

МЕТОД И ПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ЛОКАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПАТОЛОГИЙ АНИЗОТРОПНЫХ БИОТКАНЕЙ

¹Ровира Р.У., ¹Тужанский С.Е., ²Савенков С.Н., ¹Павлов С.В.,
²Чунихина Е.И., ²Коломиец И.С., Климов А.С.

¹Винницкий национальный технический университет,
г. Винница, Хмельницкое шоссе, 95
тел. +38(0432)59-84-50, e-mail: slavat@vntu.edu.ua

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

Рассмотрен метод локальной поляриметрической дифференциации патологических изменений анизотропных биотканей на основе анализа параметров анизотропии, которые получены в процессе обработки экспериментальных локальных матриц Мюллера исследуемого образца с учетом их разложения в базисе амплитудной и фазовой анизотропии с использованием аппарата нечетких множеств. Для реализации метода усовершенствована система адаптивной лазерной поляриметрии и ее программное обеспечение. Представлены результаты экспериментов, проведенных на образцах человеческой кожи с доброкачественным (папиллома) и злокачественным (меланома) образованиями.

Ключевые слова: лазерная поляриметрия, биоткань, матрица Мюллера, линейная анизотропия, фазовая анизотропия, деполяризация.

Введение

Одним из важных направлений в диагностике новообразований является разработка средств зондирования биотканей (БТ) поляризованным излучением видимого и ближнего ИК диапазонов спектра. Оценку параметров, характеризующих морфофункциональное состояние биоткани, можно осуществлять на основе анализа состояния поляризации рассеянного БТ лазерного излучения на одной или нескольких длинах волн, а также в некотором спектральном диапазоне (спектрально-поляризационные методы) [4, 7, 8].

Оптический анализ патологических структурных изменений БТ является сложной задачей, так как процессы линейного взаимодействия света с большинством БТ в области их прозрачности связаны со случайными неоднородностями, обуславливающими сильное рассеивание. При этом на клеточном уровне многие БТ являются упорядоченными структурами, которые способны проявлять анизотропные (двулучепреломление, оптическая активность, линейный дихроизм, циркулярный дихроизм) и деполяризующие свой-

ства [4]. Степень деполяризации излучения при прохождении таких БТ позволяет выделить оптический сигнал, формируемый преимущественно актами однократного рассеяния [1].

Биологические ткани имеют сложную морфологию, поэтому измерительная система для дифференциации патологических изменений БТ должна быть достаточно универсальной и оперативной, чтобы обеспечивать полный цикл измерений элементов матрицы рассеяния света до появления необратимых изменений в тканях *in vivo* или до проявления сенсорно-моторной реакции в образцах *in vitro*. Также система должна иметь возможность адаптации к различным типам биообъектов (даже за счет уменьшения быстродействия).

Для обнаружения новообразований и дегенеративно-дистрофических изменений различных БТ (кожная и мышечная ткань, роговица, ретина, хрусталик глаза и др.) разработано много современных подходов с использованием лазерной поляриметрии [1, 4, 7]. Современные поляриметрические устройства (ПУ) имеют высокие показатели точности измерений [7]. Однако, по-прежнему,

недостаточно изучены характеристики локальных поляризационных и анизотропных параметров БТ, которые могут проявлять максимальную чувствительность к изменению структуры и оптических свойств зондируемой среды.

Целью работы является экспериментальное исследование возможностей применения метода адаптивной локальной лазерной поляриметрии новообразований в биологических тканях (in vitro) на примере тонких образцов эпидермиса кожи. Метод заключается в измерении характеристик анизотропии образца, получаемых из локальных матриц Мюллера объекта с учетом доминирующего типа анизотропии с последующей дифференциацией патологических изменений в образцах БТ на основе принципа нечетких множеств.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования метода поляриметрической дифференциации патологических изменений в структурах анизотропных БТ проводились с помощью компьютерной системы адаптивной лазерной поляриметрии (САЛП) на кафедре квантовой радиофизики КНУ имени Тараса Шевченко. Структурная схема экспериментальной установки приведена на рис. 1.

