

# Использование лазерных спеклов при идентификации патологически измененных биотканей

А.С.Ульянов

*Предложены два новых способа анализа спекл-структур, формирующихся при рассеянии лазерного излучения на гистологических срезах тканей доброкачественных и злокачественных опухолей. Один из способов анализа основан на вычислении инвариантных моментов Цернике по пространственному распределению интенсивности спекл-поля, второй – на вычислении его фрактальной размерности. Показано, что оба способа дают схожие результаты, которые существенно зависят от свойств изучаемых тканей. Исследована возможность использования моментов Цернике и фрактальной размерности спеклов, формирующихся при рассеянии лазерного излучения на гистологических срезах, при проведении *in vitro* экспресс-диагностики патологически измененных тканей.*

**Ключевые слова:** спекл-структура, корреляционная функция, моменты Цернике, фрактальная размерность, раковые опухоли.

## 1. Введение

Спекл-поля применяются для анализа характеристик рассеивающих объектов и характера их движения уже давно [1]. В ряде случаев статистические характеристики спекл-полей могут нести информацию о средних размерах рассеивателей, степени шероховатости поверхности и т. д. [1]. Динамика спеклов может быть использована для определения перемещения движущегося рассеивающего объекта, его деформации, скорости рассеивающих потоков. В биомедицинской оптике спекл-поля широко используются в оптической диагностике биотканей [2], в измерениях скорости кровотока [3] и исследовании топологии микрососудов головного мозга [4, 5]. Однако следует отметить, что статистические характеристики спекл-полей весьма слабо связаны с характеристиками рассеивающих объектов [6–8]. Развитые спекл-поля обычно подчиняются гауссовой статистике [6], их размеры обусловлены конфигурацией рассеяния (длиной волны используемого излучения, размером освещенной области, а также расстоянием между рассеивающим объектом и плоскостью наблюдения), а контраст спеклов равен 1.

Тем не менее в некоторых случаях это не так. Например, если флуктуация фазы, вносимая рассеивающим объектом, подчиняется  $K$ -распределению, то статистика спекл-поля также будет подчиняться  $K$ -распределению [9, 10]. Как показано в работах [11–14], если объект обладает фрактальными свойствами, то спекл-структуры, образованные при рассеянии света на этих объектах, тоже могут обладать фрактальными свойствами. Существует ряд работ, посвященных исследованию специфического

класса так называемых фрактальных спеклов (см. [15] и библиографию к ней).

В биологии, медицине и биофизике анализ фрактальной размерности нашел применение сравнительно недавно. Так, фрактальные размерности применялись для того, чтобы отличить отдельные здоровые клетки от пораженных раком с использованием методов электронной микроскопии [16]. Фрактальные свойства топологии сосудов пияльных оболочек головного мозга описаны в обзоре [17].

Инвариантные моменты Цернике используются для описания структурных характеристик изображений достаточно давно [18, 19]. Однако примеры применения моментов Цернике в биологии крайне редки. По сути только в работе [20] вычисленные по индикатрисе рассеяния моменты Цернике применялись для идентификации степени патогенности бактерий, образующих колонии.

Целью настоящей работы является исследование принципиальной возможности применения специфических методов цифровой обработки спекл-структур (вычисления фрактальной размерности и моментов Цернике) для экспресс-диагностики патологически измененных тканей и идентификации биотканей, имеющих различные новообразования. Показано, что ткани с доброкачественными и злокачественными опухолями формируют спекл-поля с различающимися фрактальными размерностями.

## 2. Методы и материалы

В эксперименте использовался He–Ne-лазер ГН-5П с мощностью 1 мВт и длиной волны 633 нм. Гауссов лазерный пучок  $I$  диаметром  $\sim 1$  мм с помощью двухлинзовой системы преобразовывался в коллимированный пучок диаметром 1 см. Первая линза с фокусным расстоянием 1.14 мм и числовой апертурой 0.44 (С200ТМ-В, Thorlab, США) фокусировала пучок в пятно диаметром  $\sim 2$  мкм (размер пятна оценивался по формуле для диаметра диска Эйри [7]). Передняя фокальная плоскость

А.С.Ульянов. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83  
e-mail: UlyanovAS@mail.ru

второй линзы с фокусным расстоянием 10 мм и числовой апертурой 0.55 (AL1210-A, S-LAN64 Aspheric Lens, Thorlab) была совмещена с задней фокальной плоскостью первой линзы. В плоскости фокусировки пучка был установлен пространственный фильтр – диафрагма с отверстием диаметром 5 мкм (P5S, Thorlab). Обе линзы и пространственный фильтр были смонтированы в стандартной оптической втулке (SM05L10, 0.5" Lens Tube, Thorlab). Коллимированный лазерный пучок направлялся на исследуемый образец с помощью зеркала (ME05-M01, Gold, Thorlab).

