

文章编号: 1001-3806(2018)06-0769-06

## 数字共焦显微镜实验 3 维点扩散函数的构建

邓文波, 陈 华\*, 聂 雄

(广西大学 计算机与电子信息学院, 南宁 530004)

**摘要:** 为了获取作者所在实验室数字共焦显微镜光学系统实验 3 维点扩散函数, 采用荧光微珠模拟点光源, 利用该显微镜对荧光微珠不同散焦量的切片图像进行采集, 采用多图像平均法对切片图像进行降噪处理, 以此构建显微镜光学系统的实验 3 维点扩散函数。以该实验点扩散函数进行 3 维显微图像复原, 并与理论点扩散函数的复原效果进行了比较。结果表明, 两种点扩散函数对图像复原时均获得良好的复原效果, 但是以正确实验方法获取的实验 3 维点扩散函数, 更符合该光学系统的光学传递特性, 复原效果更准确。所构建的实验 3 维点扩散函数, 为下一步的生物显微图像复原处理提供了一种较好的选择, 为数字共焦显微镜实验 3 维点扩散函数的构建提供了一种有效的方法。

**关键词:** 图像处理; 3 维点扩散函数; 荧光微珠; 数字共焦显微镜

**中图分类号:** TN911.73      **文献标志码:** A      **doi:**10.7510/jgjs.issn.1001-3806.2018.06.008

## Construction of experimental 3-D point spread function of digital confocal microscopy

DENG Wenbo, CHEN Hua, NIE Xiong

(School of Computer and Electric Information, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** In order to obtain experimental 3-D point spread function of a digital confocal microscope optical system, a fluorescence microsphere was used to simulate the point light source, a digital confocal microscope optical system was used to collect the slice images of the fluorescent microsphere with different defoci, and the multi-image averaging method was used to denoise the slice images. Experimental 3-D point spread function of the microscope optical system was constructed. 3-D microscopic image restoration was carried out by experimental point spread function and was compared with that of theoretical point spread function. The results show that both the point spread functions have good restoration effect for image restoration, but experimental 3-D point spread function obtained by correct experimental method is more consistent with optical transmission characteristics of an optical system and has more accurate recovery effect. Experimental 3-D point spread function constructed in the study provides a better choice for the next step of biological microscopic image restoration. It provides an effective method for the construction of 3-D point spread function of digital confocal microscopes.

**Key words:** image processing; 3-D point spread function; fluorescent microsphere; digital confocal microscope

### 引 言

在数字共焦显微技术的研究中, 显微镜光学系统的 3 维点扩散函数(three-dimensional point spread function, 3-D-PSF)的研究对 3 维显微图像复原有着重要的意义。3-D-PSF 的准确估计对 3 维显微图像的复原效

果有很大的关系<sup>[1-4]</sup>。在 3 维显微图像复原方法的研究以及实际工程应用中, 采用的是理论点扩散函数或者实验点扩散函数。理论点扩散函数可以通过光学系统传输函数模型进行构建<sup>[5-7]</sup>, 也可以通过高斯型近似理论模型<sup>[3]</sup>构建。实验点扩散函数是通过实验获取, 主要是使用一个直径尽可能小的荧光小球作为成像物体, 在实验室条件下通过获取荧光小球的成像信息构建显微成像系统的点扩散函数<sup>[8-11]</sup>。也可以以黑白跳变的图像作为观察物, 利用 CCD 像平面上采集图像进行拟合, 获得光学系统的点扩散函数<sup>[12]</sup>。

由于实验获取的 3 维点扩散函数针对特定显微镜光学系统, 因此, 采用以正确方法获取图像复原处理用

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(61164019); 南宁市科学研究与技术开发计划资助项目(20155179)

作者简介: 邓文波(1990-), 男, 硕士研究生, 主要从事数字共焦显微镜图像处理的研究工作。

\* 通讯联系人。E-mail: chenhuacn@163.com

收稿日期: 2017-12-13; 收到修改稿日期: 2018-01-16

的实验点扩散函数,比采用理论点扩散函数进行图像复原具有更为准确的复原效果。

本文中以荧光微珠模拟点光源,通过数字共焦显微镜采集一系列荧光微珠的图像,构造显微镜光学系统的实验 3 维点扩散函数,采用图像平均法降低噪声对点扩散函数的影响,获取图像复原处理用的实验点扩散函数。