Установка функционирует в режиме динамического Мюллер-поляриметра в режиме прямого рассеивания (рис. 1). Базовым источником излучения в системе является *He-Ne* лазер ($\lambda_1=0,6328$ мкм, $P_{\text{макс}}=30$ мВт, $d_{\text{пучка}}=2$ мм). Выходной пучок лазера, отраженный от поворотных зеркал, проходит через ослабитель когерентности ОК (вращающийся матовый диск, устраняющий спекл-структуры в плоскости регистрации). Далее пучок входит в канал I, проходит коллиматор К с пространственным фильтром (диафрагмой с $d_{\text{отв}}=50$ мкм) для очистки от рассеянного и дифрагированного света и поляризатор П. Модуляция поляризации света осуществляется ахроматической фазовой пластинкой ФП1, которая изменяет азимут ориентации быстрой оси

при вращении вокруг оптической оси с помощью привода от двигателя Д1. Преобразованный лазерный пучок с эллиптической поляризацией рассеивается образцом БТ, который установлен в держателе на предметном столике с двухкоординатным микропозиционером (для перемещений в плоскости регистрации). Рассеянное излучение попадает в приемный канал П, который состоит из вращающейся фазовой пластинки ФП2, анализатора А и фотодиода ФД. Преобразованный выходной сигнал в динамическом режиме регистрируется и обрабатывается в БРОС (включает усилитель и 16-битный АЦП), подключен к персональному компьютеру со специализированным программным обеспечением.

Методика определения параметров анизотропии основана на линейном взаимодействии света с участком тонкого образца БТ в рамках Мюллер-матричного формализма [11].

Матрица Мюллера M связывает исходный вектор Стокса излучения, действующего на образец, с выходящим:

$$S^{out} = M \cdot S^{in} = \begin{bmatrix} m_{11} & m_{12} & m_{13} & m_{14} \\ m_{21} & m_{22} & m_{23} & m_{24} \\ m_{31} & m_{32} & m_{33} & m_{34} \\ m_{41} & m_{42} & m_{43} & m_{44} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} S_1^{in} \\ S_2^{in} \\ S_3^{in} \\ S_4^{in} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} S_1^{out} \\ S_2^{out} \\ S_3^{out} \\ S_4^{out} \end{bmatrix}, \quad (1)$$

где S^{in} , S^{out} – векторы Стокса до и после взаимодействия света с объектом, M – матрица Мюллера объекта (участка плоского тонкого образца БТ).

При нормальном падении световой волны на плоскость образца характеристики анизотропии и деполяризации объекта представляют с помощью матричного выражения [3]

$$S^{out} = M_A \cdot M_{ФП1} \cdot M_{БТ} \cdot M_{ФП2} \cdot M_{П} \cdot S^{in}, \quad (2)$$

где M_A , $M_{ФП1}$ та $M_{П}$ – матрицы Мюллера элементов схемы поляриметра (анализатора, фазовой пластинки, поляризатора); $M_{БТ}$ – матрица Мюллера участка образца БТ.

Матрица Мюллера фазовой пластинки имеет вид [3]

$$M_{ФП} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos^2(2\alpha) + \sin^2(2\alpha)\cos\delta & \cos(2\alpha)\sin(2\alpha)(1 - \cos\delta) & -\sin(2\alpha)\sin\delta \\ 0 & \cos(2\alpha)\sin(2\alpha)(1 - \cos\delta) & \sin^2(2\alpha) + \cos^2(2\alpha)\cos\delta & \cos(2\alpha)\sin\delta \\ 0 & \sin(2\alpha)\sin\delta & -\cos(2\alpha)\sin\delta & \cos\delta \end{bmatrix}, \quad (3)$$