Регистрация спекл-структур проводилась с использованием монохромной цифровой CMOS-камеры Phoenix USB Digital camera 1298-M (MuTech, США) с разрешением 1280 × 1024 пикселей. Размер пикселей камеры составлял 5.2 мкм. С целью повышения точности измерений из CMOS-камеры был удален фильтр ИК излучения, который при определенных условиях освещения может вызывать появление наклонных интерференционных полос в плоскости регистрации.

Изучаемые образцы представляли собой гистологические срезы толщиной  $200 \pm 5$  мкм, сделанные на замораживающем микротоме по стандартной методике и зафиксированные между предметным и покровным стеклами. Во всех случаях поперечный размер образцов несколько превышал диаметр освещающего пучка ( $d = 1$  см).

Расстояние между освещенным образцом и плоскостью регистрации спекл-структуры  $z$  (поверхностью регистрирующего элемента CMOS-камеры) составляло 14 см. Ожидаемый средний поперечный размер спеклов в плоскости регистрации может быть оценен по формуле [21, 22]

$$a \approx \frac{3\lambda z}{d}. \quad (1)$$

Таким образом, для рассматриваемого случая ( $\lambda = 0.63$  мкм,  $z = 14$  см,  $d = 1$  см) ожидаемый размер спекла составлял приблизительно 25 мкм, что в 5 раз превышает размер пикселей CMOS-камеры.

Характерные картины спекл-структур, формирующихся при рассеянии лазерного излучения на изучаемых образцах, представлены на рис.1 и 2. В регистрируемых изображениях, как правило, присутствует незначительный двумерный тренд [23] (рис.3), который может быть выделен с помощью свертки гауссовой функции с двумерным изображением зарегистрированной спекл-структуры (ширина окна выбиралась равной 50 пикселям). При цифровой обработке спекл-структур интенсивность зарегистрированных спекл-структур нормировалась в каждой точке плоскости регистрации на амплитуду тренда. Иными словами, полученный тренд использовался для компенсации крупномасштабных флуктуаций интенсивности спекл-структур.

Характерный пример нормированной одномерной автокорреляционной функции (коэффициент автокорреляции) пространственных флуктуаций интенсивности представлен на рис.4. При анализе корреляции выбиралась центральная горизонтальная линия в зарегистрированной спекл-структуре. Видно, что экспериментально измеренная длина корреляции (20 мкм) находится в хорошем соответствии с ее оценкой (25 мкм), сделанной с использованием формулы (1).

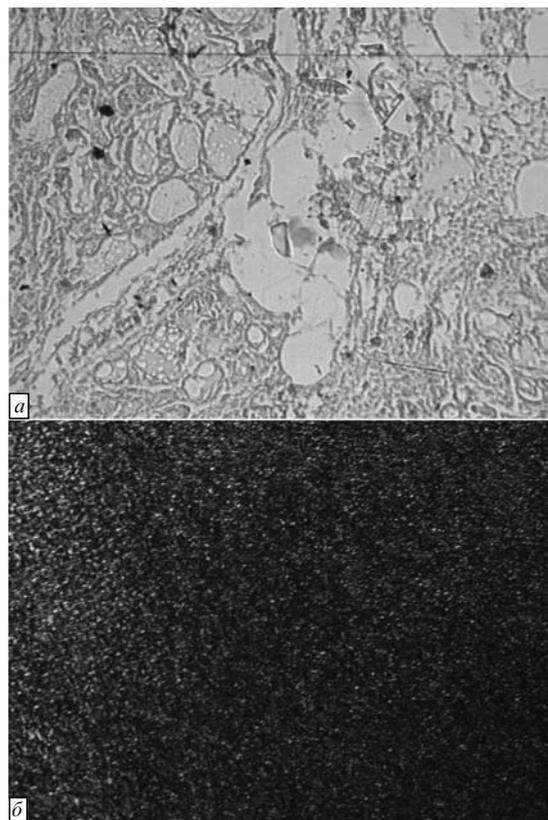


Рис.1. Гистологический срез доброкачественной опухоли (а) и соответствующая ей спекл-структура (б).

