

# Диагностика изменений оптической анизотропии биологических тканей с использованием матрицы Мюллера

Ю.А.Ушенко, Ю.Я.Томка, А.В.Дуболазов, О.Ю.Теленьга

*Исследована эффективность мюллеровской матричной диагностики изменения двулучепреломления слоев биологических тканей различной оптической толщины путем измерения набора статистических моментов 3-го и 4-го порядков, которые характеризуют координатные распределения матричного элемента  $Z_{44}$  в различных точках исследуемого гистологического среза.*

**Ключевые слова:** поляризация, двулучепреломление, биологическая ткань, статистика, матрица Мюллера.

## 1. Введение

За последние 10 лет многочисленные методы оптической диагностики структуры органических фазово-неоднородных объектов пополнились новым методом – лазерной поляриметрией [1–22]. Лазерная поляриметрическая диагностика позволяет получать информацию об оптической анизотропии [2–5, 18, 19, 23] биологических тканей (БТ) в виде координатных распределений элементов матрицы Мюллера – мюллеровских матричных изображений (ММИ) БТ. Для анализа такой поляриметрической информации разработан следующий модельный подход [1, 2, 7, 8, 21, 24], в котором используются следующие предположения:

- все многообразие БТ человека делится на четыре основных типа – соединительная, мышечная, эпителиальная и нервная ткани;
- морфологически БТ любого типа имеет двухкомпонентную аморфно-кристаллическую структуру;
- кристаллическая компонента, или внеклеточная матрица, сформирована сетью протеиновых (коллаген, миозин, эластин и др.) фибрилл;
- протеиновые фибриллы обладают свойствами одноосных двулучепреломляющих кристаллов, поляризационные свойства которых описываются матрицей Мюллера [1, 7, 8, 26]

$$\{Z\} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & z_{22} & z_{23} & z_{24} \\ 0 & z_{32} & z_{33} & z_{34} \\ 0 & z_{42} & z_{43} & z_{44} \end{pmatrix}, \quad (1)$$

где

$$z_{ik} = \begin{cases} z_{22} = \cos^2 2\rho + \sin^2 2\rho \cos \delta, \\ z_{23,32} = \cos 2\rho \sin 2\rho (1 - \cos \delta), \\ z_{33} = \sin^2 2\rho + \cos^2 2\rho \cos \delta, \\ z_{34,43} = \pm \cos 2\rho \sin \delta, \\ z_{24,42} = \pm \sin 2\rho \sin \delta, \\ z_{44} = \cos \delta; \end{cases} \quad (2)$$

$\rho$  – направление оптической оси, определяемое направлением укладки протеиновой фибриллы с размером геометрического сечения  $d$  и показателем двулучепреломления  $\Delta n$ ;  $\delta = (2\pi/\lambda)\Delta n d$  – фазовый сдвиг, возникающий между ортогональными составляющими поля лазерной волны длиной  $\lambda$ .

Данная модель была использована для нахождения и обоснования взаимосвязей между набором статистических моментов 1-го–4-го порядков, которые характеризуют ориентационно-фазовое строение (распределения направлений оптических осей и фазовых сдвигов) внеклеточной матрицы оптически тонких (коэффициент ослабления  $\tau \leq 0.1$ ) слоев БТ, и статистическими моментами, описывающими координатные распределения элементов матрицы Мюллера [1, 21, 27]. Установлено [12], что наиболее чувствительными к изменению оптической анизотропии сетей протеиновых кристаллов являются статистические моменты 3-го и 4-го порядков распределений матричных элементов  $z_{24}$ ,  $z_{34}$ ,  $z_{44}$  внеклеточной матрицы БТ. На этой основе определены оптические критерии ранней диагностики мышечной дистрофии, предраковых состояний соединительной ткани, коллагенозов и др. [12, 19, 22, 26, 28]. Однако такие методы не учитывают координатную неоднородность структуры сетей протеиновых кристаллов и кратность светорассеяния в толще БТ. Поэтому актуальным является исследование не только величин, но и распределений статистических моментов 1-го–4-го порядков, характеризующих двумерные элементы матрицы Мюллера в пределах всего слоя БТ.