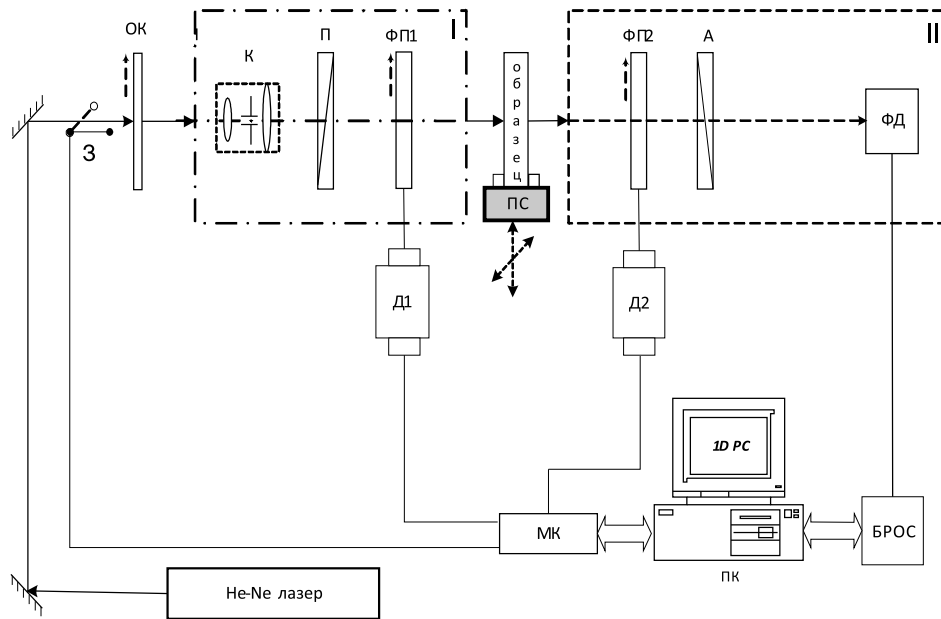


Рис. 1. Структурная схема САЛП: З – затвор; РК – разрушитель когерентности; К – коллиматор; П – поляризатор; А – анализатор; ФП1, ФП2 – фазовые пластинки; Д1, Д2 – электродвигатели; ПС – предметный столик; ПК – персональный компьютер; ФД – фотодетектор; МК – микроконтроллерный блок управления; БРОС – блок регистрации и обработки сигналов

где $\delta = \frac{2\pi}{\lambda}(n_o - n_e)d$ – фазовый сдвиг между обычным и необычным лучами; d – толщина образца БТ; α – азимут ориентации быстрой оси фазовой пластинки.

Матрицы Мюллера поляризатора (анализатора) имеют вид [3]

$$M_{II} = M_A = \begin{bmatrix} 1 & \cos(2\alpha) & \sin(2\alpha) & 0 \\ \cos(2\alpha) & \cos^2(2\alpha) & \cos(2\alpha)\sin(2\alpha) & 0 \\ \sin(2\alpha) & \cos(2\alpha)\sin(2\alpha) & \sin^2(2\alpha) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (4)$$

Тонкие срезы биотканей часто характеризуются фазовой анизотропией и отсутствием деполяризации [5], однако некоторым видам БТ свойственны смешанные механизмы фазовой и амплитудной анизотропий (двулучепреломления и дихроизма), одновременный комбинированный анализ которых классическими методами затруднен.

Предлагается универсальный метод, заключающийся в разложении экспериментальной матрицы Мюллера образца БТ в базисе амплитудной и фазовой анизотропии, который используется для анализа анизотропных свойств объектов небиологической природы (оптические элементы, кристаллы и др.) [3].

Последовательное действие излучения на каждый из четырех видов анизотропии для локального участка плоского тонкого образца БТ определяем произведением [3, 7]

$$M_B = M_{CP} \cdot M_{LP} \cdot M_{LA} \cdot M_{CA'} \quad (5)$$

где $M_{CP}, M_{LP}, M_{CA'}, M_{LA}$ – матрицы Мюллера кру-

говой фазовой, линейной фазовой, круговой амплитудной и линейной амплитудной анизотропии, соответственно.

Действительные формы матриц и уравнений для параметров, характеризующих такие виды анизотропии представлены далее [3]. Так, матрица Мюллера циркулярной фазовой анизотропии имеет вид:

$$M_{CP} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos(2\phi) & \sin(2\phi) & 0 \\ 0 & -\sin(2\phi) & \cos(2\phi) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (6)$$

где ϕ – величина оптической активности (циркулярной фазовой анизотропии).

$$M_{LA} = \begin{bmatrix} 1+P & (1-P)\cos(2\theta) & (1-P)\sin(2\theta) & 0 \\ (1-P)\cos(2\theta) & \cos^2(2\theta)(1+P)+2\sin^2(2\theta)\sqrt{P} & \sin(2\theta)\cos(2\theta)(1-\sqrt{P})^2 & 0 \\ (1-P)\sin(2\theta) & \sin(2\theta)\cos(2\theta)(1-\sqrt{P})^2 & \sin^2(2\theta)(1+P)+2\cos^2(2\theta)\sqrt{P} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2\sqrt{P} \end{bmatrix}, \quad (7)$$

Матрица Мюллера M_{LP} линейной фазовой анизотропии описывает фазовую пластинку со сдвигом δ вида (3).

Матрица Мюллера линейной амплитудной анизотропии:

де $P = \frac{k_{\perp}}{k_{\parallel}}$ – параметр линейного дихроизма (отношение коэффициентов минимального k_{\perp} и максимального k_{\parallel} пропускания линейных компонент вектора E), θ – азимут ориентации оси максимального пропускания.

