

УДК 517:533:620:621.372

Малоракурсная оптическая 3D-микротомография клеточных структур

О. В. Филонин

Самарский государственный аэрокосмический университет,
Российская Федерация

Резюме

В работе описаны предложенные автором методы, алгоритмы и пример аппаратной реализации для трехмерной реконструкции конфигурации клеточных структур на основе малоракурсного томографического подхода для задач оптической микроскопии. Для формирования исходных двумерных проекционных данных предложено использовать одномодовое лазерное излучение. Теневые изображения проекций фиксируются двухкоординатными детекторами на основе ПЗС-структур. Предварительная обработка данных осуществляется с помощью микропроцессорных контроллеров. Процедуры томографической реконструкции организованы на стандартных ПК или локальных сетях. Отображение данных производится в виде проекционных, или стереоскопических, также проекционных изображений, позволяющих наблюдать исследуемые объекты в любых ракурсах. Результаты математического моделирования предложенных алгоритмов реконструкции показали, что они достаточно эффективны, с точки зрения быстродействия и представления данных.

Ключевые слова: малоракурсная томография, микротомография, оптическая микроскопия, пространственная конфигурация клеточных структур, Фурье-преобразования, проекционные изображения, объемные изображения.

Клин. информат. и Телемед.
2009. Т.5. Вып.6. с.31–37

Введение

В настоящее время, со стороны микробиологии, медицины проявляется большой интерес к исследованиям связанным с анализом пространственной конфигурации клеточных, молекулярных структур [1, 2]. Это обусловлено тем, что именно форма самой клетки, ее ядро в первую очередь реагируют на воздействия химических соединений, внешнего электромагнитного излучения и пр. К сожалению, для 3D анализа клеточных структур, их взаимного расположения и т. д., сегодня исследователи вынуждены использовать системы бинокулярной микроскопии, снабженные фото и кинокамерами, подключенными к ПК [3]. Однако такой подход позволяет получить лишь псевдо трехмерную информацию об исследуемых объектах [4], в ограниченных ракурсах наблюдения, что значительно снижает эффективность и достоверность анализа.

Методы

Автором разработан ряд методов и систем малоракурсной трансаксиальной компьютерной микротомографии для исследования 3D конфигурации клеточных образования, позволяющих кардинально решить данную задачу и предложить исследователям *действительно трехмерную информацию* об исследуемых объектах с возможностью наблюдения в *любом ракурсе* объемных изображений.

В основу предлагаемых методов реконструкции истинной 3D конфигурации исследуемых клеточных структур положены способы решения обратной задачи Радона в приближениях использующих методику Фурье синтеза, свойства интеграла свертки, процедуры доопределения недостающих данных с помощью методов интерполяции по сферическим гармоникам в пространстве – Фурье.

Результаты собственных исследований

Суть предлагаемого подхода можно свести к следующим основным положениям:

1. Одномодовое лазерное излучение

Как известно, радоновский образ, который можно определить как

$$\Re[f(\vec{x})] = \int_0^{2\pi} d\theta \int_{-\infty}^{\infty} f(\vec{x}) \delta(\vec{x} - \vec{n}\vec{r}) d\vec{r}, \quad (1)$$

(здесь $f(\vec{x})$ – искомая функция распределения, \vec{x} – вектор определяющий мерность пространства, в данном случае подразумевается трехмерное пространство – x_1, x_2, x_3 удовлетворяющее евклидовой метрике, $\vec{n}\vec{r}$ – опреде-

ляет взаимосвязь между полярными (сферическими) и декартовыми координатами). Выражение (1) предполагает, что регистрируемые данные $\Re[f(\vec{x})]$ должны удовлетворять условию линейности в виде

$$\int_{-\infty}^{\infty} f(\vec{x}) \delta(\vec{x} - \vec{n}\vec{r}) d\vec{r}_\theta.$$

Изображения, формируемые в оптической микроскопии, данному условию не удовлетворяют совершенно. Это объясняется тем, что регистрируемые теневые изображения, характеризуются широким спектром излучения, содержат компоненты многократно рассеянного излучения от различных слоев, существенный вклад вносят искажения оптических систем и пр. С целью выполнения условия (1) автором предложено применять, для формирования исходных проекционных данных $\Re[f(\vec{x})]$, одномодовое лазерное излучение, с длиной волны, при которой за счет нерассеянного потока фотонов можно получить достаточно контрастное теневое изображение, в достаточно широком динамическом диапазоне. Это будет справедливо при условии, что рассеянные и поглощенные компоненты не регистрируются матричными фотодетекторами. То есть для «узкого луча», в плоско-параллельной геометрии просвечивания должно выполняться условие:

$$g_{r,\theta;\varphi} = I_0 e^{-\int_{-\infty}^{\infty} \xi(\vec{r}) d\vec{r}_{\theta;\varphi}} \approx \Re[f(\vec{x})], \quad (2)$$

здесь $\xi(\vec{r})$ – линейный коэффициент ослабления моноэнергетического узкого пучка в материале просвечиваемого объекта.

