направлении и отпустите кнопку в тот момент, когда стрелка окажется нужной длины. По необходимости вы можете изменить размер нарисованной стрелки или повернуть её вокруг собственной оси.



Цвет. При нажатии на данную иконку открывается меню настройки цвета и толщины линий для текста, фигур и стрелок (для текста доступна только настройка цвета).

Режим Составного экрана

Любые объекты, которые можно выбрать в окне анализа или такие объекты, как окно профиля или окно сравнения клеток, могут быть скопированы и вставлены в одно из второстепенных отображаемых окон для последующей работы с ними. В результате можно получить на мониторе комбинированное изображение информации, распределённой по нескольким окнам.

Копирование объектов для создания составного экрана производится так же, как и в случае вставки дополнительных снимков при обработке фотографии метафазы – в окне анализа выберите интересующие вас объекты, удерживая нажатой клавишу **'Ctrl'** и перетащите их в одно из пустых окон во второстепенном окне анализа. Подобным образом копируются объекты, принадлежащие разным клеткам или находящиеся в разных папках.

Все объекты, присутствующие на составном экране, могут быть обработаны с применением тех же самых функций и опций, что доступны на этапе анализа метафазы и составления кариотипа. Для вращения или инвертирования объектов необходимо удерживать нажатой кнопку **Ctrl** при работе с кнопками мыши.

Поскольку в данном режиме работы с объектами отсутствует функция отмены, то все операции над хромосомами (выпрямление, подрезка и др.) следует проводить после подобных операций в кариотипе или оригинальном снимке метафазы. Также стоит отметить, что в режиме составного экрана отсутствует инструмент «ластик».

Разрешение составного экрана не настроено до тех пор, пока в него не будет скопировано одно из исходных изображений, после чего разрешение устанавливается согласно размеру данных изображений. Необходимо отметить, что вы идеограммы и комментарии следует добавлять только после копирования объектов. Если объекты с более высоким разрешением будут добавлены позже остальных, то экран поменяет собственное разрешение на большее значение, в результате чего все добавленные ранее объекты будут несколько уменьшены в размере. Конфигурация экрана сохраняется в момент копирования первого объекта, поэтому если вы хотите установить какую-либо специфическую конфигурацию, то убедитесь, что все копируемые объекты были обработаны на более ранних этапах анализа. Даже если вы удалите оригинальный объект, то следует помнить, что всегда имеется ссылка на его первоначальное местонахождение.

Завершающая обработка

В системе CytoVision имеется несколько дополнительных инструментов, предназначенных для окончательной обработки каждого конкретного предмета исследования и экспорта изображений из системы, доступных после завершения основной работы над исследуемыми объектами.

Печать



Краткий отчёт по проведённому анализу может быть распечатан непосредственно с экрана просмотра отчёта. В этом случае будет распечатан лишь краткий отчёт, не содержащий в себе изображений метафазы и кариотипа. Для начала печати используйте иконку **print** на панели инструментов в окне анализа.

В окне печати вы можете также выбирать и сохранять для дальнейшего использования шаблоны, используемые при печати. В макет может быть добавлено любое изображение, загружаемое в аналитическую систему. После того, как изображение будет доступно для просмотра, и перед тем, как распечатать его, вы можете открыть описание соответствующей папки и добавить какой-либо дополнительный текст.

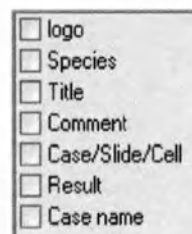
Существует два варианта компоновки отчёта, подготовленного к печати – Комбинирование изображений (**Image Montage**) и кариограмма (**Karyogram**). При предварительном просмотре вы можете выбрать один из них. В зависимости от выбранной компоновки будут применены различные установки размера изображений, размера и стиля шрифта и полей документа.

В каждом варианте компоновки присутствуют следующие компоненты:

☐ - Поля Название(**Title**) и Комментарии(**Comment**). В макете сохраняется только текст, вводимый в поле названия. Поле комментариев всегда сохраняется пустым.

☐ - В окне предварительного просмотра будут отображаться подробная информация об объектах и настройки текста, если данные опции были выбраны ранее. Описание папки будет отображаться только после загрузки изображения в окно предварительного просмотра.

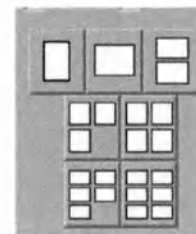
☐ - Список ключевых фраз (**Phrase List selection**). Вы можете добавить в макет дополнительные поля для текста, в которые можно вставлять дополнительную информацию (имя публикующего отчёт, поле для подписи, краткое описание отчёта и др.) из выпадающего списка, содержащего ключевые фразы.



Комбинирование изображений

Данный макет предлагает 7 вариантов печати изображений: 1 изображение в портретной ориентации, 1 изображение в альбомной ориентации, а так же 2,3,4,5 или 6 изображений на одной странице.

Выберите необходимое количество изображений и настройте их размер и расположение на листе. Для печати вы можете взять любые изображения, доступные в окне анализа, независимо от того, какой папке, препарату или клетке они принадлежат. Если изображения выбраны из одной папки, то в качестве комментария вы можете добавить описание данной папки. Если же они собраны из разных папок, то добавить можно лишь описание одного из изображений.



Кариограмма

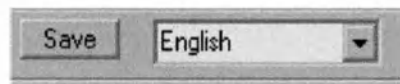
При выборе макета кариограммы будут напечатаны два изображения, представляющие собой снимок метафазы и кариотип одной клетки. Загрузив одно из изображений этой пары, второе будет загружено автоматически. Если вы добавили изображение метафазы, к которому не был составлен кариотип, то будет распечатана только эта часть макета.

Редактирование макета

Каждое изображение и текстовое поле, отображаемое в окне предварительного просмотра, может быть настроено по вашим требованиям и сохранено в макете для дальнейшего использования. Изображения можно перемещать в пределах макета, перетаскивая их курсором, и изменять их размер, «потянув курсором за один из углов».

Текстовые поля так же можно перемещать в пределах макета. Необходимо отметить, что при нажатии средней кнопки мыши на нём будет открыто окно настройки параметров шрифта.

После всех внесённых изменений введите название макета в окне сохранения и нажмите кнопку **Save**. Все сохранённые макеты будут доступны для выбора в окне настроек печати.



После того, как будет создан отчёт по папке, вы можете установить статус папки **Completed** (или любой другой созданный вами статус, см. справку: **Help> User Configuration and Logging**). Данная опция является полезной для контроля за архивацией или экспортом папок и изображений в другие папки, логические диски или сетевые папки.

