

09.6

## Метод количественного описания фиксированных гистологических образцов с помощью цифровой голографической микроскопии

© А.В. Белашов, А.А. Жихорева

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: belashov.andrey.93@gmail.com

Поступило в Редакцию 2 декабря 2020 г.

В окончательной редакции 21 января 2021 г.

Принято к публикации 3 февраля 2021 г.

Разработаны методы количественного описания фиксированных гистологических образцов на основе статистического анализа фазовых изображений, полученных с помощью цифровой голографической микроскопии. Предложенный подход позволяет проводить полностью автоматизированную обработку восстанавливаемых фазовых изображений и получать количественную информацию об оптических характеристиках и размерах структурных элементов ткани гистологического образца. Метод апробирован на трех гистологических образцах разных типов тканей: цилиарном цилиндрическом эпителии, эластичном хряще и печени.

**Ключевые слова:** голографическая микроскопия, фазовые изображения, гистологические образцы.

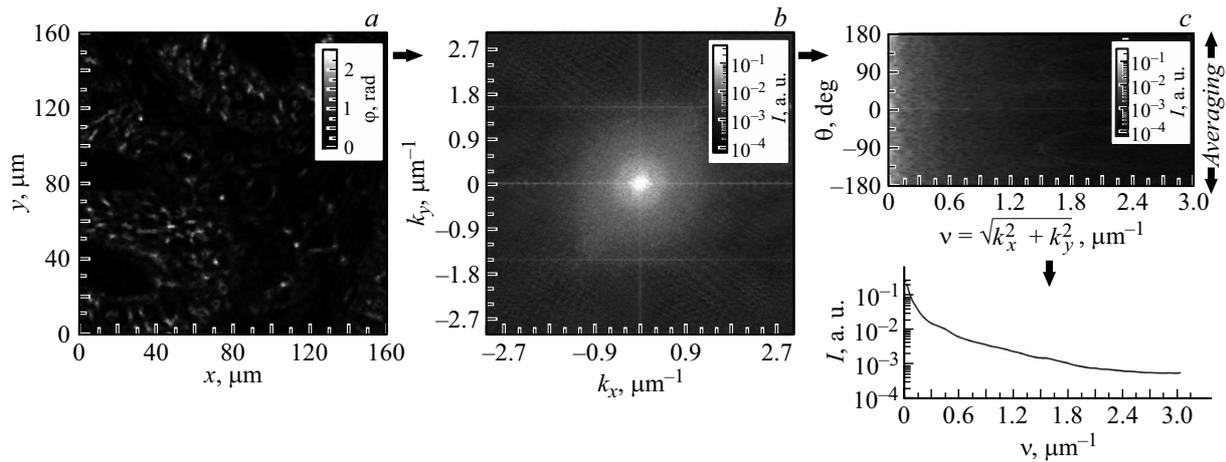
DOI: 10.21883/PJTF.2021.09.50901.18641

В настоящее время методы цифровой голографической микроскопии активно используются во многих исследованиях, направленных на определение оптических и морфологических параметров живых клеток и их изменений в ходе внешнего воздействия. Помимо фундаментальных исследований отклика живых клеток *in vitro* [1,2] методы голографической микроскопии также применяются и в клинических исследованиях [3,4]. В подавляющем большинстве таких работ измеряются оптические и морфологические параметры клеток моно-слоя, в котором на восстановленном фазовом изображении отдельные клетки можно легко выделить методами автоматической или ручной сегментации [5]. Исследование срезов тканей методами голографической микроскопии сопровождается значительными трудностями при обработке и анализе регистрируемых распределений интегрального фазового набег в связи с наложением нескольких слоев клеток, что препятствует их сегментации. Поэтому сегодня в литературе представлено относительно мало работ, посвященных голографическому исследованию гистологических препаратов. При применении метода цифровой голографической микроскопии для исследования срезов тканей в основном ограничиваются качественным описанием их фазовых изображений без вычисления количественных параметров [6] или в предположении одинаковой толщины образца оценивают единственный численный параметр — средний показатель преломления [7]. В связи с этим дальнейшее развитие голографических методов исследования гистологических образцов требует разработки новых алгоритмов количественного анализа их фазовых изображений.