## 1 光学显微镜成像系统

### 1.1 3 维点扩散函数理论模型

3-D-PSF 在离散空域里可视为一个 3 维矩阵。是由沿着 3-D-PSF 双锥体中心光轴( $z$  轴)不同的径向横截面( $x$ - $y$  面)组成,每一个横截面对应不同散焦量下的 2 维点扩散函数(two-dimensional point spread function, 2-D-PSF),其中  $z=0$  处中间截面为焦平面 2-D-PSF。

圆形孔径小散焦光学传递函数(optical transfer function, OTF)的数学公式为<sup>[13]</sup>:

$$H(w, q) = \frac{1}{\pi} [2\beta - \sin(2\beta)] \times \frac{J_1(\alpha - 0.5\alpha s)}{(\alpha - 0.5\alpha s)} \quad (1)$$

式中,  $\alpha = 4\pi w s / \lambda$ ,  $\beta = \cos^{-1}(q/f_c)$ ,  $s = 2q/f_c$ ,  $w = \delta_z d_{NA}^2 / 2$ ,  $J_1(x)$  为第 1 类 1 阶贝塞尔函数,  $w$  为最大光程差,  $\lambda$  为发射光波长,  $q$  为频率,  $f_c$  为系统截止频率,  $d_{NA}$  为数值孔径,  $\delta_z$  为样本空间的沿  $z$  轴的散焦距离,即散焦量。当散焦量  $\delta_z$  取不同值时,得到不同的光程差  $w$ ,进而通过(1)式得到不同散焦量的光学传递函数,通过傅里叶逆变换可以得到对应散焦量的一系列 2-D-PSF,进而构成 3-D-PSF。

### 1.2 显微镜成像原理

将厚度为  $T$  的 3 维样本用平面模型表示为:

$$\sum_{i=1}^N f(x, y, i\Delta z) \Delta z \quad (2)$$

式中,  $N = T/\Delta z$ ,  $\Delta z$  为物体平面沿  $z$  轴方向的微小间距。由 3 维显微镜成像系统可知,样本在焦平面  $z'$  处所成像是每个平面与对应 2-D-PSF 卷积之和,即:

$$g(x, y, z') = \sum_{i=1}^N f(x, y, i\Delta z) * h(x, y, z' - i\Delta z) \Delta z \quad (3)$$

式中,  $g$  为显微镜成像,  $f$  为原始 3 维样本,  $h$  为对应显微镜系统 3-D-PSF,  $h(x, y, z' - i\Delta z)$ , ( $i=1, 2, \dots, N$ ) 表示散焦量  $\delta_z$  为  $z' - i\Delta z$  的光学系统的脉冲响应函数,即 2-D-PSF。当  $f$  为点光源且位于该焦平面时,即只有

当  $x=0, y=0, i\Delta z=z'$  时,  $f$  才有不为 0 的值,其余情况下都为 0,由以上公式可知,点光源通过显微镜系统后所得的显微图像即为显微镜焦平面 2-D-PSF。通过改变点光源的位置,即改变(3)式中  $i\Delta z$  的大小,便可以得到一系列不同散焦量的 2-D-PSF,进而可得出显微系统的实验 3-D-PSF。

## 2 3-D-PSF 实验制作

### 2.1 实验点光源制作

点光源实验样品的制备:本实验中采用嵌于聚丙烯酰胺凝胶中的荧光微珠(F8803, Thermo Fisher 公司)作为模拟点光源实验样品,荧光微珠直径为  $0.1\mu\text{m}$ ,激发光波长为  $405\text{nm} \sim 485\text{nm}$ ,发射光波长为  $510\text{nm} \sim 525\text{nm}$ 。将荧光微珠溶液稀释 1000 倍,快速混匀后滴加至载玻片,待凝固后使用。

本实验是利用尼康 Nikon Ti-E 显微镜在物镜放大倍数  $M=40$ 、数值孔径  $d_{NA}=0.55$  的条件下对荧光微珠进行序列图像采集。

在使用实验测量点扩散函数时,作为成像物体的荧光微珠其直径应尽可能小。根据显微镜成像分辨率的判断标准,两个点光源刚好被分辨出来的条件是两个点光源在物平面的距离满足瑞利距离或者阿贝距离。瑞利距离计算公式为<sup>[14-15]</sup>:

$$\delta = 0.61\lambda / d_{NA} \quad (4)$$

取发射波长  $\lambda = 520\text{nm}$ ,则  $\delta = 0.57\mu\text{m}$ ,即只要两个光源的距离大于  $0.57\mu\text{m}$  时,便可通过显微镜进行分辨。本实验中采用的荧光微珠直径为  $0.1\mu\text{m}$ ,小于该瑞利距离,表明该荧光微珠可作为空间的一点。