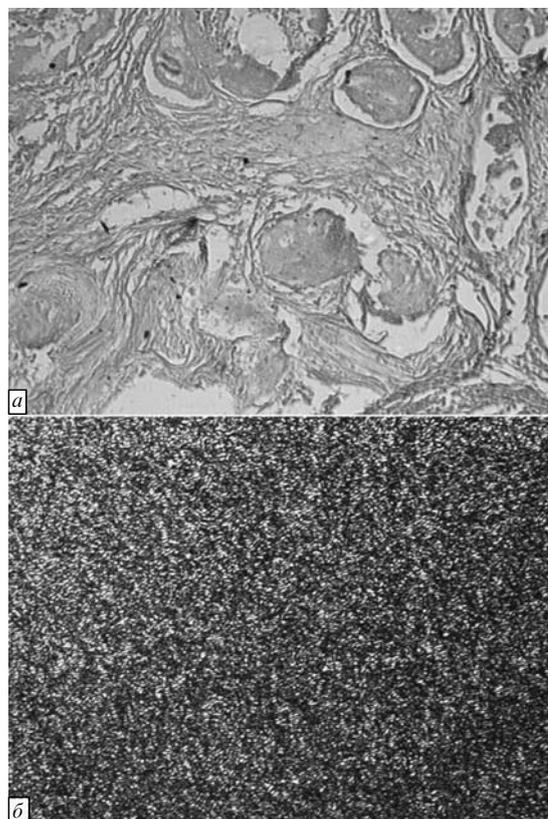


Рис.2. Гистологический срез злокачественной опухоли (а) и соответствующая ей спекл-структура (б).

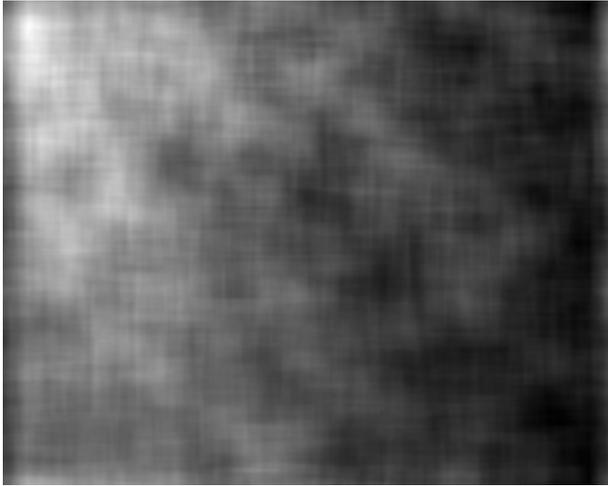


Рис.3. Двумерный тренд, выделенный из спекл-структуры.

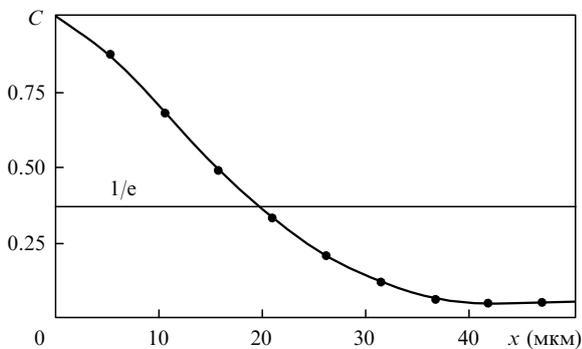


Рис.4. Автокорреляционная функция пространственных флуктуаций интенсивности.

Как показывают экспериментальные исследования, спекл-поле, формирующееся при рассеянии света в гистологических срезах, в среднем полностью деполаризовано по поперечному сечению рассеянного излучения, а контраст спеклов равен 0.67 [6].

Функция распределения плотности вероятности интенсивности многократно рассеянного света (при  $I \geq 0$ ) описывается функцией [8]

$$p(I) = \left(\frac{2}{\langle I \rangle}\right)^2 I \exp\left(-\frac{2I}{\langle I \rangle}\right), \quad (2)$$

где  $\langle I \rangle$  – среднее значение интенсивности. Контраст спеклов для упомянутого распределения равен 0.7.