В настоящей работе представлены результаты разработки и апробации метода количественного описания гистологических образцов различных тканей, в основе которого лежит статистический анализ параметров фазовых изображений, полученных с помощью цифровой

голографической микроскопии. Основными отличительными особенностями гистологических образцов, препятствующими использованию традиционных алгоритмов обработки, являются наложение нескольких слоев клеток и сильная разупорядоченность расположения внутриклеточных структур. При этом для одного типа ткани характерные размеры и показатель преломления внутриклеточных структур в разных областях образца остаются постоянными. В связи с этим именно статистические параметры, зависящие от распределения показателя преломления и размеров структурных элементов клеток ткани, могут быть успешно использованы для количественного описания гистологических образцов, что в дальнейшем может применяться для разделения нормальных и патологических тканей.

Для регистрации внеосевых цифровых голограмм исследуемых образцов и восстановления их фазовых изображений использовалась экспериментальная установка, основанная на интерферометре Маха—Цендера, с использованием He—Ne-лазера ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) в качестве источника излучения и микроскопической системы в предметном плече с числовой апертурой 0.45, обеспечивающей пространственное разрешение около  $0.8 \mu\text{m}$ . Для регистрации внеосевых цифровых голограмм с углом между предметной и опорной волнами  $2^\circ$  использовалась камера MD-USB121GM-T (MDvision Technology, Китай) с размером пикселя  $3.75 \mu\text{m}$ . Схема экспериментальной установки и методы восстановления фазовых изображений описаны в ранее опубликованной нами работе [4]. В связи с неравномерным распределением срезов ткани по предметному стеклу на первом этапе происходил отбор только тех фазовых изображений, в которых объект занимал не менее 60% поля зрения. Предлагаемый нами новый метод анализа распределения интегрального фазового набег  $\varphi_{int}(x, y)$  не требует сегментации отдельных клеток. Для выявления различий между гистологическими образцами и возможности



**Рис. 1.** Алгоритм определения усредненной по угловой координате зависимости интенсивности от пространственной частоты  $I(v)$ . *a* — пример исходного фазового изображения  $\varphi(x, y)$  гистологического образца ткани цилиндрного цилиндрического эпителия; *b* — интенсивность двумерного фурье-преобразования исходного фазового изображения  $I(k_x, k_y)$ ; *c* — представление спектра пространственных частот в полярных координатах  $I(v, \theta)$  и результат усреднения зависимости по угловой координате. Для наглядности значение интенсивности  $I$  на частях *b* и *c* представлено в логарифмических шкалах.

сопоставления количественных характеристик разных типов тканей было выделено несколько статистических распределений, связанных с размерами и оптическими свойствами внутриклеточных структур.

Первым из анализируемых параметров является статистическое распределение фазового набега  $S(\varphi)$ , внесенного гистологическими срезами ткани в проходящий волновой фронт. Учитывая фиксированную толщину гистологического образца, задаваемую при его подготовке на микротоме, а также известный показатель преломления фиксирующего вещества, полученное распределение фазового запаздывания можно интерпретировать как статистическое распределение интегрального показателя преломления в образце.