Настоящая работа посвящена исследованию возможностей лазерной диагностики оптической анизотропии БТ различной оптической толщины и физиологического состояния на основе статистического подхода к анализу координатных распределений двумерных элементов матрицы Мюллера.

Ю.А.Ушенко, Ю.Я.Томка, А.В.Дуболазов, О.Ю.Теленьга. Черновицкий национальный университет им. Юрия Федьковича, Украина, 58012 Черновцы, ул. Кошобинского, 2; e-mail: yuriyu@gmail.com

Поступила в редакцию 9 сентября 2009 г., после доработки – 19 ноября 2010 г.

## 2. Схема и методика измерения координатных распределений элементов матрицы Мюллера биологических тканей

На рис.1 представлена традиционная оптическая схема поляриметра для измерения координатных распределений элементов матрицы Мюллера БТ [1, 7, 8, 21].

Освещение гистологических срезов БТ осуществлялось параллельным пучком излучения He-Ne-лазера ( $\lambda = 0.6328$  мкм,  $W = 5.0$  мВт) радиусом  $r = 1$  мм. Поляризационный осветитель состоит из четвертьволновых пластинок 3, 5 и поляризатора 4. Поляризационные изображения БТ с помощью микрообъектива 7 проецировались в плоскость светочувствительной площадки ( $m \times n = 800 \times 600$  пикселей) CCD-камеры 10. Анализ изображений БТ осуществлялся с помощью поляризатора 9 и четвертьволновой пластинки 8. Детально методика измерения элементов матрицы Мюллера приведена в монографии Джеррарда [6]. В нашей работе мы ограничимся кратким ее изложением.

Элементы матрицы Мюллера БТ определяются следующим образом:

$$\begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \\ S_4 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} z_{11} & z_{12} & z_{13} & z_{14} \\ z_{21} & z_{22} & z_{23} & z_{24} \\ z_{31} & z_{32} & z_{33} & z_{34} \\ z_{41} & z_{42} & z_{43} & z_{44} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} S_{01} \\ S_{02} \\ S_{03} \\ S_{04} \end{bmatrix}, \quad (3)$$

где  $S_0, S$  – векторы Стокса зондирующего и объектного лазерных пучков.

Элементы  $z_{ik}$  матрицы Мюллера для каждого пикселя цифровой камеры определялись по следующему алгоритму:

1. Поочередно измерялись интенсивности  $I_0, I_{90}, I_{45}, I_{-45}, I_{\oplus}$  (правоциркулярная поляризация) и  $I_{\otimes}$  (левоциркулярная поляризация) с последующим определением параметров Стокса объектного пучка:

$$\begin{aligned} S_1 &= I_0 + I_{90}, \\ S_2 &= I_0 - I_{90}, \\ S_3 &= I_{45} - I_{-45}, \\ S_4 &= I_{\otimes} - I_{\oplus}. \end{aligned} \quad (4)$$

2. Гистологический срез биологической ткани освещался лазерными пучками в четырех основных состояниях поляризации ( $0^\circ, 90^\circ, +45^\circ, \otimes$ ) и определялись соотношения (4) для параметров Стокса объектного пучка:

$$\begin{aligned} S_1^0 &= z_{11} + z_{12}, & S_1^{90} &= z_{11} - z_{12}, \\ S_1^{45} &= z_{11} + z_{13}, & S_1^{\otimes} &= z_{11} + z_{14}, \\ S_2^0 &= z_{21} + z_{22}, & S_2^{90} &= z_{21} - z_{22}, \\ S_2^{45} &= z_{21} + z_{23}, & S_2^{\otimes} &= z_{21} + z_{24}, \end{aligned}$$