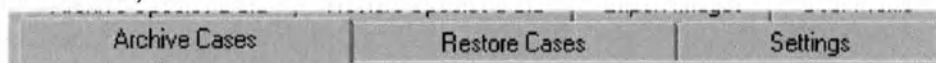


Архивация и восстановление данных

Система CytoVision основана на постоянном взаимодействии с активным списком папок (данное окно вы можете видеть после нажатия на кнопку «Открыть папку») во время съёмки и анализа препаратов. После завершения работы над папкой, её следует заархивировать для долгосрочного хранения. После того как папка заархивирована и, соответственно, удалена из общего списка, вы не сможете получить

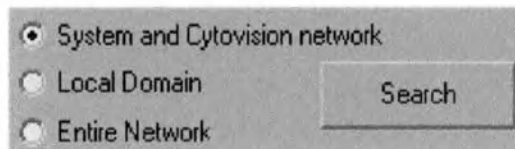
доступ к изображениям или иным данным, находящимся в ней, до того, как не восстановите её в общий список.

Окно архивации и восстановления папок содержит все необходимые опции для архивации папок, их восстановления из архива в общий список и конвертирования изображений в единый формат (например TIF или JPEG).



Настройки

Вкладка «Настройки» позволяет вам выбрать место для сохранения резервной копии данных. В окне **Archive Device** отображается список мест, доступных для сохранения архивов.



Система и локальная сеть CytoVision. Данный раздел отображает свободное место на жёстких дисках (кроме диска C) при работе в автономном режиме и доступные для записи информации диски из общего архива на главном сервере при работе в сетевом режиме. Здесь также будут показаны CD-приводы (даже если вы не можете записывать на них информацию), внешние накопители (различные USB-накопители) и сетевые диски.

Локальный домен. Нажмите кнопку **поиск** (Search) для того, чтобы проверить все сетевые накопители CytoVision на наличие искомого архива. Поиск осуществляется по всем физическим носителям или по всем сетевым папкам, которые имеют название следующего типа: **CVArc_X** (X – любая буква) и находятся в одной рабочей группе или домене. Описание всей доступной вам информации вы можете найти на вкладке «Настройки».

Общая сеть. Кликните по кнопке «search» для того, чтобы проверить наличие доступа к базе данных архивов в общей сети "CytoVision". После выбора дискового пространства, предназначенного для резервного копирования данных вы можете приступить к архивации или восстановлению данных.

Архивация данных

В сети вам всегда будет доступен список активных папок (присутствующих в общей базе данных). Для поиска по статусу или имени папки вы можете задействовать фильтр. Выбор необходимой папки производится при помощи мыши. Для того, чтобы выбрать несколько папок, выделите их мышью или нажмите левую кнопку мыши при нажатых клавишах shift и ctrl (либо нажмите кнопку Select All).

Общий размер выбранных папок будет показан в мегабайтах с учётом требуемого пространства для резервного копирования. После этого проверьте, правильно ли введено название архива и нажмите кнопку **Archive** для начала резервного копирования данных. Строка состояния будет отображать ход процесса; при архивации данных CytoVision осуществляет проверку их целостности, поэтому процесс занимает несколько больше времени, чем обычное копирование в ОС Windows. Рекомендуется делать две резервных копии на случай утери информации из базы данных. Если же вы знаете, что ваш архив был восстановлен извне (например, при восстановлении сервера вашей IT-группой), то вам желательно всегда делать двойной архив, после чего удалить первый и, соответственно, удалить архивируемую папку из числа активных.

Удаление перед архивацией. Данная опция удаляет все файлы большого размера из долговременных архивов (RAW-изображения и сканированные снимки метафазы). В системах, работающих с FISH, данная опция будет удалять Z-stack raw images. Все данные, используемые в ходе анализа (изображения и описания) никогда не удаляются в процессе архивации. Перед тем, как удалить какие-либо файлы, убедитесь, что они вам больше не понадобятся, поскольку восстановить из будет невозможно.

Восстановление данных

В окне восстановления данных вам будет представлен список папок, которые доступны для восстановления из резервной копии (включая все подпапки на данном носителе). Выберите одну или несколько папок, которые вы хотите восстановить и нажмите **Restore**.

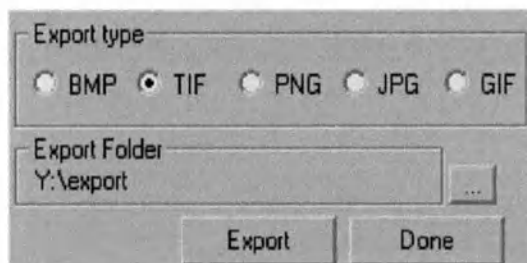
Библиотека восстановления (**Restore Library**) используется для обновления основной библиотеки системы CytoVision Library и содержит названия всех папок внутри всех архивов. Данная опция будет весьма полезна в том случае, если содержимое дисков было скопировано или в случае, если другие пользователи передают вам внешний носитель информации, содержащий архивы. При восстановлении данные не копируются в окна просмотра и анализа.

Экспорт изображений

Все изображения, используемые в системе CytoVision, можно конвертировать в единый формат (TIF или JPEG). Для того, чтобы экспортировать изображение, нажмите правой кнопкой мыши на изображении в главном окне анализа и выберите в появившемся меню **Export**. Затем выберите строку **'to File'** и укажите необходимое разрешение изображения (т.е. большее или меньшее, чем его размер в CytoVision). Для завершения операции нажмите **ОК**. Для того, чтобы выбрать место, куда и под каким именем будет скопировано изображение, используйте навигатор.

Для того, чтобы конвертировать несколько изображений в разные форматы, используйте меню настройки экспорта изображений, вызываемое и окна архивации и восстановления данных.

Список папок в данном окне выглядит точно также, как и при архивации данных. В данном списке выберите одну или несколько папок и укажите формат, в которые должны конвертироваться содержащиеся в папках изображения при их экспорте. Нажмите на кнопку Обзор (browse) и укажите адрес экспорта папок, после чего нажмите кнопку **Export**.



Сама папка не изменяется в ходе процесса и остаётся в списке активных папок. Основная файловая структура экспортированной папки (вложения, содержащие изображения) полностью соответствует оригиналу. Также при экспортировании полностью копируются второстепенные файлы, такие как списки метафазных клеток, которые не могут применяться нигде, кроме системы CytoVision.