Экспериментально полученная гистограмма пространственных флуктуаций интенсивности представлена на рис.5 (объем выборки составлял  $1.3 \times 10^6$ , число интервалов гистограммы определялось по формуле Стержесса [24]). Проверка гипотезы о типе распределения в данной работе не проводилась, но из рис.5 отчетливо видно, что статистика спеклов подчиняется распределению (2) для теплового деполаризованного излучения.

Таким образом, форма функции распределения плотности вероятности пространственных флуктуаций интенсивности, а также близкое к 0.7 значение контраста спеклов и изменение поляризационной структуры излучения, прошедшего через образец, свидетельствуют о реализации в гистологических срезах режима многократного рассеяния света.

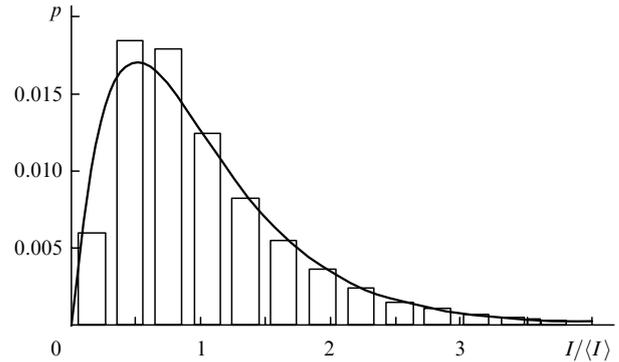


Рис.5. Гистограмма пространственных флуктуаций интенсивности.

### 3. Методы анализа спекл-структур, основанные на вычислении моментов Цернике и фрактальной размерности

#### 3.1. Моменты Цернике

Рассмотрим двумерное непрерывное случайное распределение интенсивности  $I(x, y)$  спекл-поля. Формула, определяющая моменты Цернике для функции  $I(x, y)$  (см., напр., [19, 20]), имеет следующий вид:

$$A_{n,m} = \iint I(x, y) V_{n,m}(x, y) dx dy. \quad (3)$$

Здесь  $V_{n,m}$  – полином, зависящий от  $x$  и  $y$  в степенях  $n$  и  $m$  и определяемый как

$$V_{n,m}(x, y) = R_{n,m}(\rho) e^{-im\theta}, \quad (4)$$

где  $\rho = \sqrt{x^2 + y^2}/\rho_0$ ;  $\theta = \arctan(y/x)$ ;  $n$  – неотрицательное целое число;  $|m|$  – меньшее или равное  $n$  число, удовлетворяющее условию четности разности  $(n - |m|)$ ;  $\rho_0$  – радиус окружности, вписанной в прямоугольную область, по которой регистрируется спекл-структура;

$$R_{n,m}(\rho) = \sum_{s=0}^{(n-|m|)/2} (-1)^s \times \frac{(n-s)! \rho^{n-2s}}{s! [(n+|m|-2s)/2]! [(n-|m|-2s)/2]!} \quad (5)$$

– радиальный полином.

Принимая во внимание свойство симметрии

$$R_{n,m}(\rho) = R_{n,-m}(\rho), \quad (6)$$

из выражений (3)–(5) для непрерывной функции, описывающей интенсивность в двумерной спекл-структуре, можно получить окончательное соотношение для моментов Цернике:

$$A_{n,m} = \frac{n+1}{\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^1 I(\rho, \theta) R_{n,m}(\rho) e^{-im\theta} \rho d\rho d\theta. \quad (7)$$

Интересно отметить, что полученные моменты инвариантны к повороту. Это означает, что при повороте изображения на некий угол  $\alpha$

$$I'(\rho, \theta) = I(\rho, \theta - \alpha). \quad (8)$$

Тогда выражение для моментов Цернике примет вид

$$A'_{n,m} = \frac{n+1}{\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^1 I(\rho, \theta - \alpha) R_{n,m}(\rho) e^{-im\theta} \rho d\rho d\theta. \quad (9)$$

При введении новой переменной  $\theta_1 = \theta - \alpha$  выражение (9) приводится к следующему виду:

$$A'_{n,m} = \left[ \frac{n+1}{\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^1 I(\rho, \theta_1) R_{n,m}(\rho) \times e^{-im\theta_1} \rho d\rho d\theta_1 \right] e^{-im\alpha} = A_{n,m} e^{-im\alpha}. \quad (10)$$

Таким образом, видно, что при повороте изображения происходит изменение аргумента моментов, но их модуль остается постоянной величиной.