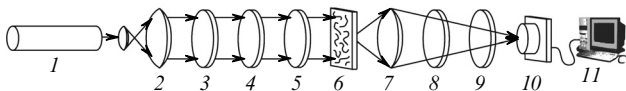


Рис.1. Оптическая схема поляриметра: 1 – He-Ne-лазер; 2 – коллиматор; 3 – стационарная четвертьволновая пластинки; 4 – поляризатор; 5, 8 – подвижные (механически) четвертьволновые пластинки; 6 – исследуемый объект; 7 – микрообъектив; 9 – анализатор; 10 – CCD-камера; 11 – персональный компьютер.

$$\begin{aligned} S_3^0 &= z_{31} + z_{32}, & S_3^{90} &= z_{31} - z_{32}, \\ S_3^{45} &= z_{31} + z_{33}, & S_3^{\otimes} &= z_{31} + z_{34}, \\ S_4^0 &= z_{41} + z_{42}, & S_4^{90} &= z_{41} - z_{42}, \\ S_4^{45} &= z_{41} + z_{43}, & S_4^{\otimes} &= z_{41} + z_{44}. \end{aligned} \quad (5)$$

Из соотношений (5) находились элементы матрицы Мюллера слоя БТ

$$\begin{aligned} z_{11} &= 0.5(S_1^0 + S_1^{90}), & z_{21} &= 0.5(S_2^0 + S_2^{90}), \\ z_{31} &= 0.5(S_3^0 + S_3^{90}), & z_{41} &= 0.5(S_4^0 + S_4^{90}), \\ z_{12} &= 0.5(S_1^0 - S_1^{90}), & z_{22} &= 0.5(S_2^0 - S_2^{90}), \\ z_{32} &= 0.5(S_3^0 - S_3^{90}), & z_{42} &= 0.5(S_4^0 - S_4^{90}), \\ z_{13} &= S_1^{45} - z_{11}, & z_{23} &= S_2^{45} - z_{21}, \\ z_{33} &= S_3^{45} - z_{31}, & z_{43} &= S_4^{45} - z_{41}, \\ z_{14} &= S_1^{\otimes} - z_{11}, & z_{24} &= S_2^{\otimes} - z_{21}, \\ z_{34} &= S_3^{\otimes} - z_{31}, & z_{44} &= S_4^{\otimes} - z_{41}, \end{aligned} \quad (6)$$

после чего определялась совокупность их приведенных значений  $z_{ik} = z_{ik}/z_{11}$ .

В пределах сечения лазерного пучка радиусом  $r = 1$  мм определялись ММИ – массивы ( $m \times n = 800 \times 600$  пикселей) значений элементов  $Z_{ik}$  ( $m \times n$ ) матрицы Мюллера. Далее плоскость гистологического среза (около  $10 \times 20$  мм) БТ построчно сканировались лазерным пучком с шагом линейного перемещения  $\Delta r = 2$  мм. В пределах каждого из 50 участков ( $j = 1, 2, \dots, 50$ ) освещаемого слоя БТ согласно алгоритму (6) определились локальные массивы  $Z_{ik}^{(j)}$ :

$$Z_{ik}^{(j)} = \begin{pmatrix} Z_{ik}^{11} & \dots & Z_{ik}^{1m} \\ \dots & \dots & \dots \\ Z_{ik}^{n1} & \dots & Z_{ik}^{nm} \end{pmatrix}_j. \quad (7)$$

Для каждого ММИ элемента  $Z_{ik}^{(j)}$  рассчитывались статистические моменты 3-го ( $M_j^{(s=3)ik}$  – асимметрия) и 4-го ( $M_j^{(s=4)ik}$  – эксцесс) порядков с использованием следующих соотношений:

$$M_j^{(s=3)} = \frac{1}{(M^{(s=2)})^3} \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Z_{ik}^{(j)})^3, \quad (8)$$

$$M_j^{(s=4)} = \frac{1}{(M^{(s=2)})^4} \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Z_{ik}^{(j)})^4. \quad (9)$$

Здесь  $M_j^{(s=2)}$  – дисперсия  $Z_{ik}^{(j)}$ .