Учётные записи пользователей

Учётные записи пользователей в системе CytoVision содержат в себе все индивидуальные настройки: Макросы, «Горячие» клавиши, настройки съёмки, а так же настройки отображения окон и иконок. Регулярное сохранение настроек профиля позволяет отменять изменения, случайно внесённые кем-либо, произошедшие в результате сбоя в работе системы или если вы хотите установить свои настройки в качестве стандартных для всех пользователей в системе.

Для сохранения настроек выберите вкладку « User Profile» в окне архивации и восстановления данных и нажмите на кнопку **Save**. В появившемся окне выберите место, куда будет сохранён файл с вашими настройками (USB-носитель, сетевая папка или папка на локальном диске) и нажмите кнопку **ОК** для сохранения. Настройки рекомендуется сохранять в отдельной папке, несущей в своём названии какое-либо краткое описание её содержимого или имя пользователя.

Для восстановления настроек профиля откройте меню **Restore** во вкладке учётных записей. Необходимо отметить, что не следует выбирать папку, уже содержащую сохранённые настройки профиля, поскольку это может вызвать некоторые затруднения при восстановлении настроек.

Appendix A. Настройка микроскопа

При настройке микроскопа следует обратить внимание на некоторые аспекты, в которых необходимо разобраться для оптимизации процесса съёмки и, как следствие, получения снимков максимального качества.

Зелёный интерференционный фильтр

Для того, чтобы оптимизировать контрастность снимков препаратов, подготовленных с использованием окраски по Гимзе, при их съёмке вам следует применить зелёный светофильтр. Образцы, окрашенные по Гимзе, преимущественно поглощают зелёный свет, поэтому все остальные длины волн будут «размывать» контрастность снимка. Поскольку камеры более чувствительны к фоновому свету, то такой эффект больше всего будет проявляться на встроенных камерах различных систем визуализации. Некоторые пользователи предпочитают использовать жёлтый светофильтр для большего визуального комфорта, что так же приемлемо для съёмки, но по сравнению с зелёным светофильтром обеспечивает меньшую контрастность.

Объективы Nikon и Olympus поддерживают установку 40-мм зелёных фильтров (GIF, Green Interference Filter) или фильтров стандарта .550. Для объективов Leica и Zeiss используются собственные аналоги.

Данные фильтры не пропускают видимый свет с другими длинами волн и свет УФ и ИК - диапазонов, хотя в последних диапазонах блокируются не все длины волн. Следует отметить, что зелёные светофильтры производства фирмы Zeiss обладают большей непроницаемостью в ИК-диапазоне.

ИК-фильтры

При съёмке в проходящем свете используется галогеновая лампа, излучающая в видимом и ИК-диапазоне длин волн. Стандартная лампа мощностью 100W имеет малую долю ИК-излучения до тех пор, пока её ресурс не подойдёт к концу. Однако менее мощные лампы (50W, 40W и 30W) имеют большую интенсивность излучения в ИК-диапазоне. В таком случае одного зелёного светофильтра при съёмке будет недостаточно, чтобы предотвратить снижение контрастности изображения, поэтому в таком случае рекомендуется использовать ИК-фильтр (так называемое «горячее зеркало»).

Следует помнить, что ИК-волны оказывают влияние только на камеру, поскольку они не воспринимаются человеческим глазом. Влияние ИК-излучения также будет заметно на FISH-изображениях, полученных с применением длинноволновых фильтров, часто поставляемых в комплекте с микроскопом. Идеальное изображение с точки зрения человеческого глаза, на снимке будет выглядеть несколько блеклым, и отличаться высоким уровнем фонового шума. Минимизировать подобные эффекты поможет установка ИК-фильтра перед камерой или непосредственно после источника освещения.

LBD/NCB-фильтры предназначены для обеспечения нормального баланса между голубым и жёлтым светом, но при использовании GIF и ИК-фильтров их эффект будет минимальным

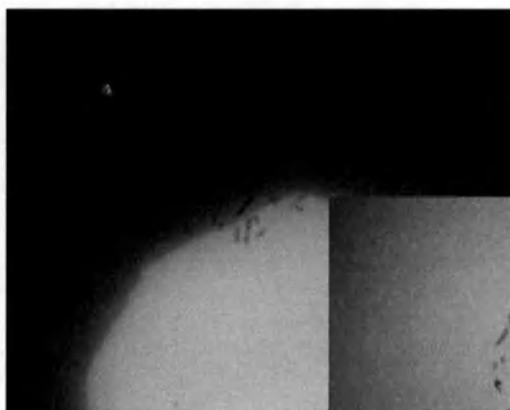
Настройка конденсора для подсветки по Кёхлеру

Все нижеописанные действия представлены на примере использования стандартного микроскопа с галогеновой лампой подсветки (фотографий сделаны через окуляр микроскопа). Конденсор должен быть настроен на работу с объективом большой кратности.

1. Убедитесь, что все настройки и установленные фильтры подходят для текущей работы.
2. Сфокусируйте изображение. Остальные действия не требуют необходимости держать в поле зрения изображение метафазы, однако это позволит убедиться, что оно находится в фокальной плоскости.
3. Закройте диафрагму на главном оптическом пути микроскопа.



Обзор будет напрямую зависеть фокусировки и расположения конденсора.



а) конденсор сфокусирован верно, но находится не по центру

б) Конденсор установлен по центру, но не сфокусирован



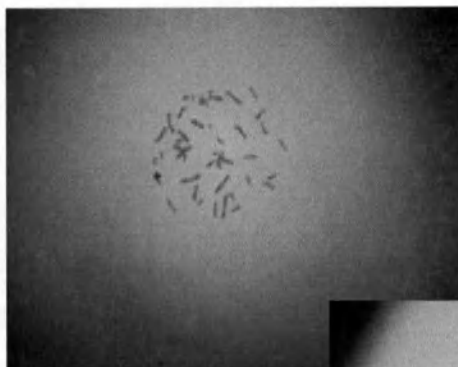
с) Конденсор сильно расфокусирован



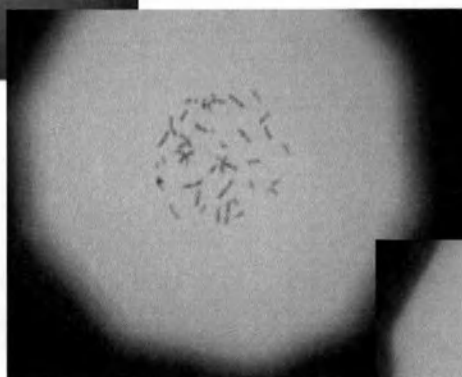
4) Поднимайте или опускайте конденсор до тех пор, пока не увидите в окуляре чёткие очертания диафрагмы.