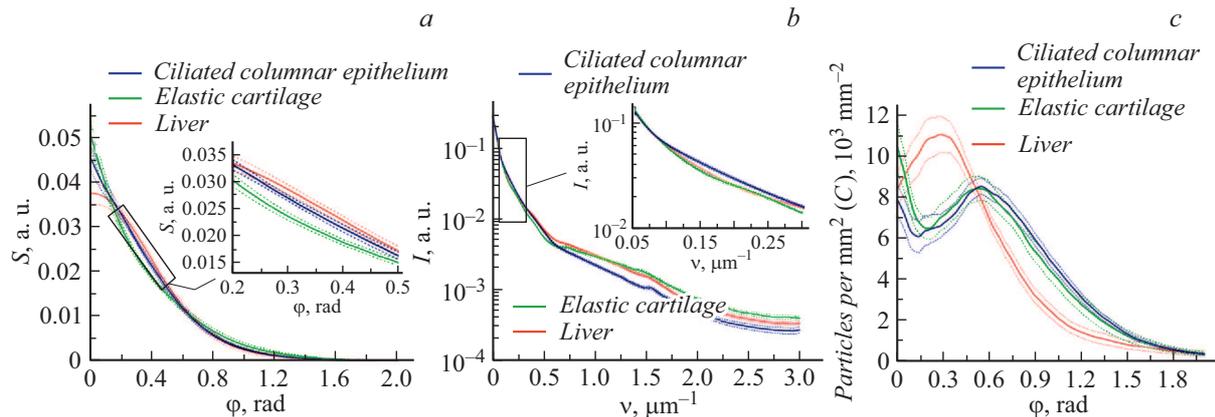
Вторая функция, характеризующая размеры внутриклеточных структур, может быть получена благодаря анализу спектра пространственных частот фазового распределения гистологического образца (рис. 1, *a*), вычисляемого с помощью двумерного фурье-преобразования (рис. 1, *b*), по аналогии с тем, как это было предложено в работе [8]. Представление спектра пространственных частот в полярных координатах и усреднение по угловой компоненте позволяют построить зависимость интенсивности от модуля радиуса-вектора в фурье-пространстве для исследуемого типа образца  $I(v)$  (рис. 1, *c*). Переход в полярные координаты и усреднение по угловой компоненте  $\theta$  позволяет устранить влияние разной ориентации гистологических структур в различных полях зрения. Такой график можно интерпретировать как относительный вклад структурных компонентов различного размера, выраженного в обратных единицах, в формирование фазового изображения. Так, например, для образцов с большим количеством мелких структурных элементов интенсивность высоких пространственных частот окажется выше, что может быть использовано для оценки концентрации структур разного размера.

Третьим параметром, используемым для описания гистологических образцов, является концентрация от-

дельных структур  $C(\varphi)$ , вносящих фазовый набег выше определенного порогового значения  $\varphi$ . В исследуемом изображении сначала выделяются лишь те пиксели, в которых интегральный фазовый набег превышает значение  $\varphi$  ( $\varphi_{int}(x, y) > \varphi$ ). После этого с помощью алгоритмов морфологического анализа вычисляется количество замкнутых непересекающихся областей на единицу площади  $C(\varphi)$ . Такой анализ, проведенный для дискретного набора значений фазового запаздывания  $\varphi = [0; \varphi_{max}]$  rad, позволяет построить и проанализировать функциональную зависимость  $C(\varphi)$ , отражающую как геометрические, так и оптические свойства внутриклеточных структур исследуемого типа ткани.

Выбор именно этих трех параметров для количественного описания фазовых изображений гистологических образцов обусловлен возможностью исследования как оптических характеристик внутриклеточных структур, так и их типичных поперечных размеров, что позволяет надежно разделять разные типы тканей. Для получения достоверной информации об анализируемом образце указанные три характеристики должны быть усреднены по нескольким десяткам фазовых изображений гистологического образца в различных полях зрения. Полученные характеристики могут быть представлены в виде одномерных массивов и сопоставлены с параметрами контрольного образца или ткани другого типа для их последующего сравнительного анализа или классификации.

Указанные выше характеристики были использованы для анализа фазовых изображений гистологических образцов тканей цилиндрного цилиндрического эпителия, эластичного хряща и печени толщиной  $12 \mu\text{m}$  (Vic-Science, Китай). В ходе мониторинга каждого образца проводились анализ и усреднение по 40 фазовым изображениям для определения характеристик  $S(\varphi)$ ,  $I(v)$ ,  $C(\varphi)$ . Как видно из представленных результатов (рис. 2), исследованные образцы обладают разными оптическими параметрами и структурными особенностями.



**Рис. 2.** Результаты измерения выделенных характеристик трех гистологических образцов: тканей печени, цилиарного цилиндрического эпителия и эластичного хряща. *a* — статистическое распределение фазового набегу, внесенного тканью в проходящий волновой фронт  $S(\varphi)$ ; *b* — усредненная по угловой координате зависимость интенсивности от пространственной частоты  $I(v)$ ; *c* — концентрация внутриклеточных структур  $C(\varphi)$ , вносящих фазовый набег выше определенного порогового значения  $\varphi$ . Жирными сплошными линиями показаны зависимости исследуемых параметров, усредненные по выборке из 40 фазовых изображений, тонкими пунктирными линиями обозначена стандартная ошибка среднего с доверительным интервалом 68%.