На основании (8) и (9) определялись гистограммы  $N(M_j^{(s=3,4)})$  набора величин статистических моментов высших порядков, характеризующих двумерные распределения матричных элементов  $Z_{ik}^{(j)}$  в пределах всех 50 освещаемых участков гистологических срезов исследуемых БТ.

## 3. Исследования распределений асимметрии и эксцесса ММИ элемента $Z_{44}$ гистологических срезов биологических тканей

В качестве объектов экспериментального исследования нами были выбраны три группы гистологических срезов основных типов БТ крысы:

- группа А – соединительная ткань (дерма кожи);
- группа Б – мышечная ткань (ткань скелетной мышцы);
- группа В – эпителиальная ткань.

Такой выбор объектов позволяет провести сравнительные исследования эффективности мюллеровского матричного метода диагностики изменений двулучепреломления как в пределах одной группы образцов, так и для различных типов БТ. Помимо этого, исследование БТ крысы позволяет реализовать возможность прямого экспериментального формирования септического воспаления и осуществить мюллеровский матричный мониторинг его оптических проявлений в условиях рассеяния лазерного излучения различной кратности. С этой целью выбирались оптически тонкие (коэффициент ослабления  $\tau \leq 0.1$ ) и оптически толстые ( $\tau \geq 0.1$ ) гистологические срезы исследуемых образцов БТ.

В настоящей работе мы ограничимся анализом гистограмм статистических моментов 3-го и 4-го порядков, которые характеризуют двумерные распределения мат-

ричного элемента  $Z_{44}$ . Выбор матричного элемента  $Z_{44}$  обусловлен тем, что его величина ( $z_{44} \propto (2\pi/\lambda)\Delta nd$ , см. соотношения (2)) непосредственно характеризует оптическое двулучепреломление  $\Delta n$  сети протеиновых фибрилл внеклеточной матрицы слоя БТ.

На рис.2–4 приведены координатные распределения ММИ матричного элемента  $Z_{44}$  гистологических срезов соединительной (рис.2), мышечной (рис.3) и эпителиальной (рис.4) тканей крысы.

Из полученных экспериментальных данных видно, что ММИ элемента  $Z_{44}$  всех типов БТ координатно неоднородны. Для оптически тонких гистологических срезов образцов здоровых соединительной, мышечной и эпителиальной тканей характерен меньший (от  $-0.7$  до  $0.7$ ) диапазон изменения значений матричного элемента  $Z_{44}$ , чем для образцов воспаленных тканей (от  $-0.85$  до  $0.85$ ). Такой характер структуры ММИ элемента  $Z_{44}$  можно связать с тем, что при распространении лазерной волны сквозь сеть оптически анизотропных протеиновых (коллагеновых, миозиновых, эластиновых) фибрилл фор-