### 2.2 图像采集

2.2.1 光学切片图像采集 实验中使用尼康 Nikon Ti-E 显微镜,其搭载的高速电动控制系统,可以缩短图像获取的曝光时间,减少光毒对生物细胞的影响。该型号通过手柄或控制器可以控制电动 XY 载物台和  $z$  轴,实现光轴最小步进为  $0.025\mu\text{m}$  的 3 维显微图像的采集。

在显微镜物镜放大倍数  $M=40$ 、数值孔径  $d_{NA}=0.55$  条件下,利用型号为 Nikon DS-Qi1 的非致冷单色 CCD 对荧光微珠图像进行采集,其中光轴步进间隔  $\Delta = 0.2\mu\text{m}$ 。图 1 为在显微镜所采集的荧光微珠图像。其中图 1b 为图 1a 中所框荧光微珠对应的局部放大图(图中灰度值是经过归一化处理,以便显示和观察,并非反映实际强度值,下同)。可以发现,即使稀释了 1000 倍,载玻片上的荧光微珠依然较多。在选取微珠

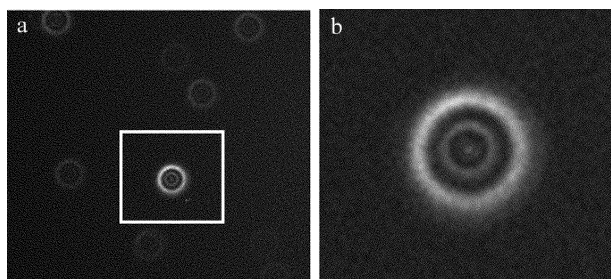


Fig. 1 a—microscope picture of fluorescent microsphere b—partial enlargement

研究对象过程中,一是注意要间距,由于散焦的影响,相邻微珠相互干扰,在选取过程中尽量加大相邻微珠的间距,以减少相互之间的干扰,提高采集图像的真实性;二是要确保所选微珠均有较高能量(亮度),在显微镜系统中,系统噪声不可忽视,随着散焦的不断增大,信号越来越弱,当信号大小低于噪声大小时,主要信息将被噪声所淹没。

图 2 为利用显微镜采集的一组不同散焦量的荧光微珠图像,即不同散焦量的 2-D-PSF (图中数值为对应散焦量  $\delta_z$  的值,下同)。通过一系列不同散焦量的 2-D-PSF 进而可以构造得到实验 3-D-PSF。由图 2 可以明显看出,随着散焦量向两侧的增大,散焦像斑越来越大,图像越来越模糊,同时两侧的散焦像斑存在差异。3 维点扩散函数的 3 维空间坐标系  $z$  轴与显微镜光轴重合,原点为焦平面中心点。图 3 为对应实验 3-D-PSF 能量分布曲线(纵坐标表示图像进行归一化后像素大小,图例数值为对应的散焦量  $\delta_z$ )。其中图 3a 为对应实验 3-D-PSF 沿着  $z$  轴( $x=y=0$ )的能量分布,图 3b 为对应实验 3-D-PSF 沿着径向( $x$  轴)方向的能量分布。从图 3 中曲线可以看出:(1)在光轴方向上,3-D-PSF 在  $z=0$  的焦面处能量最大,证实了 3-D-PSF 的能量主要集中在双锥体中部的锥顶附近区域,离开焦面后能量迅速衰减;(2)在径向方向上,3-D-PSF 越远离焦面其能量扩散范围越大。