Матрица Мюллера циркулярной амплитудной анизотропии объекта:

$$M_{CA} = \begin{bmatrix} 1+R^2 & 0 & 0 & 2R \\ 0 & 1-R^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1-R^2 & 0 \\ 2R & 0 & 0 & 1+R^2 \end{bmatrix}, \quad (8)$$

где $R = \frac{\tau_+ - \tau_-}{\tau_+ + \tau_-}$ – параметр циркулярного дихроизма (τ_+ , τ_- – коэффициенты пропускания для право- и левциркулярной компонент вектора E).

Выражения для расчета параметров анизотропии на основе элементов матрицы Мюллера объекта [9]:

$$\theta = 0,5 \arctan \left(\frac{m_{13}}{m_{12}} \right), \quad (9)$$

$$P = \frac{(m_{11} - m_{12} \cos(2\theta) - m_{13} \sin(2\theta))^2}{m_{11}^2 - (m_{12} \cos(2\theta) - m_{13} \sin(2\theta))^2}, \quad (10)$$

$$R = \frac{m'_{1\pm} \pm \sqrt{(m'_{11})^2 - (m'_{14})^2}}{m'_{14}}, \quad (11)$$

$$\alpha = 0,5 \arctan \left(\frac{m''_{42}}{m''_{43}} \right), \quad (12)$$

$$\delta = \arctan \left(\frac{m''_{42}}{-m''_{44} \sin(2\theta)} \right), \quad (13)$$

$$\varphi = \arctan \frac{1}{2} \left(\frac{m''_{34} m''_{42} - m''_{24} m''_{34}}{m''_{34} m''_{43} - m''_{24} m''_{34}} \right), \quad (14)$$

где m'_{ij} – элементы матрицы $M' = M_B \cdot (M_{LA})^{-1}$,

m''_{ij} – элементы матрицы $M' = M_B \cdot (M_{CA})^{-1}$.

Для анализа анизотропных свойств БТ с целью их дальнейшей дифференциации по типу структурных изменений разработан программный модуль расчета параметров анизотропии и деполяризации, которые определяют из элементов измеренной матрицы Мюллера объекта с учетом классификации образца согласно схеме, представленной на рис. 2.

Таким образом, локальная матрица M_B БТ является функцией шести параметров $M_B = F(R, P, \theta, \delta, \alpha, \varphi)$, диапазоны физически реализуемых значений которых [7, 9]:

$$\begin{aligned} 0 \leq \varphi \leq 2\pi, \\ 0 \leq \delta \leq 2\pi, -\frac{\pi}{2} \leq \alpha \leq \frac{\pi}{2}, \\ 0 \leq P \leq 1, -\frac{\pi}{2} \leq \theta \leq \frac{\pi}{2}, \\ -1 \leq R \leq 1. \end{aligned} \quad (15)$$

Обработка матриц Мюллера осуществляется по методу Клауда на основе расчетов параметра энтропии (анизотропной разупорядоченности) объекта [10]. Анализ объектов со смешанными анизотропиями для ряда однородных объектов представлен в работах [9, 12].

В поляриметрической системе калибровка и управление оптическими элементами, измерение элементов вектора Стокса, расчет матриц Мюллера образца и соответствующих параметров, а также обработка, хранение и вывод результатов измерений на монитор ПК производится с помощью компьютерной программы *1D Polarimetric complex*.

В дополнение к основной программе АПС для реализации функции дифференциации состояний

биологических тканей по типам структурных изменений (наличия патологии) реализован дополнительный программный модуль на основе метода нечетких множеств, в основу которого заложены функции сохранения функций принадлежности, нечеткой обработки и отображения результата.

Общий принцип дифференциации анизотропных биотканей на основе метода нечетких множеств представлен на рис. 3.

Каждая степень изменений параметров анизотропии на рис. 4 подана в виде качественных термов: низкий (Н), ниже среднего (НС), средний (С), выше среднего (ВС), высокий (В) [6]. Для каждой из баз данных с целью формализации показателей экспертным медицинским персоналом на основе комплекса функциональных исследований определяются соответствующие функции принадлежности (ФП). При выраженном одном из типов анизотропии другие не используются. В зависимости от объекта дополнительно для классификации могут быть использованы энтропия (степень деполаризации).