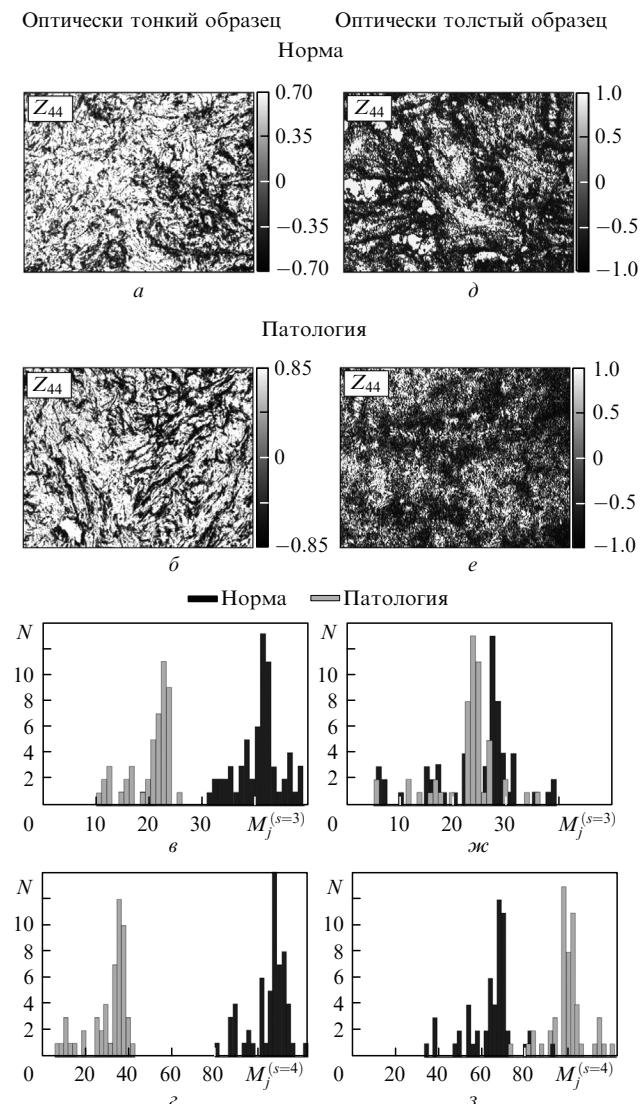


Рис.2. Координатные распределения элемента  $Z_{44}$  гистологических срезов оптически тонких (а, б) и оптически толстых (д, е) слоев здоровой (а, д) и воспаленной (б, е) дермы кожи крысы. Фрагменты в и г соответствуют гистограммам  $N(M_j^{(s=3,4)})$  статистических моментов высших порядков  $M_j^{(s=3,4)}$  оптически тонких, ж и з – оптически толстых слоев.

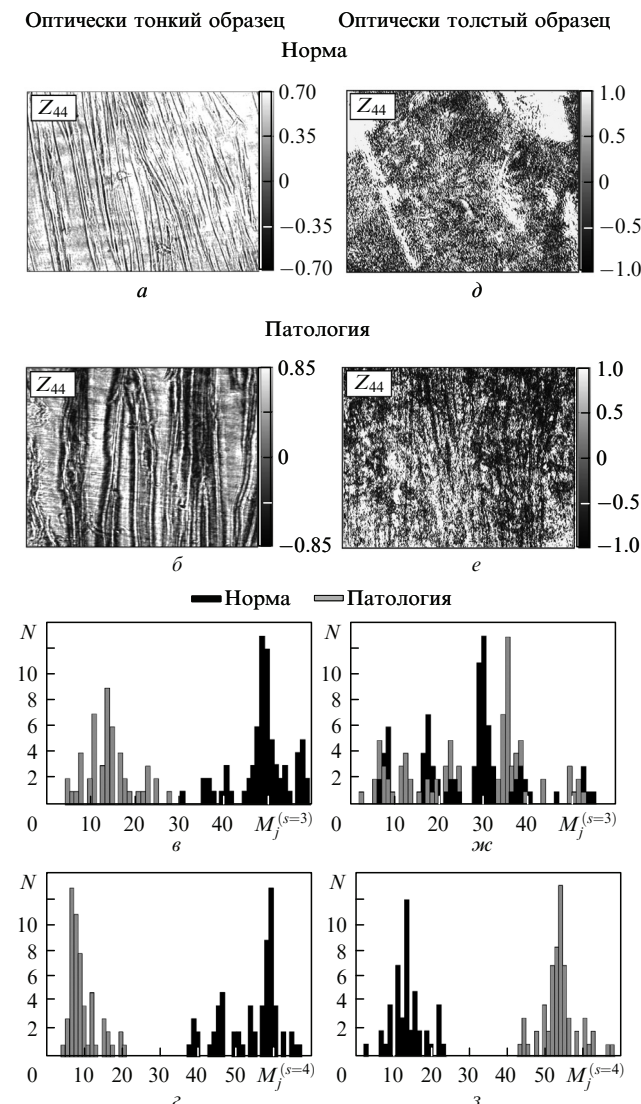


Рис.3. Координатные распределения элемента  $Z_{44}$  гистологических срезов оптически тонких (а, б) и оптически толстых (д, е) слоев здоровой (а, д) и воспаленной (б, е) ткани скелетной мышцы крысы. Фрагменты в, г соответствуют гистограммам  $N(M_j^{(s=3,4)})$  статистических моментов высших порядков  $M_j^{(s=3,4)}$  оптически тонких, ж, з – оптически толстых слоев.