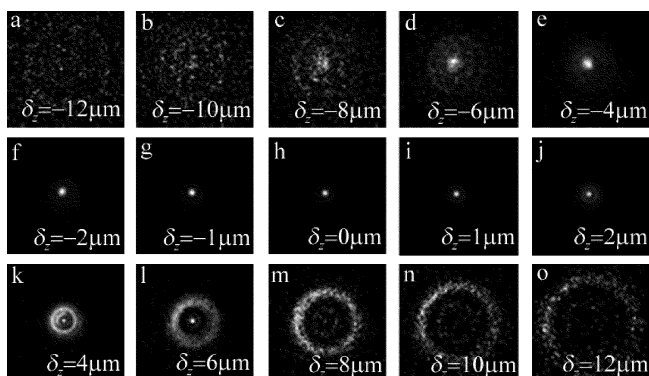


Fig. 2 Experimental 3-D-PSF

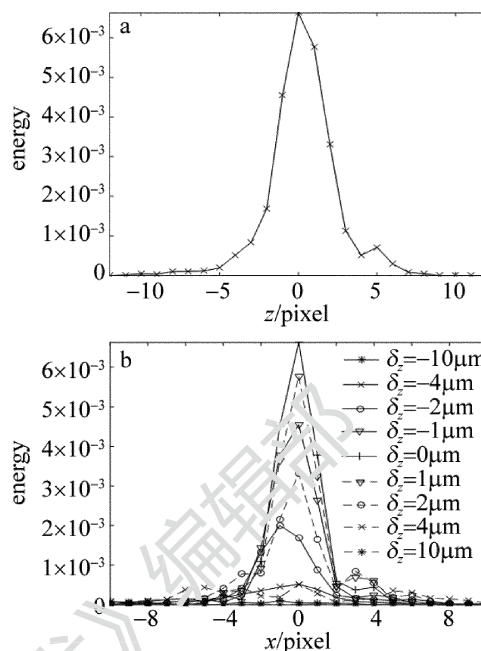


Fig. 3 Energy distribution of experimental 3-D-PSF  
a—along  $z$  axis b—along radial direction

2.2.2 多次采集平均 图像采集采用的是非致冷 CCD 传感器,在采集过程中产生的噪声影响不可忽略。随着散焦量的逐步增大,散焦像的亮度会迅速降低,散焦 2-D-PSF 的分布状况受影响的程度迅速加大,进而影响所构建的 3-D-PSF 的准确性。为此,本实验中采用多图像平均法,对荧光微珠多次图像采集以进行图像平均运算,降低噪声对所构建的 3-D-PSF 的影响。

本实验中对荧光微珠进行 4 次图像采集。图像采集时,在同一实验条件下,以荧光微珠中心区域设置为固定的截面定位点,每次图像采集均以此截面定位点为基准,沿光轴从距离荧光微珠的上部  $12\mu\text{m}$  至下部  $12\mu\text{m}$  以  $0.2\mu\text{m}$  的步进距离进行微珠图像采集,获取微珠不同散焦量序列切片图像。之后对 4 次采集的同一散焦量的 4 幅切片图像进行图像平均运算,平均后的图像作为构建 3-D-PSF 的序列 2D-PSF。

图 4 即为 4 次采集实验中 3-D-PSF 在每个平面中心点的能量分布情况(纵坐标表示图像实际像素值,图例  $T_1 \sim T_4$  分别表示连续进行 4 次采集对应的实验 3-D-PSF)。图 4b 为图 4a 中曲线顶点部分局部放大图,  $y$  轴为对应采集图像像素大小。通过曲线可知,在微珠图像采集过程中,随着光照时间增加,荧光微珠受激产生的能量逐渐降低。为保证实验结果的准确性,在挑选荧光微珠时,尽可能挑选能量较高、其处于焦面时的中心能量尽量与 CCD 最大量化值相接近,同时尽

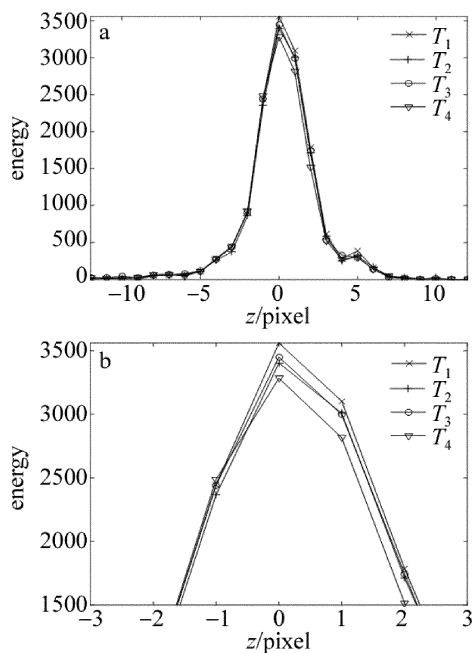


Fig. 4 Energy distribution of PSF made by 4 experiments  
a—energy distribution of center point b—partial enlargement