Экспериментальные исследования проводились *in vitro* в лаборатории лазерной поляриметрии кафедры квантовой радиофизики КНУ имени Тараса Шевченко на тонких (20÷50 мкм) гистологических срезах эпидермиса человеческой кожи с образованиями типа папиллома и меланома (2-я стадия по Кларку). Срезы эпидермиса (24 шт.) фиксировались на предметном стекле толщиной 1,5 мм по методу заморозки с фиксацией в канадском бальзаме (по 4-5 идентичных срезов на одном стекле). Линейные размеры опу-

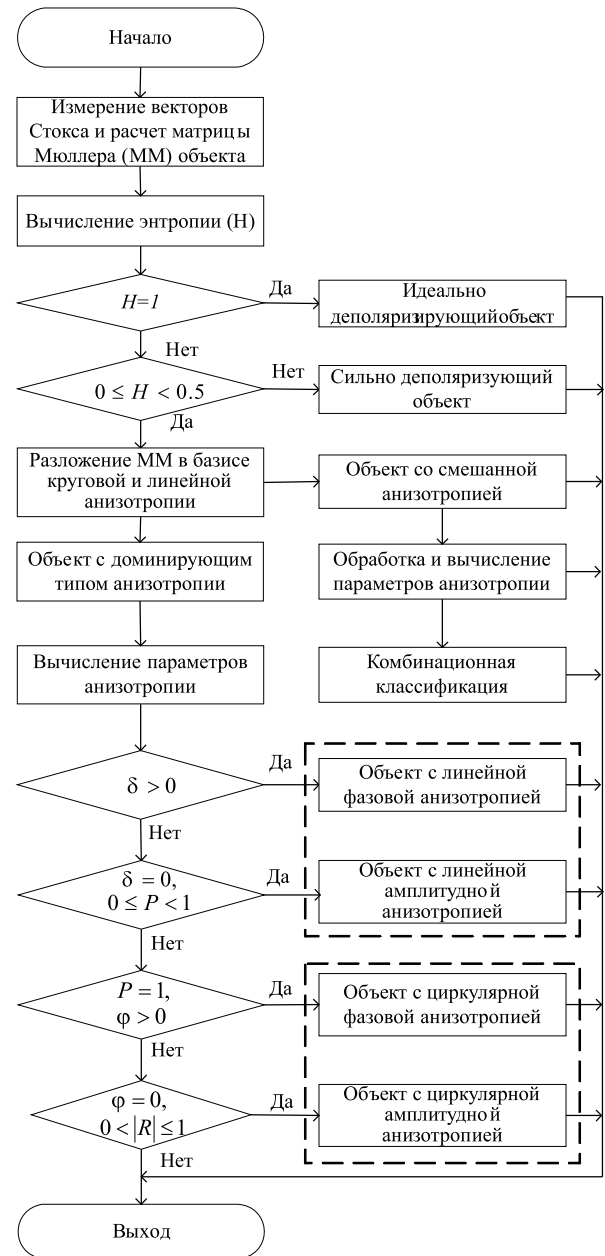


Рис. 2. Блок-схема алгоритма классификации БТ по анизотропным свойствам

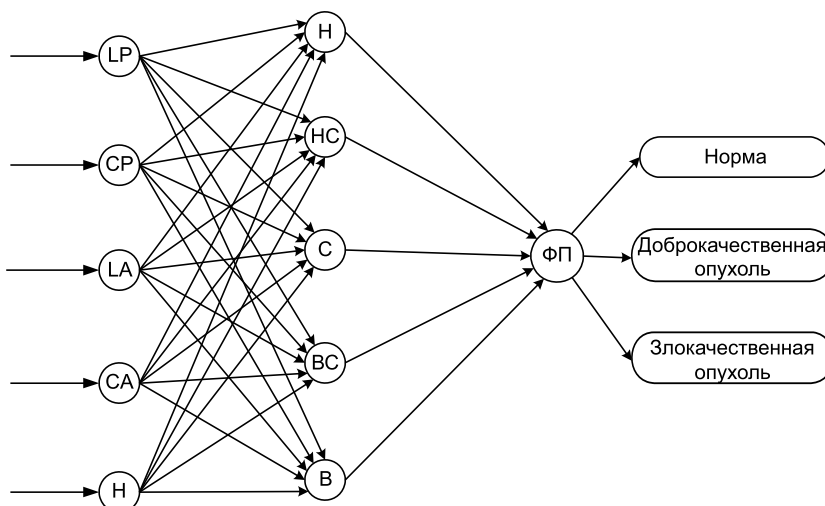


Рис. 3. Общий принцип дифференциации БТ: LP – линейная фазовая анизотропия (δ, α); LA – линейный дихроизм (P, θ); CA – циркулярный дихроизм (R); CP – циркулярная фазовая анизотропия (ϕ)