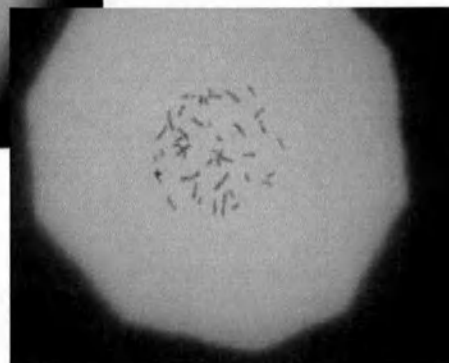
Конденсор не в фокусе



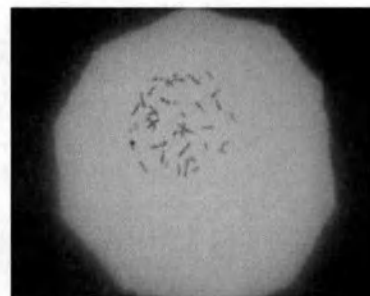
Конденсор почти сфокусирован



Конденсор сфокусирован



5) При необходимости отцентрируйте конденсор при помощи двух ручек, расположенных на его корпусе.



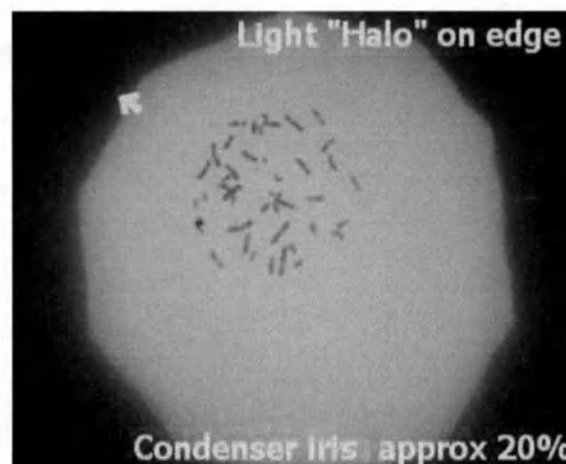
6) Откройте диафрагму конденсора на 30-50% для получения нормального уровня контрастности изображения.



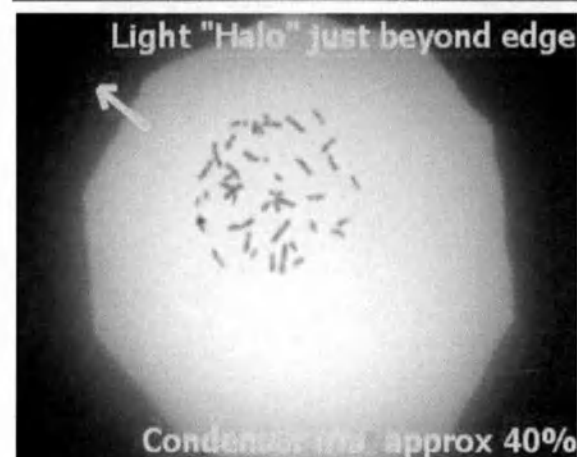
Приемлемые настройки;
оптимальная контрастность изображения



диафрагма открыта на 20-30%;
(большая контрастность и большее
количество «артефактов» из-за интерференции)



Диафрагма открыта на оптимальные 40-50%
(меньшая яркость фона и вмешательство артефактов).



7) откройте диафрагму на главном оптическом пути (см. пункт 3) на 50-80% (открытие диафрагмы на 100% снижает контрастность изображения на некоторых микроскопах). Отрегулируйте свет для комфортного наблюдения.

Регулировка подсветки

Камера JAI разработана для работы в широком диапазоне освещённости и должна быть приспособлена для работы с различными настройками, которые будут комфортны для пользователя при наблюдении образцов через микроскоп. Это является отправной точкой при настройке режимов работы, сопряжённых с автоматическим режимом настройки камеры, что позволит настроить оптимальную контрастность объектов и фона.

Поскольку некоторые микроскопы поставляются с различными светоделителями, линзами и зеркалами, то в таком случае приходится использовать различные настройки оборудования, которые определяются индивидуально в ходе настройки оборудования. Для получения более подробной информации читайте приложение В данного руководства.

Парфокальность камеры

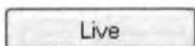
Если камера с объективом правильно смонтирована в головке микроскопа, то тогда в том случае, если изображение находится в фокусе при его наблюдении через окуляры микроскопа, оно должно так же находиться в фокусе на изображении, видимом на мониторе.

Если вы используете универсальное крепление объектива к камере, то следует настроить механизм фокусировки данного узла в соответствии с фокусировкой всей системы в целом (идеальная парфокальность). В случае, если используется жёсткое крепление объектива к камере (как с линзами, так и без них), то может потребоваться небольшая настройка фокусировки для компенсации разницы между изображением в окулярах микроскопа и изображением на мониторе (лёгкое отклонение от парфокальности), но разница никогда не должна превышать половины оборота ручки тонкой настройки микроскопа.

Если при переключении между двумя источниками изображения (окуляр и камера) требуется значительная подстройка микроскопа, это означает, что камера или крепление объектива неправильно установлено на тринокулярную головку микроскопа, что может привести к потере качества изображения, записываемого на камеру (иное увеличение или потеря фокуса).

Приложение В. Настройка режимов съёмки

Найдите на препарате метафазную клетку, переключитесь на обзор с помощью камеры и, если необходимо, увеличьте уровень освещённости. Перейдите на экран съёмки (**Capture screen**) и выберите режим **Brightfield** (поле зрения с высокой освещённостью). После этого выберите необходимую папку в навигаторе и нажмите на кнопку **Live**, чтобы видеть на мониторе изображение, поступающее с камеры. Откройте окно «Настройки камеры» (**Camera setup**), нажав на иконку на главной панели инструментов.