Заметим, что в эксперименте пространственное распределение интенсивности рассеянного излучения (спекл-структура) регистрируется, как правило, CCD- или CMOS-камерой, что позволяет проводить дальнейшую цифровую обработку распределения. Поэтому выражение для моментов Цернике целесообразно записать в виде, пригодном для обработки оцифрованных (дискретных) спекл-структур:

$$A_{n,m} = \frac{n+1}{\pi} \sum_{\rho_d} \sum_{\theta_d} I(\rho_d, \theta_d) R_{n,m}(\rho_d) e^{-im\theta_d}. \quad (11)$$

Моменты Цернике для дискретного изображения также инвариантны относительно поворота изображения [20].

Следует упомянуть, что для оценки свойств изображений часто используются [25, 26] моменты Чебышева или полиномы Лежандра, которые не обладают инвариантностью к повороту. Подчеркнем, что с практической точки зрения свойство инвариантности чрезвычайно важно, поскольку спекл-структура определяется структурой рассеивающего образца и его положением в пространстве, а на практике невозможно приготовить гистологические образцы, одинаковым образом сориентированные в пространстве. Даже совершенно идентичные образцы, приготовленные из одной и той же биоткани одного пациента, будут повернуты произвольным образом относительно друг друга. Ориентации двух сравниваемых рассеивающих образцов, полученных от разных пациентов, будут совершенно случайны, даже если образцы полностью идентичны в статистическом смысле. Таким образом, если статистические показатели спекл-полей, сформированных при рассеянии на исследуемом образце, зависят от его положения случайным образом, то такие показатели также будут иметь случайный характер. Иными словами, статистические характеристики спекл-структур, неинвариантные к повороту (моменты Чебышева или полиномы Лежандра), являются совершенно неинформативными и не могут быть использованы в диагностике биотканей.

### 3.2. Фрактальная размерность

В последние годы помимо традиционных статистических характеристик, таких как функция распределения плотности вероятности флуктуаций интенсивности, корреляционная функция и корреляционные моменты высших порядков [27], для описания свойств спекл-структур начали использовать фрактальные размерности [15].

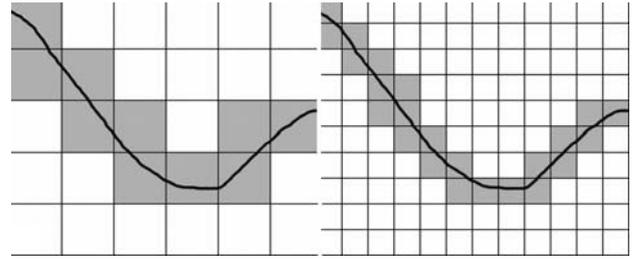


Рис.6. Процедура вычисления фрактальной размерности при двух размерах ячейки (серым цветом закрашены ячейки, покрывающие кривую).

Процедура расчета фрактальной размерности заключается в том, что на первом этапе в исследуемом двумерном изображении выделяется уровень постоянной интенсивности, равной среднему значению интенсивности  $\langle I \rangle$  в спекл-структуре. Затем исходное изображение преобразуется в новое бинарное (черно-белое) изображение в соответствии со следующим правилом. В той точке исходного изображения, где интенсивность превышает уровень  $\langle I \rangle$ , ей приписывается максимальное значение, а в точке, где это условие не выполняется, она принимается равной нулю.

На следующем этапе обработки спекл-структуры области максимальной интенсивности в полученном черно-белом изображении покрываются сеткой с размером ячейки  $\varepsilon$  и подсчитывается число ячеек сетки  $N(\varepsilon)$ , покрывающих изучаемый объект. С уменьшением размера  $\varepsilon$  растет величина  $N(\varepsilon)$  (рис.6). В итоге фрактальная размерность объекта [28] определяется формулой

$$D = - \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\lg N(\varepsilon)}{\lg \varepsilon}. \quad (12)$$

Поскольку интервал самоподобия биологической структуры ограничен, размер ячейки покрытия может варьироваться лишь в определенном диапазоне, максимальное значение которого определяется размерами объекта, а минимальное – элементарным структурным элементом (в случае оцифрованного изображения – это размер пикселя). Таким образом, для оценки фрактальной размерности в данном случае применять формулу (12) нельзя, а следует использовать метод интерполяции, который заключается в выявлении зависимости числа ячеек покрытия структуры от размера ячейки (в двойном логарифмическом масштабе) и выделении линейного участка на этой зависимости [28]. Угол наклона линейного участка кривой позволяет оценить значение фрактальной размерности.