量缩短单次图像采集曝光时间,以降低荧光微珠能量的衰减程度。

图 5 是利用以上 4 次采集图像通过多图像平均法得出的不同散焦量的微珠序列切片图像,即 2-D-PSF。对比图 2 单次采集的 3-D-PSF 切片图像可以发现,利用多次采样叠加平均法能够在一定程度上降低显微镜系统噪声对点扩散函数的影响。

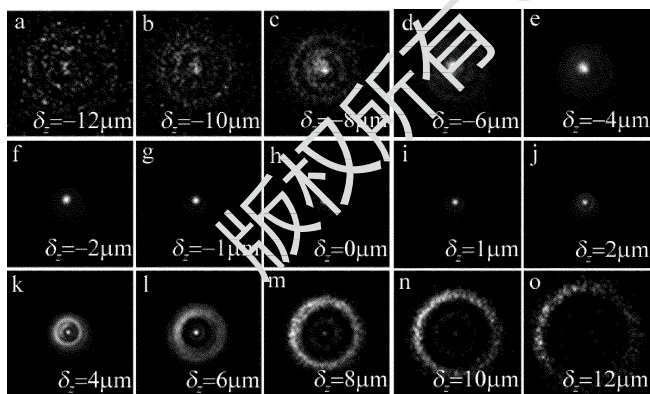


Fig. 5 Experimental 3-D-PSF after several images average

### 3 图像复原

#### 3.1 理论点扩散函数制作

(1)式的光学系统光学传输函数是理论点扩散函数的计算公式,结合显微镜系统相关参量、物镜大小、CCD 大小,以及显微镜成像特性及 CCD 图像的数字化原理,可以通过该式计算获得一组任意散焦量间隔的序列理论 2-D-PSF。图 6 所示为通过理论计算得到的

一系列不同散焦量的 2-D-PSF 图像。图 7 为由该序列理论 2-D-PSF 构建的理论 3-D-PSF 能量分布图(纵坐标表示图像进行归一化后像素大小,图例数值为对应的散焦量  $\delta_z$ )。其中图 7a 为理论 3-D-PSF 能量沿轴向分布,图 7b 为理论 3-D-PSF 能量沿径向的分布。由图 7 与图 3 中曲线比较可看出,实验 3-D-PSF 与理论 3-D-PSF 能量都是主要集中在 3-D-PSF 双椎体结构的椎顶部分,能量分布沿轴向和径向方向基本一致,而在局部区域有所不同。

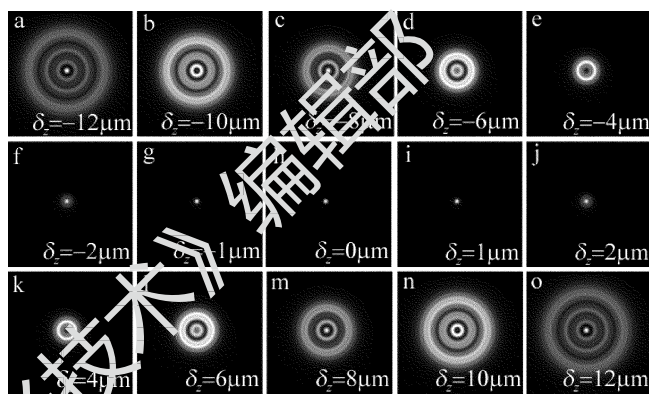


Fig. 6 Theoretical 3-D-PSF

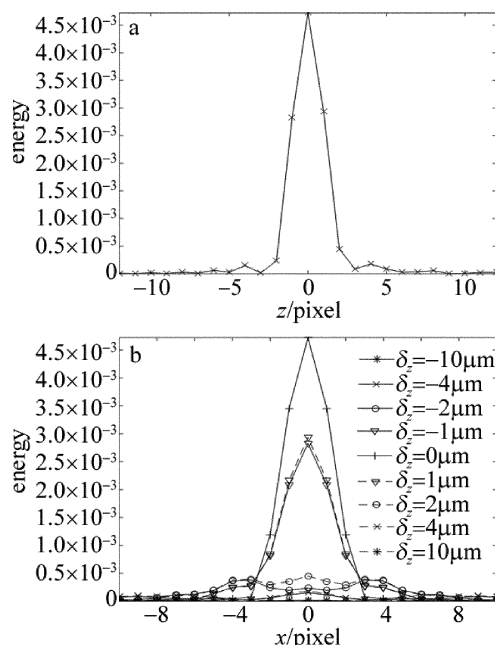


Fig. 7 Energy distribution of theoretical 3-D-PSF  
a—along z axis b—along radial direction