кнопка Live



иконка «настройки камеры»

Настройка лампы микроскопа

Камера JAI может обрабатывать сигнал в широком интервале длин волн, поэтому в данном руководстве отсутствуют рекомендации по «оптимальным» настройкам данного параметра. Если тринокулярная головка настроена на равномерное распределение светового потока между окулярами микроскопа и камерой (50-50% или 100-0/0-100%), то вы можете отрегулировать уровень освещённости по вашему желанию (для более комфортного наблюдения). В случае, если вы пользуетесь более ранней версией CytoVision, которая «стандартизует» распределение светового потока внутри системы, то установите значение экспозиции 0.020, уровень яркости 20, уровень затемнения 140 и, подстраивая микроскоп, установите линию на середину шкалы.



Недостаточная освещённость

Центральное положение.
Оптимальная освещённость

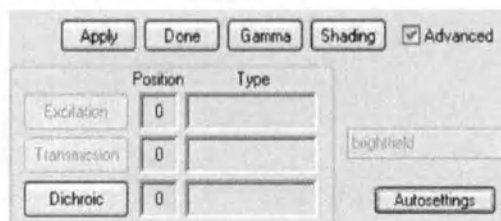
Избыточная освещённость

Данная процедура помогает установить необходимый уровень освещённости для каждого используемого объектива и позволяет пользователю отличить от необходимого уровня освещённости. Данную операцию не нужно проводить в ходе обычной работы.

Автоустановка и автонастройка

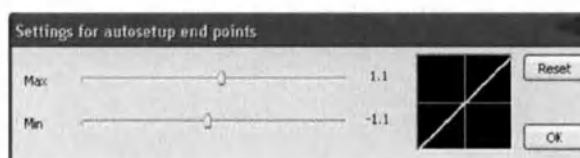
Съёмка должна производиться при включенной функции автоустановки, при этом необходимые параметры съёмки определяются автоматически при нажатии на кнопку **Live**.

Опция **Auto-settings** (автонастройка), доступная при выборе пункта "Advanced" в меню настроек съёмки, вносит поправки в конечный результат (параметры съёмки, полученные при помощи функции автоустановки) путём коррекции насыщенности красного и синего цветов в конечном изображении.



Заданные параметры будут установлены и применены как параметры по умолчанию при дальнейшей работе. Нулевое значение в настройках приводит к большей насыщенности синего цвета, чем требуется обычно (выделяет тёмные области на снимке), и уменьшает насыщенность красного цвета на фоне (что ещё больше выделяет фон от объектов, позволяя позже его удалить при помощи наложения пороговой маски). Рекомендуется начать с постепенного повышения максимума (красный цвет) с +1 и постепенного понижения минимума (синий цвет) с -1.

При обычной съёмке данные значения не должны быть большими, в противном случае это говорит о проблемах, связанных с подготовкой микроскопа или оптической системы к работе.



Настройка степени контрастности

Настройка степени контрастности эквивалентна прямому контролю за уровнем насыщенности серого цвета на изображении, получаемом с камеры и используется для смещения акцента в сторону светлых или тёмных объектов. Устанавливая значение степени контрастности, равное 0.8-0.9, увеличивается диапазон контрастности, тем самым улучшая качество изображения и детализацию объектов.

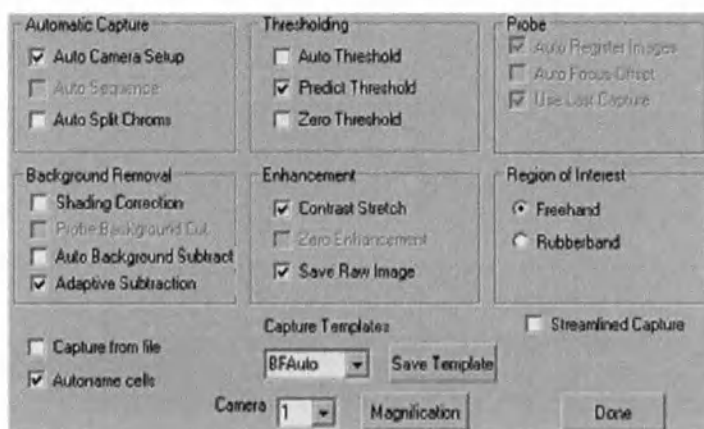
Базовая настройка (1.0) рекомендуется для FISH и флуоресцентного режимов съёмки. Для обычной съёмки метафазы (при высокой освещённости) степень контрастности рекомендуется выставлять примерно равным 0.8. Это значение рекомендуется сохранить как стандартное для подобного рода работ, нажав на кнопку **Apply**.

Данный параметр должен быть скорректирован при избыточной или недостаточной окраске исследуемых препаратов, где подобным образом может быть значительно улучшено качество получаемого снимка, что в свою очередь может помочь выявить непригодные для анализа хромосомы. Необходимо напомнить, что не следует сохранять изменение данного параметра в общих настройках, так как это приведёт к изменению оптимальных настроек для будущих снимков.



Настройка съёмки

После того, как основные принципы съёмки препаратов будут вами разобраны, можно перейти к использованию дополнительных настроек или автоматизации процесса согласно пользовательским настройкам. Оптимальные настройки съёмки будут зависеть от оборудования, входящего в состав системы, типа исследуемого образца и общих требований, предъявляемых к системе.



Рекомендуемые настройки для съёмки препаратов с G-окраской в поле высокой освещённости: Автоустановка камеры (**Auto-camera Setup**), предиктивное наложение пороговой маски (**Predict Threshold**), выравнивание контрастности (**Contrast Stretch**).

Для того, чтобы сохранить установки в учётной записи пользователя, нажмите кнопку **Save Template** (сохранить шаблон).

Дополнительные настройки и функции:

Сохранять изображения без обработки (Save Raw Image) – сохранение изображений перед проведением какой-либо обработки (до удаления фона или операций по улучшению качества) в дополнение к метафазе. Это делается для того, чтобы в любой необходимый момент вымогли бы загрузить интересующее вас изображение для его повторной обработки (повторно удалить фон, щёлкнув по иконке **Threshold** на главной панели инструментов).

Необработанные изображения занимают дополнительное дисковое пространство и не требуются для стандартного кариотипирования до тех пор, пока пользователь до конца не ознакомится с системой.

Интеллектуальное удаление фона (Adaptive Subtraction) – альтернатива стандартной функции, удаляющей фон с изображения. В данном случае система динамически отслеживает границы хромосом, вместо их оценки по размеру пикселя изображения, после чего удаляет фон со снимка. Данная функция лучше всего работает на «чистых» и хорошо окрашенных препаратах, но может давать сбои в работе при ухудшении качества фона.