## 4. Обсуждение результатов

На рис.1,а и 2,а представлены гистологические срезы доброкачественной и злокачественной опухолей. Изображения получены с помощью трансмиссионного светового микроскопа. Использовался микрообъектив с увеличением  $40\times$ , в плоскости изображения которого была установлена CMOS-камера. Поскольку размеры регистрирующего элемента используемой CMOS-камеры равны  $5 \times 7$  мм, то линейные размеры наблюдаемых структур тканей составили  $125 \times 175$  мкм. Спекл-структуры, формирующиеся при освещении этих гистологиче-

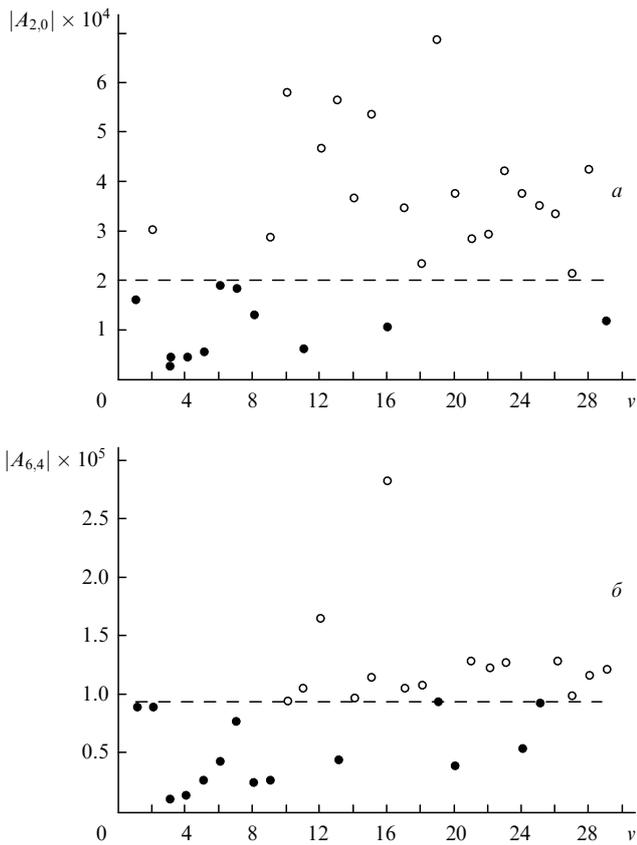
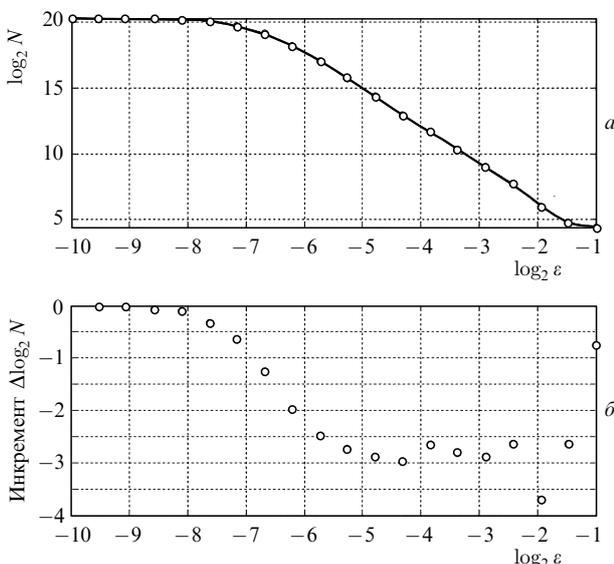


Рис.7. Максимальные абсолютные значения моментов Цернике  $|A_{n,m}|$  при  $n = 2, m = 0$  (а) и  $n = 6, m = 4$  (б) ( $v$  – номер исследуемого образца). Приведены точки, соответствующие злокачественным (○) и доброкачественным (●) образованиям.

ских срезов, показаны на рис.1,б и 2,б. Визуальные различия между этими рисунками отсутствуют. Они не выявляются и при проведении корреляционного анализа сравниваемых спекл-структур. Контраст спеклов, их средний размер, форма гистограмм флуктуаций интенсивности и корреляционных функций совершенно идентичны – все различия находятся в пределах статистической ошибки выборки.