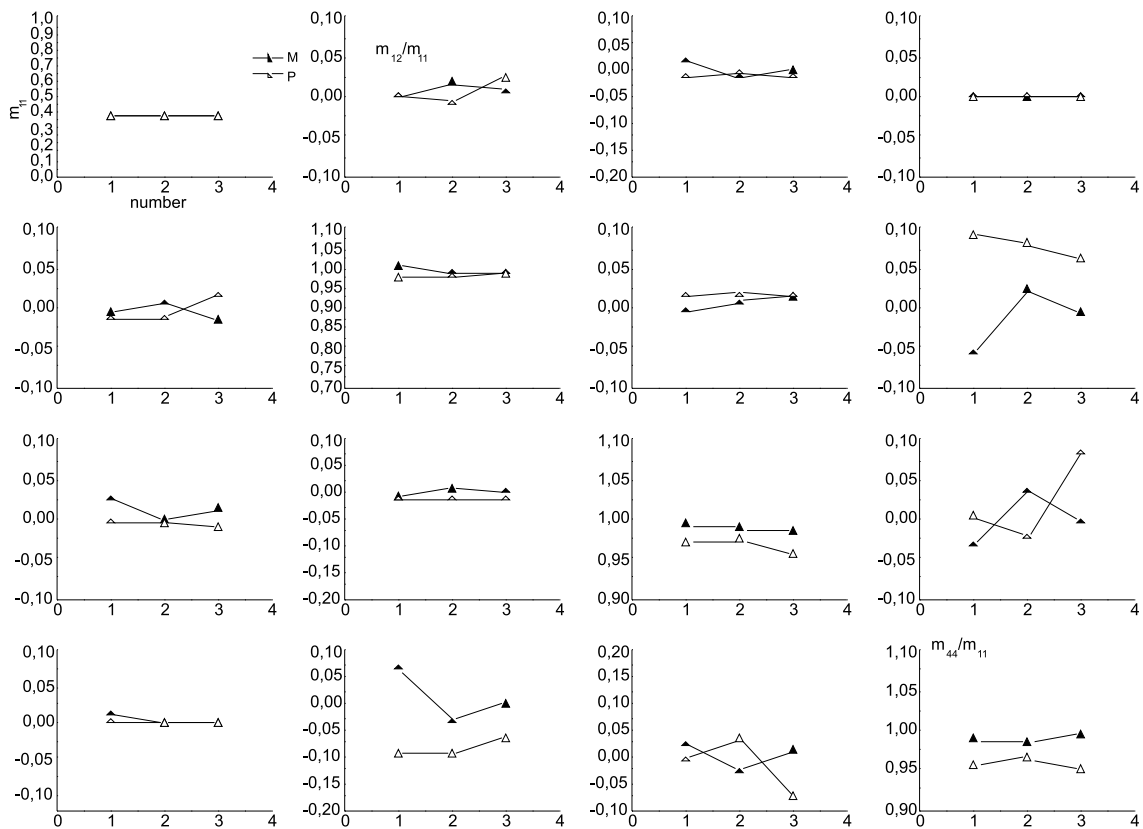


Рис. 4. Элементы экспериментальной матрицы Мюллера локальных участков эпидермиса

холой находились в пределах от 8 мм до 20 мм. Координатное перемещение в плоскости зондирования образцов осуществлялось с помощью микропозиционеров с шагом 50 мкм.

Результаты и их обсуждение

На рис. 4 представлены статистически усредненные по локальной области результаты измерений элементов матрицы Мюллера тонких (40 мкм) срезов эпидермиса кожи с меланомой (М) и папилломой (Р) для трех идентичных срезов (number 1-3)

в пределах области новообразований.

На рис. 5 показаны результаты рассчитанной энтропии H (по Клауду) образцов с меланомой (М) и папилломой (Р).

Из рис. 5 видно, что оба вида срезов проявляют незначительную деполаризацию (энтропию), величина которой одинаковая (в пределах погрешности) для папиллом и меланом. По этой причине для выбранной толщины образцов деполаризация не может быть характеристикой, позволяющей различить срезы между собой. Для более толстых срезов энтропия,