Ускоренная съёмка – целью данной функции является повышение эффективности и скорости работы системы путём минимизации её взаимодействия с пользователем (максимальная автоматизация

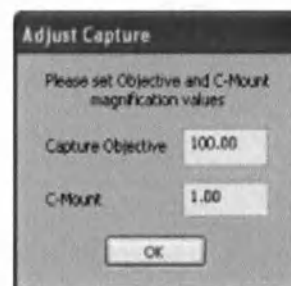
процесса). Активируется при включении автоматического наложения пороговой маски (**Auto Threshold**) и установки флажка сохранения необработанного изображения (**Save Raw Image**). В дополнение ко всему, кнопки **New Cell**, **Live** и **Capture** заменены на кнопки **New Cell + Live**, **Capture** и **Fuse**.



Для съёмки с выбранными настройками нажмите кнопку **New Cell + Live**, внесите необходимые корректировки и нажмите **Capture**. Для съёмки дополнительных полей наблюдения нажмите на кнопку **Fuse**, перенастройте микроскоп на другой участок образца и нажмите **Capture**. При выбранной опции ускоренной съёмки вы всё равно можете изменять дополнительные настройки, например, использование альтернативных кнопок для съёмки и ручное сохранение «сырых» снимков.

Увеличение

При цифровой съёмке используются настройки увеличения для определения размера хромосом, что лежит в основе их классификации в процессе кариотипирования. Важно, чтобы были введены и сохранены значения кратности используемого объектива и крепления объектива. Однако при использовании автоматической сканирующей системы эти данные не используются, поскольку определяются автоматически при калибровке системы.



Приложение С. Макросы и «горячие» клавиши в системе CytoVision

Введение

Макросы и «горячие» клавиши являются системными ярлыками, позволяющими ускорить работу. Они оптимизируют эффективность работы и сокращают затраты времени на операции, требующие одного и того же набора функций. Каждый экран системы имеет свой индивидуальный набор макросов и «горячих» клавиш, поэтому макросы, запрограммированные на экране съёмки, будут отсутствовать на экране аналитической системы. Поскольку экран анализа имеет 3 различных режима (полноэкранный, классический и с увеличенным навигатором), то вам придётся программировать макросы отдельно для каждого режима работы. Макросы и «горячие» клавиши являются индивидуальными для каждого пользователя. Каждая учётная запись в ОС Windows имеет отличные от остальных настройки и опции, предназначенные для программирования макросов (так же как и остальные настройки). Макросы сохраняются как часть пользовательских настроек и поэтому могут быть помещены в архив или восстановлены из него, как и любые данные. Если вы хотите распространить свои макросы в среде нескольких систем или предоставить их нескольким пользователям, то вам необходимо создать основной набор параметров ("Master Profile") в одной системе, после чего сохранить свой профиль и открыть его в каждой системе или под каждым логином. После этого остальные пользователи, если пожелают, смогут дополнительно настроить их исходя из своих потребностей. Макросы зачастую зависят от индивидуальных настроек системы, драйверов, настроек экрана и расположения иконок, поэтому на них легко могут повлиять любые изменения или обновления системы. Обновления программного обеспечения CytoVision так же могут изменять иконки и общий вид главной панели инструментов, поэтому после таких изменений макросы необходимо переписать для сохранения их функциональности. Фирма Genetix не несёт ответственности за изменения, касающиеся Макросов. Поскольку макросы являются специфическими операциями, отличающимися в каждой лаборатории, подразделение Genetix Europe не может вести учёт всех индивидуальных настроек макроопераций в каждой системе. Техническая поддержка и устранение проблем возможны лишь исходя из общих аспектов данного раздела (программирование и работа), и невозможны в случае каких-либо специфических шагов.

«Горячие» клавиши



Горячие клавиши заменяют действия мышью на клавиатурные команды, то есть вместо какого-либо движения мышью вы можете нажать заранее запрограммированную комбинацию клавиш или вернуться к мыши после нажатия специальной иконки. Данный приём очень полезен при выполнении повторяющихся операций, таких как подрезка объектов, выбор инструментов сегментации хромосом и др.

Для таких операций одной рукой вы совершаете все необходимые действия мышью, другой рукой вы набираете требуемую комбинацию клавиш.

Горячие клавиши предназначены для замены команд, выполняемых одним кликом мыши и не являются ярлыками для более сложных функций (например, таких как регулировка контрастности), поскольку в этом случае вам всё равно придётся совершать часть работы мышью и в этом не будет никакой экономии рабочего времени.

Для просмотра списка запрограммированных клавиш для каждого экрана, нажмите F12 и выберите интересующее вас сочетание клавиш. Если вам требуется удалить все запрограммированные сочетания, нажмите кнопку "Clear All".

Программирование «горячих» клавиш:

☐ Кликнуть средней кнопкой мыши на кнопке выбранной функции



☐ курсор изменит свой вид на значок «A-Z»

☐ Нажмите необходимое сочетание клавиш на клавиатуре

☐ Последующее нажатие сочетания клавиш будет активировать выбранную ранее функцию

Замечание – При программировании горячих клавиш допустимо использование лишь буквенных кнопок (цифры и символы исключены).

Не следует программировать горячие клавиши для каждой функции на экране, поскольку впоследствии будет достаточно сложно вспомнить необходимое сочетание, из-за их большого общего количества. Вместо этого задайте наиболее часто используемые команды, например:

Split (S), Overlap (O), Delete (D), Draw Axis (X), Colorize (C), Autoclassify (A). Количество таких команд будет не слишком большим, они будут легки для запоминания.

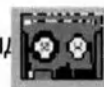


Макросы

Вы можете запрограммировать 10 макросов на каждый экран (назначаются на кнопки **F1 – F10**), используя соответствующее окно для этого процесса (Macro box, **F12**). Макрос представляет собой записанную последовательность команд и функций в определённом порядке или последовательности. Вместо того, чтобы проводить некоторую последовательность операций вручную, вам лишь необходимо нажать кнопку (одна из кнопок **F** в верхнем ряду клавиатуры), на которую был записан тот или иной макрос. Например, вы можете запрограммировать управление какими-либо настройками микроскопа, вызов того или иного экрана, отправка данных в печать и др. Каждый пользователь CytoVision имеет свой подход к работе с системой, это означает, что макросы будут сугубо индивидуальны для каждого пользователя. Таким образом, макрос сам по себе является отдельной функцией, призванной сократить затраты рабочего времени на выполнение повторяющихся операций. Прежде всего, вы должны записать необходимую вам команду, что задаст макрос в системе CytoVision. Это означает, что перед записью последовательности команд вы должны чётко представлять себе, какие клавиши и операции вам потребуются, поэтому перед этим не будет лишним научиться работать с такими последовательностями перед программированием макросов.