Различия в представленных спекл-структурах начинают проявляться при вычислении соответствующих им инвариантных моментов Цернике. И хотя трудно ожидать существенных различий в структурах образцов, полученных из доброкачественных и злокачественных опухолей, значения сравниваемых моментов могут отличаться друг от друга на полтора порядка. В настоящее время сложно предложить обоснованное физическое объяснение наблюдаемым эффектам, но, как достоверно показывают результаты экспериментальных исследований, амплитуды моментов (модуль комплексной величины  $A_{n,m}$ ), вычисленных для спекл-структур злокачественных опухолей, значительно выше, чем у доброкачественных опухолей.

На рис.7 представлены данные, соответствующие выборке малого объема. Были проанализированы спекл-структуры, полученные при освещении 29 гистологических срезов, соответствующих доброкачественным (14 образцов) и злокачественным (15 образцов) опухолям. Тип опухоли был предварительно определен гистологическими методами.

Как показывают результаты эмпирического анализа, существует некоторый уровень амплитуды моментов второго порядка, выше которого расположены точки, соответствующие злокачественным образованиям, а ниже – доброкачественным. Такая же закономерность наблюдается при сопоставлении моментов Цернике более высоких порядков (рис.7,б).

На рис.8 приведены зависимости, определяющие фрактальные размерности ( $\log_2 N(\epsilon)$ ) и приращения ( $\Delta \log_2 N(\epsilon)$ ). Линейный участок на рис.8,а и в соответствует размерам покрывающих ячеек, при которых наблюдается фрактальная структура. Отметим, что более информативной является зависимость приращения  $\Delta \log_2 N(\epsilon)$ , по которой можно более точно определить область, соответствующую фрактальной структуре (в этой области, с учетом погрешности, приращение будет одинаковым).

Как показывают результаты экспериментальных исследований, наблюдаются два режима поведения фрактальной размерности – плавное и скачкообразное увеличение приращения. Плавное увеличение соответствует тканям со злокачественными образованиями, а скачко-

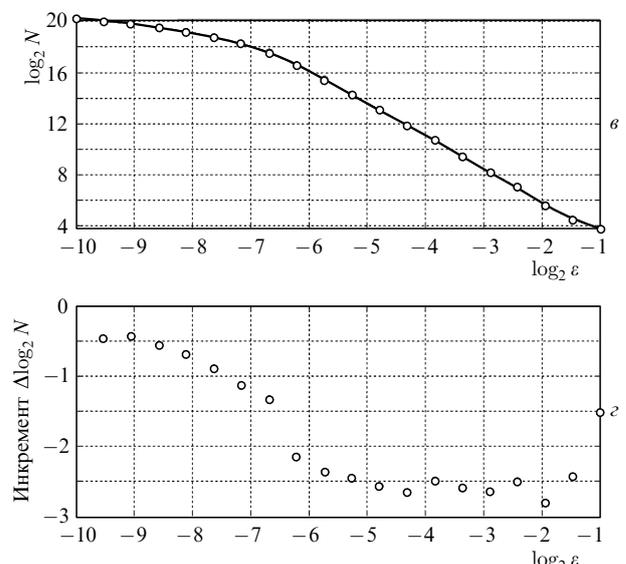


Рис.8. Зависимости, определяющие фрактальную размерность, соответствующую злокачественной (а, б) и доброкачественной (в, г) опухолям.

образный переход является признаком доброкачественных образований.

## 5. Заключение

Установлено, что результаты, полученные при анализе фрактальных размерностей спекл-структур, находятся в хорошем соответствии с результатами применения метода инвариантных моментов Цернике. Как моменты Цернике, так и фрактальные размерности зависят от характера патологических изменений в биотканях в результате развития опухолей.

Следует отметить, что полученные результаты во многом являются предварительными. Достоверность предложенных методов и их надежность с точки зрения диагностики могут быть определены только на основе сопоставления результатов, полученных с использованием как здоровых, так и патологически измененных тканей. В работе же сравнивались спекл-структуры, полученные при освещении только измененных тканей (доброкачественных и злокачественных опухолей). Очевидно, что характер изменений при развитии этих двух типов опухолей может быть весьма схожим. К сожалению, сравнение спекл-структур, формирующихся при рассеянии света в патологически измененных биотканях и образующихся при облучении здоровых тканей, в принципе не представляется возможным. Все гистологические образцы могут быть получены только из послеоперационного материала (что и было сделано в данной работе) либо из трупного материала (общеизвестно, что в этом случае все оптические характеристики значительно изменены по сравнению с нормой).