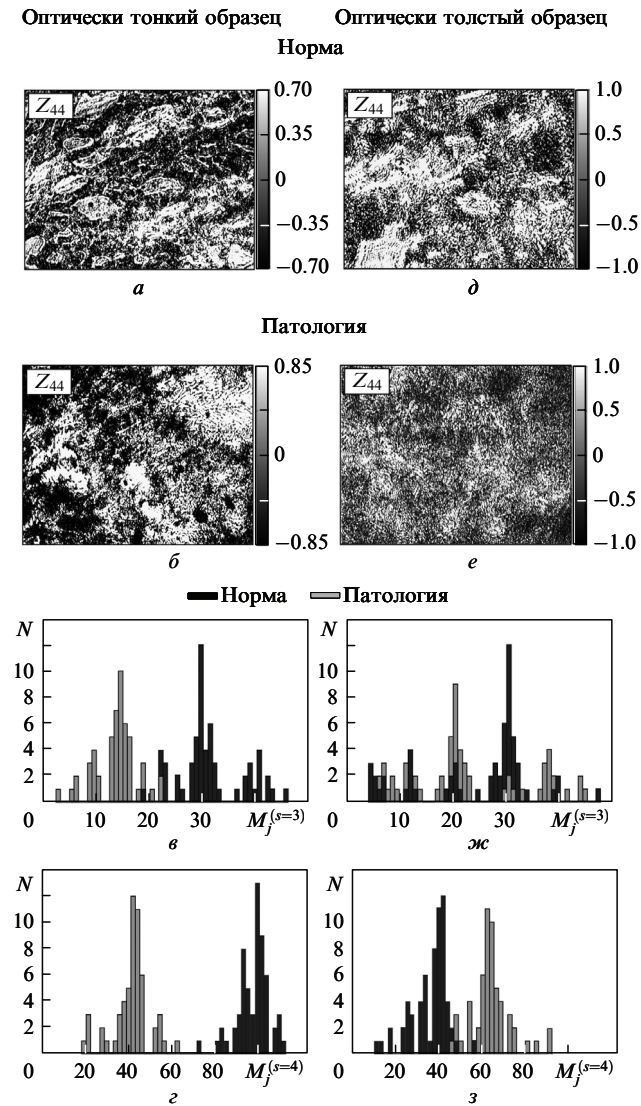


Рис.4. Координатные распределения элемента  $Z_{44}$  гистологических срезов оптически тонких ( $a, б$ ) и оптически толстых ( $д, е$ ) слоев здоровой ( $a, д$ ) и воспаленной ( $б, е$ ) эпителиальной ткани крысы. Фрагменты  $v, z$  соответствуют гистограммам  $N(M_j^{(s=3,4)})$  статистических моментов высших порядков  $M_j^{(s=3,4)}$  оптически тонких,  $жс, z$  – оптически толстых слоев.

мируется широкий спектр значений фазовых сдвигов  $\delta_k$ , пропорциональных их геометрическим размерам  $d_k$  в плоскости гистологического среза БТ:

$$\delta_k \propto \frac{2\pi\Delta n}{\lambda} d_k. \tag{10}$$

Процесс воспаления БТ сопровождается ростом двулучепреломления  $\Delta n$  за счет формирования отеков протеиновых фибрилл. С оптической точки зрения данный физиологический процесс приводит к увеличению диапазона изменения фазовых сдвигов  $\delta_k$  и к связанному с этим росту флуктуаций значений элемента  $Z_{44}$  (рис.2–4).