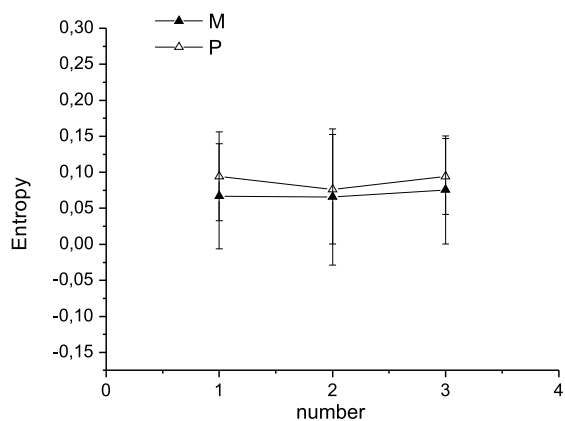


Рис. 5. Энтропия образцов

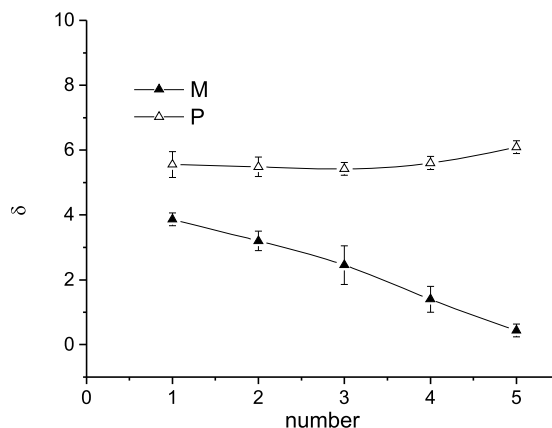


Рис. 7. Фазовый сдвиг для срезов эпидермиса толщиной 40 мкм

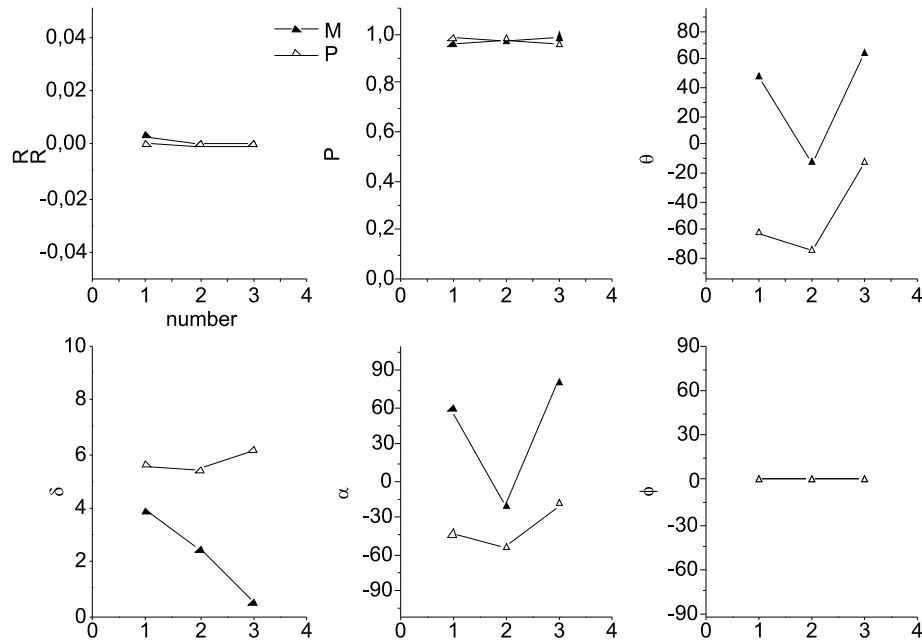


Рис. 6. Параметри анизотропії образців епідермиса 40 мкм (М – меланома, Р – папілома)

вероятно, может обнаружить более выраженные отличия для образцов с меланомой и папилломой.

Рассчитанные на основе предложенного метода статистически усредненные в пределах пораженной области локальные параметры анизотропии образцов, полученные после программной обработки по Клауду, представлены на рис. 6.

Из рис. 6 видно, что данные образцы относятся к объектам с линейной фазовой анизотропией, основным информативным параметром которых является фазовый сдвиг δ . Линейный и циркулярный дихроизм в образцах практически отсут-

ствуют. Более детальный анализ статистически усредненного по локальной области фазового сдвига на основе 5 идентичных срезов образцов представлен на рис. 7.

Таким образом, фазовый сдвиг находится в пределах $\delta=(5,42\div 6,09)^\circ$ для срезов с папилломой и $\delta=(0,43\div 3,86)^\circ$ для срезов с меланомой. Для дифференциации изменений используем нечеткий анализ на основе параметра δ в указанных пределах. Такой подход повысит чувствительность и специфичность метода диагностики меланомы кожи.