2. Просвечивание исследуемого среза биологической ткани

Просвечивание исследуемого среза биологической ткани осуществляется в нескольких ракурсах в соответствии с геометрией представленной на рис. 1 а, б. Процедуру зондирования образца можно организовать несколькими способами в зависимости от «сложности» конфигурации исследуемых клеточных структур, задаваемой точности 3D-реконструкции. В простом – планарном варианте выбирается три или пять ракурсов просвечивания, таким образом, чтобы главные оси зондирующих лучей находились в

одной плоскости. Для расширения объема исходных данных целесообразно организовать дискретные повороты плоскости планшайбы с закрепленным в ней срезом ткани относительно оси ортогональной направлению центрального ракурса. При необходимости увеличить достоверность реконструкции 3D конфигурации исследуемых структур, целесообразно использовать геометрию сканирования представленную на рис. 1 б. В этом случае оси зондирующих пучков распределяются по конической поверхности. Следует отметить, что исследуемая область выбирается в заданном слое среза биологической ткани, за счет выбора соответствующих значений фокусных расстояний с помощью фокусаторов – 7 (рис. 1 а).

3. Приемники оптических потоков

Приемниками оптических потоков прошедших через исследуемые области среза являются модифицированные оптические системы микроскопа, состоящие из короткофокусных объективов – 9 и проецирующих окуляров – 10. Последние проецируют двумерные изображения проекций на матричные фотодетекторы – 11.

4. Матричные фотодетекторы

Матричные фотодетекторы состоят из волоконных планшайб – 12 (рис. 1 а), служащих для выборки плоскопараллельного потока фотонов из падающего пучка излучения, микроканальных усилителей интенсивности – 13 и двухкоординатных ПЗС – матриц – 14.

5. Обработка данных

Для обработки данных в каждом канале служат микропроцессорные контроллеры, которые выполняют следующие операции: оцифровка входных двумерных сигналов проекций, формирование «квадратных» матриц задаваемого разрешения, переопределение исходных данных из декартовой сетки в полярную. Таким образом, исходные 2D-массивы оказываются определенными в виде одномерных массивов заданных по соответствующим диаметрам круга единичного диаметра см. рис. 1 в. Далее, эти массивы с помощью проце-

дур опроса, производимых процессором персонального компьютера (ПК), передаются в устройства накопления ПК, процессор которого производит дальнейшую обработку информации. Сопряжение с шиной данных ПК производится через PCI разъем, то есть контроллер выполняется в виде функциональной платы ПК – это целесообразно реализовывать при малом количестве исходных ракурсов, не более трех. Более удобным оказывается способ передачи данных через USB порты. Структурная схема микропроцессорного контроллера для выполнения указанных операций изображена на рис. 2 а.

6. Вычисления

С помощью процессора (процессоров) ПК (целесообразно использовать МВ с несколькими процессорами, либо многоядерные процессоры), осуществляется выполнение следующих процедур. Вычисляются одномерные преобразования Фурье от одномерных массивов определенных на диаметрах единичных кругов определенных в полярных система координат. Далее формируются 2D-Фурье образы, которые также оказываются заданными на кругах единичного радиуса. С учетом геометрии получения исходных двумерных проекций, реализованной фактически в сферической системе координат, т. е. учитывая значения углов (φ, ν_i) , производится формирование 3D спектра Фурье, представленного пока, с учетом теоремы о центральном сечении, в виде набора кругов «полярных» отсчетов ориентированных друг относительно друга под такими же углами.

7. Дискретный 3D Фурье образ

Так как сформированный таким образом дискретный 3D Фурье образ оказывается существенно недоопределенным, «заполненными» оказываются только области в нескольких телесных углах (пространственных 3D-секторах), соответствующих геометрии получения проекционных данных, необходимо выполнить процедуры доопределение данных. Такие процедуры выполняются, с учетом свойств симметрии самого 3D Фурье-спектра, свойств симметрии исследуемых объектов, ожидаемой точностью реконструкции, задаваемым разрешением при отображении информации, с помощью методов интерполяции. Сами процедуры интерполяции выполняются по кольцевым гармоникам 3D Фурье-спектра [5].