Запись макросов:

- ☐ Откройте окно записи макросов, нажав на кнопку F12 (или нажмите кнопку **Record** в меню макросов над главной панелью инструментов).
 - ☐ Поставьте флажок рядом с иконкой той кнопки, которую вы хотите запрограммировать и введите краткое описание макроса (пояснение действия макроса для остальных пользователей). Лимит описания – 20 символов.
 - ☐ Нажмите на кнопку Record, расположенную внизу окна записи макроса. После этого окно будет закрыто и появится анимированная иконка, имеющая вид плёночной кассеты. CytoVision будет запоминать **каждое** нажатие клавиш на мыши или клавиатуре до тех пор, пока вы не нажмёте кнопку **F11**.
 - ☐ Выполните необходимую последовательность действий (клавиатурные команды или действия при помощи мыши, вызов функций для обработки изображения и др.).
 - ☐ После завершения последовательности нажмите кнопку **F11** (или нажмите на кнопку **Stop** в меню записи макроса).
 - ☐ Нажмите на одну из F-кнопок для активации перевода системы в режим воспроизведения макроса.
 - ☐ Проверьте работу макроса, нажав на запрограммированную кнопку.
- Если при записи последовательности вы допустили ошибку, то нажмите кнопку Stop (**F11**) и начните снова. Удалить макрос можно использовав команду "Delete" в окне записи макросов. Описание макроса может быть отредактировано в любой момент времени без необходимости его перезаписи.



Советы по использованию макросов

Общие рекомендации

□ Макросы лучше всего использовать для операций, требующих больше, чем одного клика мышью. Если операция требует одного клика, то в таком случае лучше присвоить этой операции какую-либо «горячую» клавишу.

□ При записи макроса учитывается не нажимаемая на экране кнопка, положение курсора на экране, когда нажимается кнопка мыши. По этой причине каждый экран в системе имеет свой индивидуальный набор макросов, поскольку расположение кнопок и иконок на них разное.

Макрос будет работать некорректно, если будет изменено расположение какой-либо иконки или кнопки. Это может произойти в результате следующих событий:

- на главную панель инструментов была добавлена или оттуда была удалена иконка (с помощью меню View>Toolbars>Customize function), поскольку в таком случае остальные иконки будут сдвинуты вправо или влево.

- Изменены системные настройки (изменён шрифт, добавлены всплывающие окна).

□ Все специфические операции должны быть выполнены до записи макроса. Например:

- Выбор клетки в меню навигатора для загрузки в окно анализа (вы не можете записать данную операцию в макрос, поскольку в каждый следующий раз макрос будет применяться к другой клетке, имеющей иное местоположение).

- Выбор единичной хромосомы для последующей обработки. Данную операцию необходимо выполнить до записи макроса по аналогичной причине (см. предыдущий пункт). Исключение составляет случай, когда применяется функция **Select All**, предназначенная для выбора всех объектов на изображении.

□ При записи макросов для настройки контрастности изображения следует учитывать, что при их использовании гистограммы различных фотографий может отличаться друг от друга. Поэтому перед использованием макроса не забывайте нажимать кнопку **Reset** перед изменением положения ползунков. Это будет гарантировать одинаковые начальные настройки для каждого случая.

□ При записи нескольких действий в одном макросе следует помнить, что при ошибке вы сможете отменить только последнее из них. При использовании макросов для замены нескольких операций по обработке изображения, лучше всего ограничиться программированием одного или нескольких незначительных действий во избежание радикальных изменений изображения.

□ Некоторые кнопки имеют двойное назначение (например, выделение объектов при анализе), т.е. позволяют включать или отключать какую-либо функцию. Это следует учитывать при программировании макроса, поскольку первый его запуск будет активировать функцию, а второй – отключать её. Если такой вариант вас не устраивает, то убедитесь, что данная функция удетотключена внутри макроса.

□ Прервать выполнение запрограммированных команд можно нажатием кнопки **F11**.

Макрос печати

Данный пункт руководства требует дополнительного рассмотрения, поскольку при печати вы можете использовать несколько макетов и переключаться между режимами «комбинированное изображение» и «кариограмма» внутри одного макета. Необходимо учитывать то, что перетаскивание конкретного изображения на макет зависит от его первоначального расположения на экране. Поэтому перед запуском макроса вы должны убедиться, что необходимые изображения будут находиться на одном и том же месте в рабочем окне.

Для того, чтобы детальнее разобраться в данном вопросе, вам необходимо ознакомиться с типовыми правилами печати в системе CytoVision:

□ CytoVision запоминает последний использованный шаблон. Если вы используете различные шаблоны, то в макрос следует записать лишь общие настройки или создать отдельные макросы для каждого набора настроек.

□ CytoVision так же запоминает последний использованный формат шаблона («комбинированное изображение» или кариограмма). Если в процессе работы вы переходите от одного формата к другому, то перед вызовом макроса убедитесь, что при запуске макрос сбрасывает формат на установку «по умолчанию» или устанавливает необходимый вам формат перед печатью.

□ CytoVision использует для печати принтер, настроенный для данной учётной записи в меню Windows «принтеры и факсы». Если в операционной системе установлено несколько принтеров, то в процессе работы вы можете переключиться на один из них, и программируемый макрос в дальнейшем будет работать в сопряжении с данным принтером.

При записи макросов печати или устранении неполадок в них рекомендуется использовать эмулятор принтера или файловый принтер, например Cute PDF или любой подобный, поскольку после записи макроса необходимо убедиться в корректной его работе, и подобный приём позволит избежать лишнего расхода бумаги в процессе тестирования макроса в случае использования обычного принтера.

Не рекомендуется делать следующие вещи после создания макросов печати:

- ☐ Менять принтеры в процессе записи макроса.
- ☐ Записывать макрос, использующий в процессе печати несколько различных макетов или форматов, поскольку для этого потребуется несколько изображений, использование вкладки «Печать» (Print) и выпадающих меню, что будет трудно последовательно зафиксировать.
- ☐ Программировать макрос, последовательно печатающий несколько изображений, поскольку для этого потребуется более тщательный контроль за расположением используемых изображений на экране и их «перетаскиванием» на макет. Так же необходимо учитывать время отклика принтера, поскольку работа макроса не может быть приостановлена и то, что работа макроса зависит от версии операционной системы, её настроек и установленных драйверов.