ми, что позволяет с помощью предложенных количественных характеристик надежно различить эти три типа тканей.

Так, например, образец ткани цилиарного цилиндрического эпителия обладает высоким количеством структурных компонентов сравнительно большого размера, что проявляется в большой интенсивности низких пространственных частот. При этом в ткани эластичного хряща наблюдается обратная ситуация: большое количество мелких структурных элементов приводит к увеличению интенсивности высоких пространственных частот (рис. 2, *b*). В то же время гистологические срезы ткани печени имеют сравнительно небольшое количество отдельных структурных компонентов с высоким фазовым набегом (и показателем преломления), что можно видеть из рис. 2, *c*. При этом важно отметить, что для наиболее полного описания гистологических тканей и возможности их надежного автоматического распознавания необходимо использовать все три указанные характеристики. Так, например, ткани цилиарного цилиндрического эпителия и эластичного хряща невозможно распознать при анализе лишь их зависимости  $C(\varphi)$ , в то же время надежное разделение образцов возможно при анализе двух других характеристик:  $S(\varphi)$  и  $I(v)$ .

Одним из важных преимуществ предложенного алгоритма является возможность полной автоматизации процесса обработки данных, что позволяет анализировать образец менее чем за минуту. Кроме того, разработанный метод количественного описания гистологических препаратов с помощью цифровой голографической микроскопии может быть использован для распознавания патологий в образцах тканей, что может найти широкое применение в клинической практике. Представленный метод позволяет достаточно полно характеризовать фазовые изображения гистологических образцов и определять их количественные параметры для описания свойств различных типов тканей, что может быть использовано для их автоматического распознавания с помощью алгоритмов машинного обучения.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов исследования.

#### Финансирование работы

А.В. Белашов благодарит Совет по грантам Президента РФ за финансовую поддержку (проект СП-2349.2019.4).

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### Список литературы

- [1] W.J. Choi, D.I. Jeon, S.G. Ahn, J.H. Yoon, S. Kim, B.H. Lee, *Opt. Express*, **18** (22), 23285 (2010). DOI: 10.1364/OE.18.023285
- [2] A.V. Belashov, A.A. Zhikhoreva, T.N. Belyaeva, N.N. Nikolsky, I.V. Semenova, E.S. Kornilova, O.S. Vasyutinskii, *Biomed. Opt. Express*, **10** (10), 4975 (2019). DOI: 10.1364/BOE.10.004975
- [3] H.V. Pham, L. Pantanowitz, Y. Liu, *Cancer Cytopathol.*, **124** (9), 641 (2016). DOI: 10.1002/cncy.21734
- [4] A.A. Zhikhoreva, A.V. Belashov, V.G. Bepalov, A.L. Semenov, I.V. Semenova, G.V. Tochilnikov, N.T. Zhilinskaya, O.S. Vasyutinskii, *Biomed. Opt. Express*, **9** (11), 5817 (2018). DOI: 10.1364/BOE.9.005817
- [5] А.В. Белашов, Д.А. Горбенко, А.А. Жихорева, Т.Н. Беляева, Е.С. Корнилова, И.В. Семенова, О.С. Васютинский, *Письма в ЖТФ*, **45** (22), 24 (2019). DOI: 10.21883/PJTF.2019.22.48644.17980
- [6] Y. Zhang, K. de Haan, Y. Rivenson, J. Li, A. Delis, A. Ozcan, *Light: Sci. Appl.*, **9** (1), 78 (2020). DOI: 10.1038/s41377-020-0315-y
- [7] P. Lenz, D. Bettenworth, P. Krausewitz, M. Brückner, S. Ketelhut, G. von Bally, D. Domagk, B. Kemper, *Integr. Biol.*, **5** (3), 624 (2013). DOI: 10.1039/c2ib20227a
- [8] N. Lue, J. Bewersdorf, M.D. Lessard, K. Badizadegan, R.R. Dasari, M.S. Feld, G. Popescu, *Opt. Lett.*, **32** (24), 3522 (2007). DOI: 10.1364/OL.32.003522