Анализ гистограмм  $N(M_j^{(s=3,4)})$  величин  $M_j^{(s=3,4)}$  координатных распределений матричного элемента  $Z_{44}^{(j)}$  оптически тонких слоев БТ обнаружил:

- диапазоны изменения значений асимметрии  $M_j^{(s=3)}$  и эксцесса  $M_j^{(s=4)}$ , измеренных в различных точках слоев здоровой и воспаленной биологических тканей крысы, не совпадают;

- экстремальные значения  $M_j^{(s=3)}$  и  $M_j^{(s=4)}$  соответствующих гистограмм  $N(M_j^{(s=3,4)})$  для образцов здоровых тканей больше аналогичных значений статистических моментов 3-го и 4-го порядков для воспаленных тканей: для соединительной в 2–3 раза, для мышечной в 4–6 раз, для эпителиальной в 1.5–2 раза.

Таким образом, для однозначной дифференциации физиологического состояния оптически тонких слоев БТ достаточно измерить в одной области (площадью  $\pi r^2$ ), облучаемой лазерным пучком, координатное ( $m \times n$ ) распределение матричного элемента  $Z_{44}$  и вычислить значения  $M_j^{(s=3)}$  и  $M_j^{(s=4)}$ .

Для оптически толстых слоев здоровых и воспаленных тканей всех групп (рис.2–4) характерен одинаковый диапазон изменения значений матричных элементов  $Z_{44}$ . Данный факт можно связать с кратностью светорассеяния в толще БТ. В результате каждого локального ( $i$ -го) акта взаимодействия лазерного излучения с отдельной фибриллой формируется случайный фазовый сдвиг  $\delta^{(i)}$ , величина которого «мультиплицируется» ( $\delta^* = \sum_{i=1}^k \delta_i$ ) в процессе дальнейшего распространения в толще БТ, достигая равновероятных случайных значений от 0 до  $2k\pi$  ( $k = 1, 2, 3, \dots$ ).

Проведенный анализ гистограмм  $N(M_j^{(s=3,4)})$  набора значений статистических моментов  $M_j^{(s=3)}$  и  $M_j^{(s=4)}$ , характеризующих распределения  $Z_{44}^{(j)}$  оптически толстых слоев тканей крысы, обнаружил:

- диапазоны изменения значений асимметрии  $M_j^{(s=3)}$  распределений  $Z_{44}^{(j)}$ , измеренных в пределах всей плоскости образцов здоровых и воспаленных БТ, практически совпадают и не могут служить объективным критерием дифференциации их оптических свойств;

- гистограммы  $N(M_j^{(s=4)})$  значений эксцесса  $M_j^{(s=4)}$  распределений  $Z_{44}^{(j)}$  индивидуальны для каждого типа БТ и ее физиологического состояния;

- различия в значениях эксцесса  $M_j^{(s=4)}$  распределений  $Z_{44}^{(j)}$  образцов здоровой и воспаленной ткани составляют 1.25 (дерма кожи)–4 (мышечная ткань) раза.

Таким образом, для реализации мюллеровской матричной дифференциации оптически толстых слоев БТ на ранних этапах изменения их физиологического состояния объективным является измерение гистограмм значений эксцесса  $N(M_j^{(s=4)})$ , характеризующих координатное распределение матричного элемента  $Z_{44}^{(j)}$ .

#### 4. Заключение

Установлено, что для оптически тонких образцов в задачах дифференциации физиологического состояния БТ достаточным является определение значений асимметрии  $M^{(s=3)}$  и эксцесса  $M^{(s=4)}$ , характеризующих координатное распределение  $Z_{44}$  в произвольной области, зондируемой лазерным пучком.

Для оптически толстых образцов наиболее объективным диагностическим критерием является нахождение экстремальных значений 4-го статистического момента, который характеризует гистограммы  $N(M_j^{(s=4)})$  локальных значений эксцесса координатных распределений элемента  $Z_{44}^{(j)}$  в различных ( $j$ -х) областях слоев диагностируемых БТ.

1. Ushenko A.G., Pishak V.P., in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* (Boston: Kluwer Acad. Publ., 2004, p. 67–93).