#### 3.2 图像复原分析

实验中荧光微珠和生物荧光组织 3 维切片间距均为  $0.2\mu\text{m}$ ;采用 3-D-PSF 空间大小均为  $101\text{pixel} \times 101\text{pixel} \times 101\text{pixel}$ ,3-D-PSF 在  $z$  轴间距亦为  $0.2\mu\text{m}$ ;图像复原方法采用迭代盲去卷积(iterative blind deconvolution,IBD)算法<sup>[16]</sup>,初始 3-D-PSF 分别为理论 3-

D-PSF 和实验 3-D-PSF, 迭代次数 50 次。

IBD 算法是利用图像和点扩散函数的先验知识, 在迭代过程中交替地利用傅里叶变换 (fast Fourier transform, FFT) 和傅里叶逆变换 (inverse fast Fourier transform, IFFT), 分别对原始图像  $\hat{f}(x, y)$  和点扩散函数  $\hat{h}(x, y)$  进行估计, 同时对其施加目标域的限制。在图像域中,  $\hat{f}(x, y)$  和  $\hat{h}(x, y)$  都具有非负性, 且具有支持域的限制。在频域中, 利用退化图像与第  $k$  次的估计图像和点扩散函数的频域形式交叉估计第  $k+1$  次的点扩散函数和估计图像的频域形式, 表达式如下:

$$\tilde{H}_k(u, v) = \frac{G(u, v) \hat{F}_{k-1}^*(u, v)}{|\hat{F}_{k-1}(u, v)|^2 + \frac{\alpha}{|\tilde{H}_{k-1}(u, v)|^2}} \quad (5)$$

$$\tilde{F}_k(u, v) = \frac{G(u, v) \hat{H}_{k-1}^*(u, v)}{|\hat{H}_{k-1}(u, v)|^2 + \frac{\alpha}{|\tilde{F}_{k-1}(u, v)|^2}} \quad (6)$$

式中,  $G(u, v)$  为模糊图像的傅里叶变换,  $\hat{F}_k$  和  $\hat{H}_k$  分别为  $\hat{f}_k$  和  $\hat{h}_k$  的傅里叶变换,  $\tilde{F}_k, \tilde{H}_k$  表示原图像和点扩散函数的频域约束结果,  $*$  表示复数共轭,  $\alpha$  为加性噪声的能量。

实验 1: 对荧光微珠 3 维切片图像的复原。在相同的条件下, 分别利用实验 3-D-PSF 和理论 3-D-PSF 对荧光微珠 3 维显微镜图像进行去卷积图像复原处理。图 8 为对荧光微珠 3 维显微图像复原的效果。其中图 8a 为采集的荧光微珠成像的原始 3 维重构光轴剖面 ( $y$ - $z$  面) 图, 图 8b、图 8c 分别为利用理论 3-D-PSF 和实验 3-D-PSF 复原的微珠图像 3 维重构光轴剖面图。

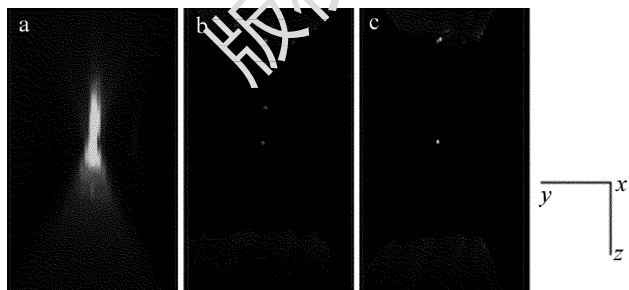


Fig. 8 Image restoration of microsphere

a—microsphere image b—theoretical 3-D-PSF restoration result c—experimental 3-D-PSF restoration result

由图 8 可知, 由于显微镜系统散焦的作用, 荧光微珠通过显微镜成像后在 3 维空间上形成双椎体结构, 能量集中在椎体附近。采用两种点扩散函数对荧光微珠 3 维图像的复原均获得良好的效果, 在 3 维空间复