Тем не менее в данной работе показана принципиальная возможность использования упомянутых методов цифровой обработки спекл-структур в экспресс-диагностике тканей, что представляет собой альтернативу использованию традиционных гистологических методик. Поскольку стандартные методы гистологических исследований являются весьма трудоемкими и требуют привлечения высококвалифицированного медицинского персонала, то представленные в работе результаты могут иметь важное прикладное значение.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 07-02-01434), РФФИ-ГФЕН-а-06-04-39016 и РПН.2.1.1.4473. Автор благодарит Г.С.Терентюка за пре-

доставленные для исследований образцы гистологических срезов биотканей, А.А.Короновского и Ю.П.Волкова за консультации по методам определения фрактальных размерностей и И.Л.Максимову за интерес, проявленный к работе, и обсуждение результатов.

1. Франсон М. *Оптика спеклов* (М.: Мир, 1980).
2. Тучин В.В. *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях* (Саратов: Изд-во Сарат. гос. ун-та, 1998).
3. Galanzha E.I., Brill G.E., Aizu Y., Ulyanov S.S., Tuchin V.V., in *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics* (Bellingham: SPIE Press Monograph, 2002).
4. Dunn A.K., Bolay H., Moskowitz M.A., Boas D.A. *J. Cerebral Blood Flow Metabolism*, **21**, 195 (2001).
5. Briers J.D., Webster S. *J. Biomed. Opt.*, **1** (2), 174 (1996).
6. Dainty J.C. *Top. Appl. Phys.*, **9** (1975).
7. Гудмен Дж. *Введение в фурье-оптику* (М.: Мир, 1970).
8. Гудмен Дж. *Статистическая оптика* (М.: Мир, 1988).
9. O'Donnell K.A. *J. Opt. Soc. Am.*, **72**, 1459 (1982).
10. Newman D. *J. Opt. Soc. Am.*, **2**, 22 (1985).
11. Ishii K., Asakura T. *J. Biomed. Opt.*, **4** (2), 230 (1999).
12. Dogariu A., Uozumi J., Asakura T. *Waves in Random Media*, **4**, 1 (1994).
13. Dogariu A., Uozumi J., Asakura T. *Waves in Random Media*, **2**, 259 (1992).
14. Wada N., Uozumi J., Asakura T. *Pure Appl. Opt.*, **4**, 857 (1995).
15. Funamizu H., Uozumi J. *Opt. Express*, **15** (12), 7415 (2007).
16. Bauer W., Mackenzie C.D. <http://arxiv.org/pdf/patt-sol/9506003.pdf>
17. Eke A., Herman P., Kocsis L., Kozak L.R. *Physiol. Meas.*, **23**, R1 (2002).
18. Liao S.X., Pawlak M. *IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, **20** (12), 1358 (1998).
19. Khotanzad A., Hong Y.H. *IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, **12** (5), 489 (1990).
20. Bayraktar B., Banada P.P., Hirlleman D.E., Bhunia A.K., Robinson J.P., Rajwa B. *J. Biomed. Opt.*, **11** (5) 034006-1 (2006).
21. Рябухо В.П. *Соросовский образовательный журнал*, **7** (5), 102 (2001).
22. Вест Ч. *Голографическая интерферометрия* (М.: Мир, 1982).
23. Бендат Дж., Пирсол А. *Прикладной анализ случайных данных* (М.: Мир, 1989).
24. Stevens L. *Applied Multivariate Statistics for the Social Sciences*, (Hillsdale, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates Publishers, 1986).
25. Yap P.T., Raveendran P. *IEE Proc. - Vis. Image Signal Process*, **151** (2), 128 (2004).
26. Mukundan R., Ramakrishnan K.R. *Pattern Recognition*, **28** (9), 1433 (1995).
27. Zimnyakov D.A. *Opt. Eng.*, **36** (5), 1443 (1997).
28. Иванов А.В., Короновский А.А., Минюхин И.М., Яшков И.А. *Нелинейная динамика в действии*, **14** (2), 64 (2006).