2. De Boer J.F., Milner T.E. *J. Biomed. Opt.*, **7**, 359 (2002).
3. De Boer J.F., Milner T.E., Nelson J.S., in *Trends in Optics and Photonics (TOPS): Advances in Optical Imaging and Photon Migration* (Washington, DC: OSA, 1998).
4. Everett M.J., Shoenenberger K., Colston B.W., Da Silva L.B. *Opt. Lett.*, **23**, 228 (1998).
5. Shuliang Jiao, Wurong Yu, George Stoica, Lihong V. Wang. *Opt. Lett.*, **28**, 1206 (2003).
6. Gerrard A., Burch J.M. *Introduction to Matrix Methods in Optics* (New York: Wiley, 1975).
7. Angelsky O.V., Ushenko A.G., Ushenko Yu.A., Pishak V., in *Optical Correlation Techniques and Applications* (Washington: Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng., 2007, pp 213–266).
8. Angelsky O.V., Ushenko A.G., Ushenko Yu.A., Pishak V., Peresunko A., in *Handbook of Photonics for Biomedical Science* (New York: CRC Press, 2010, pp 21–67).
9. Ushenko Alexander G. *Opt. Eng.*, **34** (4), 1088 (1995).
10. Ушенко А.Г., Ермоленко С.Б., Бурковец Д.Н., Ушенко Ю.А. *Оптика и спектроскопия*, **87** (3), 434 (1999).
11. Ушенко А.Г. *Оптика и спектроскопия*, **89** (4), 597 (2000).
12. Ангельский О.В., Ушенко А.Г., Ермоленко С.Б., Бурковец Д.Н., Пишак В.П., Ушенко Ю.А. Пишак О.В. *Оптика и спектроскопия*, **89** (5), 799 (2000).
13. Ангельский О.В., Ушенко А.Г., Архелюк А.Д., Ермоленко С.Б., Бурковец Д.Н., Ушенко Ю.А. *Оптика и спектроскопия*, **89** (6), 973 (2000).
14. Ushenko A.G. *Laser Phys.*, **10** (5), 1143 (2000).
15. Ushenko A.G., Ermolenko S.B., Burkovets D.N., Ushenko Yu.A. *J. Appl. Spectrosc.*, **67** (1), 65 (2000).
16. Angel'skii O.V., Ushenko A.G., Arheluk A.D., Ermolenko S.B., Burkovets D.N., Ushenko Y.A. *J. Appl. Spectrosc.*, **67** (5), 919 (2000).
17. Ushenko A.G., Burkovets D.N., Ushenko Y.A. *Laser Phys.*, **11** (5), 624 (2001).
18. Ангельский О.В., Ушенко А.Г., Бурковец Д.Н., Ушенко Ю.А. *Оптика и спектроскопия*, **90** (3), 458 (2001).
19. Ушенко А.Г. *Оптика и спектроскопия*, **91** (2), 313 (2001).
20. Ушенко А.Г. *Оптика и спектроскопия*, **91** (6), 932 (2001).
21. Angelsky O.V., Ushenko A.G., Ushenko Yu.A. *J. Holography and Speckle*, **2** (2), 72 (2002).
22. Ушенко А.Г., Бурковец Д.Н., Ушенко Ю.А. *Оптика и спектроскопия*, **93** (3), 449 (2002).
23. Angelsky Oleg V., Ushenko Alexander G., Burkovets Dimitry N., Ushenko Yuriy A. *Opt. Applicata*, **32** (4), 591 (2002).
24. Angelsky Oleg V., Demianovsky G.V., Ushenko A.G., Burkovets D.N., Ushenko Yu.A. *J. Biomed. Opt.*, **9**, 679 (2004).
25. Angelsky Oleg V., Ushenko Alexander G., Burkovets Dimitry N., Ushenko Yuriy A. *J. Biomed. Opt.*, **10**, 014010 (2005).
26. Angelsky O.V., Ushenko A.G., Ushenko Ye.G. *J. Holography and Speckle*, **2** (1), 26 (2005).
27. Angelsky Oleg V., Ushenko Alexander G., Burkovets Dimitry N., et al. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **38** (23), 4227 (2005).
28. Angelsky O.V., Ushenko A.G., Ushenko Ye.G. *Phys. Med. Biol.*, **50**, 4811 (2005).