Литература

1. Зимняков Д. А. Дисперсионная зависимость оптической анизотропии и степени деполаризации фиброзных биотканей / Д. А. Зимняков, Г. В. Симоненко, В.В. Тучин // Оптический журнал. — 2010. — № 77(9). — С. 69—74.
2. Малишевская Н.П. Современные методы неинвазивной диагностики меланомы кожи Н.П. Малишевская, А.В. Соколова // Вестник дерматологии и венерологии. — 2014. — № 4. — С. 46—53.
3. Марьенко В. В. Представление произвольных матриц Мюллера в базисе матриц круговой и линейной анизотропии / В. В. Марьенко, С. Н. Савенков // Оптика и спектроскопия. — 1994. — Т. 76, №1. — С. 102—104.
4. Основи лазерної поляриметрії. Біологічні рідини / [Ушенко О.Г., Бойчук Т.М., Заболотна Н.І. та ін.]; під ред. О.Г. Ушенка, Т.М. Бойчука. — Чернівці: Чернівецький нац. ун-т, 2011. — 656 с.
5. Поляризаційна біопсія в режимі малократно-го розсіяння вперед: Сравнительный анализ патологий кожи человека. / Д.А. Зимняков, М.В. Алонова, Е.М. Решетникова и др. // Проблемы оптической физики и биофотоники. SFM-2013: материалы 17-й Междунар. молодежной науч. школы по оптике, лазерной физике и биофотонике. — Саратов : «Новый ветер», 2013. — С. 17-25.
6. Ротштейн А.П. Медицинская диагностика на нечеткой логике. Винница : Континент-ПРИМ, 1996. — 132с.
7. Системи лазерної відеополіариметрії для автоматизованого контролю параметрів неоднорідних біотканин : монографія / С. Є. Тужанський, Г. Л. Лисенко. — Вінниця : ВНТУ, 2010. — 159 с.
8. Тучин В. В. Исследование биотканей методами светорассеяния / В. В. Тучин // Успехи физических наук. — 1997. — Т. 167, № 5. — С. 517—539.
9. Фізичні основи поляриметрії високої інформативної здатності / Г.В. Бекетов, О.С. Клімов, І.Є. Матяш та ін.; під ред. Б.К. Сердеги. — К.: НТУУ «КПІ», 2013. — 252 с.
10. Cloude S. R. Concept of polarization entropy in optical scattering / S. R. Cloude, E. Pottier // Opt. Engineering. — 1995. — Vol. 34. — P. 1599—1610.

11. Mueller H. The foundations of optics / H. Mueller // J. Opt. Soc. — 1948. — No. 38. — P. 661—663.

N. Savenkov, V. V. Marienko // SPIE Proc. — 1995. — No. 2490. — P. 103—107.

12. Savenkov S. N. Classification and recognition method of objects based on their anisotropy properties / S.

МЕТОД І ПОЛЯРИМЕТРИЧНА СИСТЕМА ЛОКАЛЬНОЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ ПАТОЛОГІЙ АНІЗОТРОПНИХ БІОТКАНИН

¹Ровіра Р.У., ¹Тужанський С.Є., ²Савенков С.М., ¹Павлов С.В.,

²Чуніхіна О.І., ²Коломієць І.С., Клімов А.С.

¹Вінницький національний технічний університет,

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Розглянуто метод локальної поляриметричної диференціації патологічних змін анізотропних біотканин на основі аналізу параметрів анізотропії, що їх отримують в процесі оброблення експериментальних локальних матриць Мюллера досліджуваного зразка з урахуванням їх розкладення в базисі амплітудної і фазової анізотропії із використанням апарату нечітких множин. Для реалізації методу удосконалено систему адаптивної лазерної поляриметрії та її програмне забезпечення. Наведено результати експериментів, проведених на зразках шкіри людини із доброякісними (напілома) і злоякісними (меланома) утвореннями.

Ключеві слова: лазерна поляриметрія, біотканина, матриця Мюллера, лінійна анізотропія, фазова анізотропія, деполаризація.

METHOD AND POLARIMETRIC SYSTEM FOR LOCAL DIFFERENTIATION OF PATHOLOGIES IN ANISOTROPIC BIOTISSUE

¹Rovira R.H., ¹Tuzhanskyi S.Y., ²Savenkov S.M., ¹Pavlov S.V., ²Chunihina O.I., ²Kolomiets I.S., Klimov A.S.

¹Vinnitsia National Technical University,

²Taras Shevchenko National University of Kyiv

The method for local polarimetric differentiation of pathological changes in anisotropic biotissue is reviewed on the basis of anisotropy parameters analysis, that were obtained in the process of experimental local Mueller matrices treatment of the investigated sample taking into account their decomposition in the base of amplitude and phase anisotropy by means of fuzzy sets. In the realization of the method the system of adaptive laser polarimetry and software were improved. The results of the experiments conducted on the sample of skin with of benign (papilloma) and malignant (melanoma) are presented.

Keywords: laser polarimetry, biological tissue, Mueller matrix, linear anisotropy, phase anisotropy, depolarization.