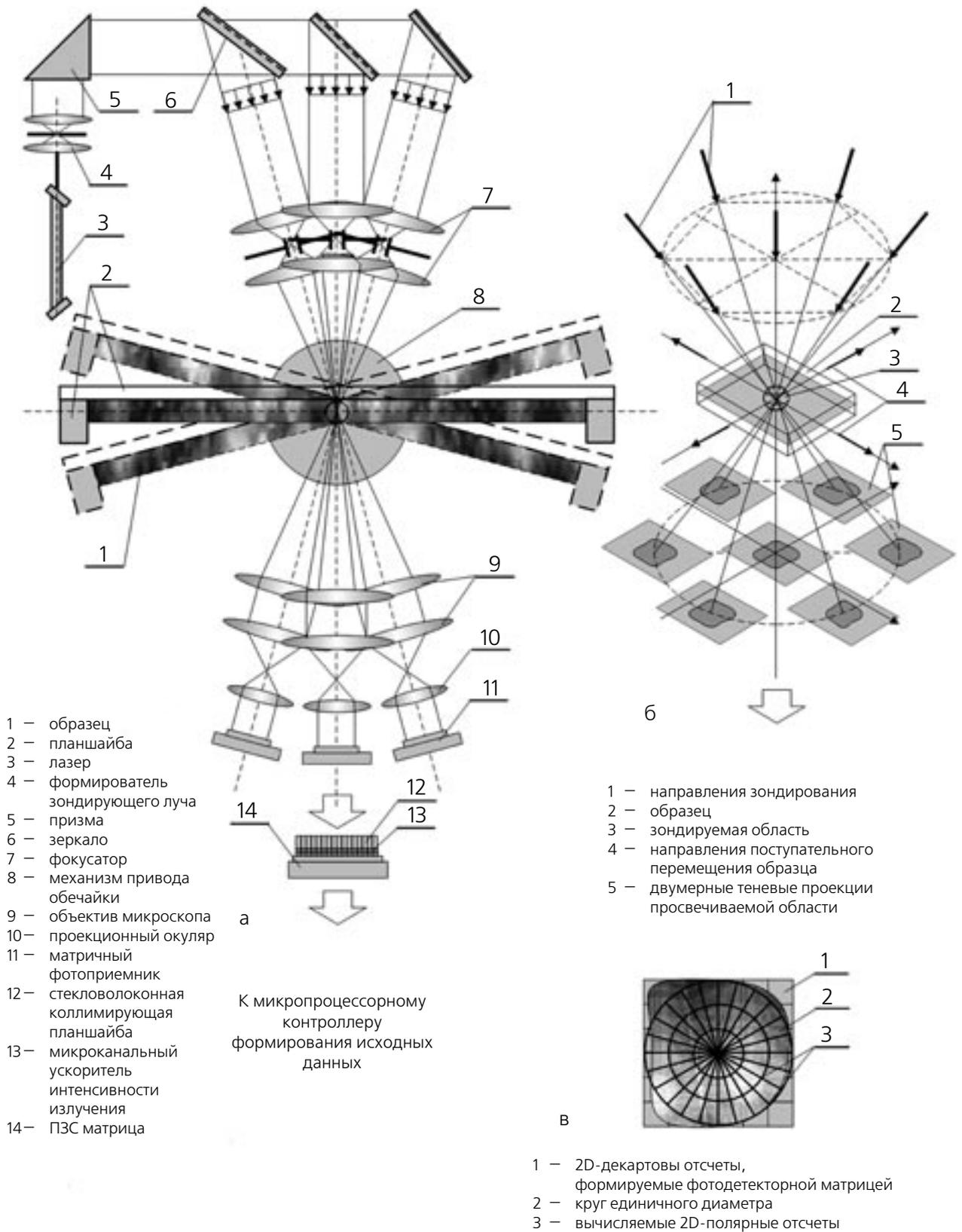
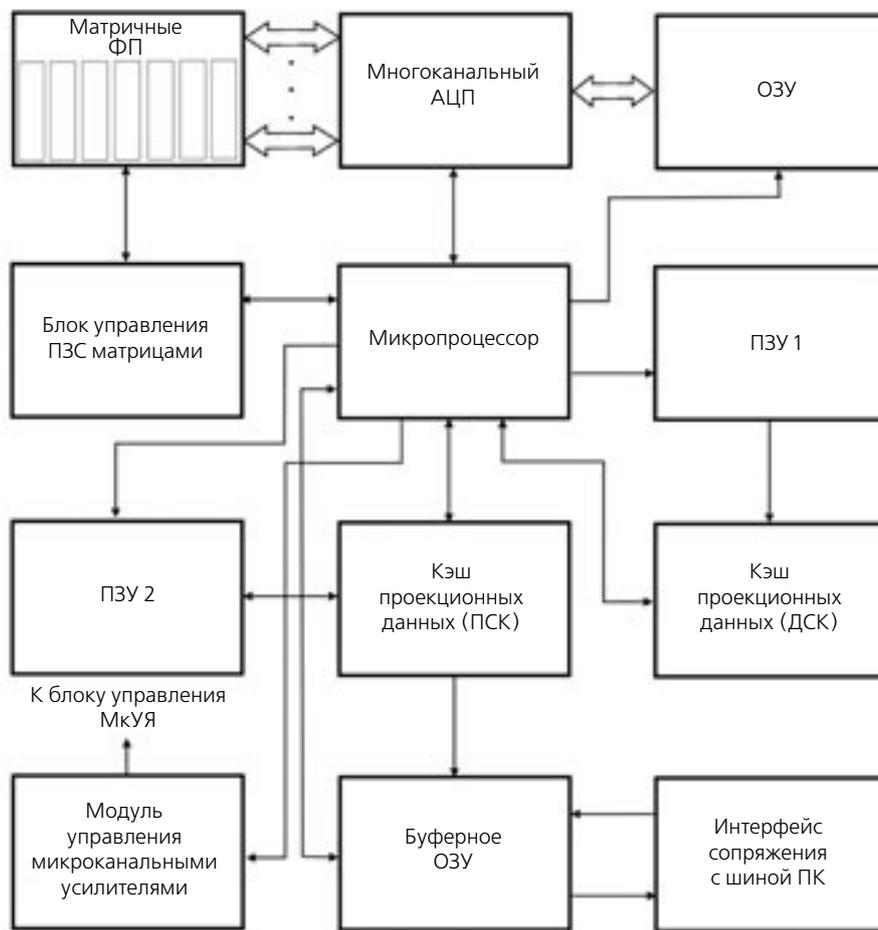
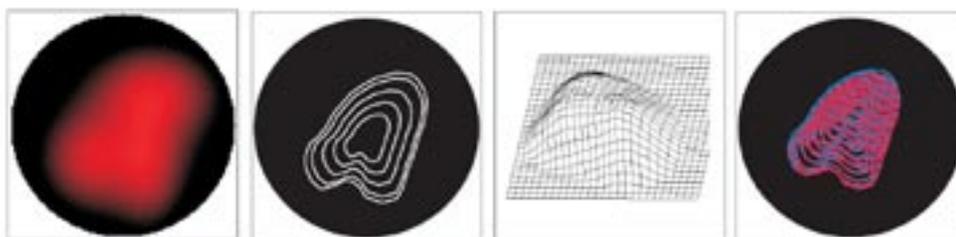