原为一个微珠 (亮点)。同时复原图像的上下两端均存在一些杂散信息, 主要是由于在去卷积过程中, 边界部分无法确定造成的。但是对比发现, 两者的复原效果不完全相同, 利用实验 3-D-PSF 复原效果要比理论 3-D-PSF 复原效果要好。利用理论 3-D-PSF 复原的图像虽然在空间上也形成了一个亮点, 但是在旁边还存在干扰, 且亮度较小, 而利用实验 3-D-PSF 复原的图像在空间中形成的亮点亮度较大, 与原始亮度较为接近, 且周围干扰较小。

实验 2: 对生物荧光组织 3 维切片显微镜图像的复原。在相同的条件下, 利用显微镜对荧光生物组织进行 3 维切片的采集, 然后利用实验 3-D-PSF 和理论 3-D-PSF 对荧光生物组织 3 维切片图像进行去卷积图像复原处理。

图 9 中显示了 4 组不同切片图像的复原效果。图 9a 为采集的荧光组织原始切片图像, 图 9b 为对应利用理论 3-D-PSF 复原效果, 图 9c 为利用实验 3-D-PSF 复原效果。图 10 是荧光组织的图像复原 3 维重构效果对比图。其中图 10a 为荧光组织原始 3 维重构显示图, 图 10b、图 10c 分别为利用理论 3-D-PSF 和实验

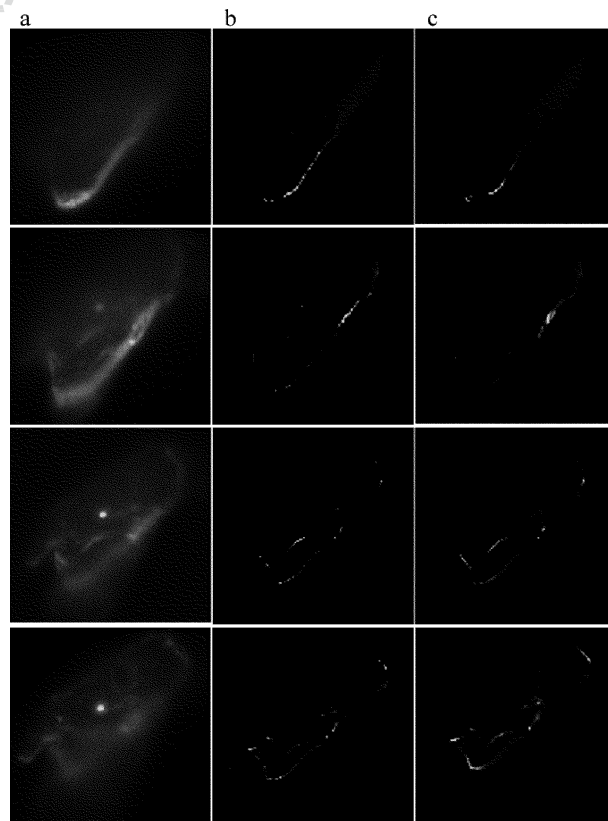


Fig. 9 Image restoration of fluorescent tissue

a—microscope images collected by microscope b—theoretical 3-D-PSF image restoration c—experimental 3-D-PSF image restoration

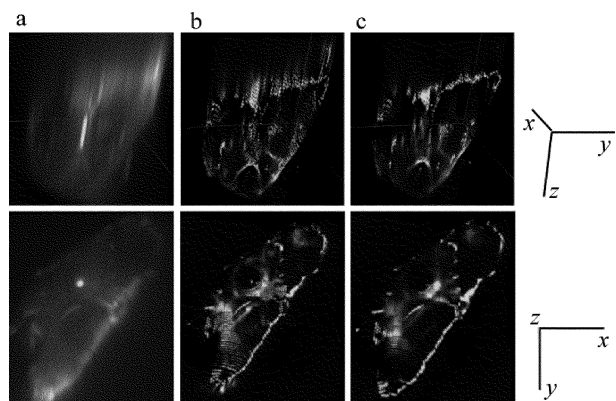


Fig. 10 Image restoration of 3-D fluorescent tissue

a—original fluorescent tissue b—theoretical 3-D-PSF restoration result  
c—experimental 3-D-PSF restoration result