Устранение проблем, связанных с работой макросов

Рекомендуется составлять для себя «схему Макроса» (алгоритм выполнения функций). Это заключается в составлении последовательного списка необходимых действий: вызываемых функций, движений мыши и нажатия кнопок. Таким образом, вы заранее можете представить общую схему работы макроса. Проверить корректность данной последовательности действий можно, выполнив их без записи макроса.

При обнаружении каких-либо проблем, вы можете обратиться к составленному ранее списку и проверить, на каком этапе происходит сбой в работе макроса. После этого вы можете внести необходимые изменения или применить другие настройки на «проблемном» этапе работы.

Наиболее часто встречающиеся проблемы при работе макросов:

- ☐ Иконки и их расположение отличаются в различных версиях программы. Если на главной панели инструментов были добавлены или удалены какие-либо иконки, то макрос может работать некорректным образом. Запустите его и посмотрите, какие используются кнопки и где движется курсор мыши, и это поможет вам установить причину проблемы.
- ☐ Окна не открываются или не закрываются так, как было запрограммировано. Поскольку работа макроса основана на записи движений мыши и отслеживании позиции окон, то при каждом запуске порядок работы может несколько отличаться от того, который был вами записан. Посмотрите на составленный ранее список записываемых действий и проверьте, каким образом вы открывали или закрывали различные окна (включая нажатия на кнопку «ОК», кнопку закрытия окна и использование разного рода опций и текстовых меню на главной панели инструментов). Также стоит поискать альтернативный способ выполнения необходимых вам операций, поскольку он может оказаться более надёжным (иногда необходимо всего лишь кликнуть мышью в ином месте).

Параметры настройки экрана в ОС Windows. Данные настройки влияют на размер иконок и шрифта в системе. Если эти параметры были изменены после программирования макроса, то это может повлиять на местоположение курсора и вызвать клик мыши на другом месте, нежели было запрограммировано. Если вы заметили какие-либо различия в настройках, проверьте их, щёлкнув правой кнопкой мыши на рабочем столе и выбрав в меню пункт «свойства». Так же стоит проверить общие настройки CytoVision, особенно настройки в меню **Appearance** («внешний вид»).

- ☐ **Панель задач Windows.** Панель задач может быть как постоянно закреплена поверх всех окон, либо автоматически скрываться. Данный параметр регулируется установкой флажка около строки «Отображать панель задач поверх остальных окон». Каждая настройка несколько изменяет размер окна системы CytoVision. Это может повлиять на функциональность макросов при различной конфигурации системы. Откройте меню «свойства», кликнув правой кнопкой мыши на панели задач, и установите одинаковые настройки в каждой конфигурации для корректной работы запрограммированных вами макросов.

- ☐ Макросы не могут быть запущены или остановлены в версиях CytoVision новее v.4 при открытых WPF-окнах (этих версиях применены новые стили оформления окон и новые функции, такие как

Create Case, CaseView и др.). Данные разделы CytoVision не поддерживают функциональность макросов, и хотя вы можете записать макрос, при переходе в одно из этих окон в процессе его работы, окно будет закрыто до того, как макрос завершит свою работу.

Контактная информация

Главный офис

Genetix Ltd

Queensway, New Milton
Hampshire BH25 5NN, UK

Tel: +44 (0) 1425 624 600

Fax: +44 (0) 1425 624 700

Web: www.genetix.com

По всем техническим вопросам обращайтесь в ближайший отдел технической поддержки.

Для более подробной информации посетите www.genetix.com

Торговые марки

ClonePix™, CloneSelect™, CellReporter™, HalfBD® and 'NRich® are trademarks of Genetix Ltd., UK

CytoVision®, Ariol®, CytoNet® and CytoTalk® являются зарегистрированными торговыми марками компании Genetix Corp., USA

Все права на сторонние торговые марки принадлежат их владельцам.

Copyright © 2010 by Genetix Ltd

Все права защищены. Распространение данной публикации в любом виде и любыми средствами запрещено без соответствующего письменного Genetix Ltd.

Информация, предоставленная Genetix Ltd может считаться точной и достоверной. Компания не несёт никакой ответственности за её использование, а так же за нарушение прав любой третьей стороны, которые могут возникнуть в процессе использования данной информации. Лицензия на использование предоставляется только при соблюдении всех прав Genetix Ltd.

Intended Use – CytoVision Version 4.5.1 – US

The Genetix CytoVision® system is an automated scanning microscope and image analysis system.

In the US, CytoVision Karyotyper and CEP XY are For In-Vitro Diagnostic Use.

CytoVision Karyotyper is a rapid metaphase finder and computer aided chromosome analysis system which assists the cytogeneticist in viewing the chromosome displays and looking for cellular anomalies. The Karyotyper enables the qualified cytogeneticist to rapidly and accurately analyze the chromosome banding pattern. **All diagnostic decisions are made by the qualified clinician.**

CytoVision CEPXY_ENG is an accessory to the CEP® X Spectrum Oranger™/CEP® Y Spectrum Greent™ DNA Probe kit (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, U.S.A) and is limited to the analysis of CEP XY probes via high magnification capture and analysis of interphase nuclei. CEP

XY is indicated for use to assess the effectiveness of bone marrow transplantation in opposite-sex transplants. **All diagnostic decisions are made by the qualified clinician.**

CytoVision Fluorescence In-Situ Hybridization (FISH), Comparative Genomic Hybridization (CGH), SPOT AX, RxFISH Color Chromosome Analysis, and MFISH

– For Research Use Only*. **Not for Use in Diagnostic Procedures.**

The **Flexible Karyotyper** System is For Research Use Only*. **Not for Use in Diagnostic Procedures**

Intended Use – CytoVision Version 4.5.1 – EU and CANADA

In the EU and Canada, ONLY CytoVision Karyotyper is For In-Vitro Diagnostic Use. All other applications are For Research Use Only*. Not for Use

in Diagnostic Procedures.

CytoVision Fluorescence In-Situ Hybridization (FISH), Comparative Genomic Hybridization (CGH), SPOT AX, RxFISH Color Chromosome Analysis, and MFISH

– For Research Use Only*. **Not for Use in Diagnostic Procedures.**

The **Flexible Karyotyper** System is For Research Use Only*. **Not for Use in Diagnostic Procedures**

Note* : A Research Application is not intended for in vitro diagnostic or clinical use, but is intended solely for use in the research setting, for example university

or pharmaceutical development. These applications are described as Research Applications or Research Use Only.