### 3-D-PSF 复原的 3 维重构显示图。

由图 9 和图 10 可知,在原始样本中,由于相邻层散焦层对焦平面层之间的相互干扰,采集的切片图像即包含该焦平面图像信息,又含有相邻散焦面的信息,使得采集图像模糊,3 维重构图像中无法看清内部结构。而通过实验 3-D-PSF 和理论 3-D-PSF 对图像进行复原时,能较好去除相邻散焦面对图像的影响,处理后图像在每层中保留了该焦平面的主要信息,均获得良好的复原效果,并很好地实现了生物组织的 3 维重构。另外,实验 3-D-PSF 和理论 3-D-PSF 两者的复原效果不完全相同,仔细观察,实验 3-D-PSF 的复原效果更好。

## 4 结 论

利用荧光微珠实际测量系统的 3-D-PSF,可以弥补理论 3-D-PSF 无法表征实际光学系统在生产制造过程中存在不可避免的偏差问题和噪声因素的缺陷,使得实验 3-D-PSF 更符合该光学系统的光学传递特性。本文中以荧光微珠模拟点光源,通过数字共焦显微镜对荧光微珠的不同截面和不同散焦量的切片图像进行采集,通过 4 次采集得到相同的序列荧光微珠图像,采用多图像叠加平均法进行处理,降低噪声的影响,构建显微镜光学系统的实验 3-D-PSF。以该实验 3-D-PSF 与理论 3-D-PSF 对荧光微珠切片图像以及荧光生物组织 3 维切片图像进行去卷积复原处理 and 对比分析。实

验结果表明,实验 3-D-PSF 与理论 3-D-PSF 均获得良好的复原效果,而实验 3-D-PSF 具有更好的复原精度。

## 参 考 文 献

- [1] SHU X Y, LI J T. Information optics [M]. Beijing: Science Press, 1999: 63-77 (in Chinese).
- [2] CHEN H, JING W Q, WANG X, *et al.* Investigation about 3-D microscopically image restoration and PSF [J]. Optical Technique, 2006, 32(3): 434-439 (in Chinese).
- [3] LI R, TAO Q Ch, HE X H, *et al.* Nearest-neighbors subtraction algorithm based on Gaussian point spread function estimation [J]. Opto-Electronic Engineering, 2007, 34(6): 1-6 (in Chinese).
- [4] YANG F J. Research of space size selection method of three-dimensional point spread function [D]. Nanning: Guangxi University, 2014: 27-46 (in Chinese).
- [5] HOPKINS H H. The frequency response of a defocused optical system [J]. Proceedings of the Royal Society of London, 1955, A231 (1184): 91-103.
- [6] STOCKSETH P A. Properties of defocused optical system [J]. Journal of the Optical Society of America, 1969, A59(10): 1314-1321.
- [7] AGAR O A. Optical sectioning microscopy: cellular architecture in three dimensions [J]. Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 1984, 13(1): 191-219.
- [8] PRELA C, CONCHELLO J A. Theoretical development and experimental evaluation of imaging models for differential-interference-contrast microscopy [J]. Journal of the Optical Society of America, 1999, A16(9): 1593-1601.
- [9] CASTLEMAN K R. Digital image processing [M]. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 2011: 469-473 (in Chinese).
- [10] CHEN H. Research on digital confocal microscopic image recovery and its system implementation [D]. Beijing: Beijing Institute of Technology, 2005: 20-45 (in Chinese).
- [11] LU W M, YANG X B, WEN G, *et al.* An optimized model of point spread function of microscopy based on fluorescence beads [J]. Laser Technology, 2016, 40(5): 638-642 (in Chinese).
- [12] WANG F P. The measurement of the point spread function in optical system with CCD [J]. Journal of Gannan Teachers College, 2005, 26(6): 17-18 (in Chinese).
- [13] KENNETH R C. Digital image processing [M]. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 2002: 350-380.
- [14] SIBARITA J B. Deconvolution microscopy [J]. ADV Biochem Engin/Biotechnol, 2005, 95: 201-243.
- [15] RAYLEIGH L. On the theory of optical image, with special reference to the microscope [J]. Journal of the Royal Microscopical Society, 2011, 42(255): 167-195.
- [16] AYERS G R, DAINTY J C. Iterative blind deconvolution method and its applications [J]. Optics Letters, 1988, 13(7): 547-549.