Рис. 1. Оптическая схема сбора исходных проекционных данных при оптической малоракурсной 3D микротомографии.



а



б

Рис. 2. Структурная схема микропроцессорного контроллера для предварительной обработки данных.

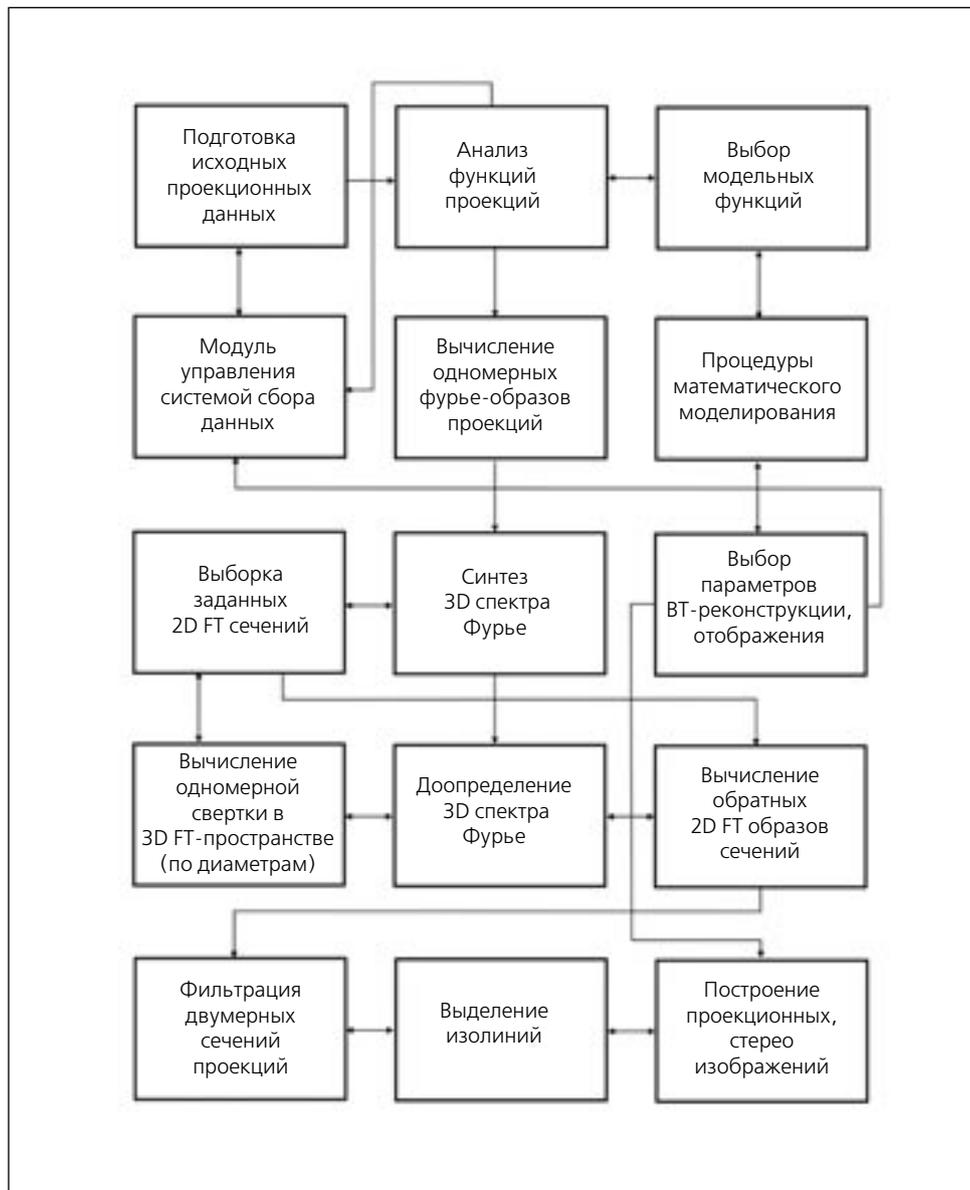


Рис. 3 Структура пакета прикладных программ для 3D реконструкции конфигурации поверхностей клеточных структур

8. Повышение точности последующих этапов

Таким образом, после выполнения интерполяционных процедур мы имеем дискретный 3D образ Фурье, определенный в сферической системе координат, т. е.

$$F(g(r, \theta, \varphi)) =$$

$$\int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} g(r, \theta, \varphi) e^{-[2\pi i R^2 r^2 \cos(\varphi - \theta)]} \times$$

$$R^2 \cos \theta dR d\theta d\varphi$$

(3)

Согласно теореме о центральном сечении его можно с достаточной степенью точности считать Фурье образом исследуемой области сечения. Для повышения точности последующих этапов реконструкции целесообразно произвести «фильтрацию» радиальных (одномерных) составляющих 3D дискретного Фурье-образа, т. е. выполнить операцию $F_C(R) = F(R)F_R(R)$. Подбор функции фильтра $F_R(R)$ производится в классе функций вида

$$F_R(R) = R^2 \int A e^{\frac{BR^2}{C}} dR,$$

здесь A, B, C — const, при выполнении полного цикла модельного эксперимента.

Это позволит снизить вклад погрешностей полученных на этапах пересчета данных из декартовой сетки в полярную сетку и переопределения форматов двумерных массивов и пр. Для реконструкции искомой функции распределения отображающей трехмерную информацию об исследуемой области среза биологической ткани, можно конечно выполнить процедуру обратного 3D Фурье преобразования для функции $F_C(R)$. Но это делать нецелесообразно по следующим причинам: для реализации такой процедуры необходимо привлечь значительные вычислительные мощности, как минимум придется организовать процесс распределенных вычислений

в локальной сети. С другой стороны в этом нет никакой необходимости, так как в настоящее время не существует программного обеспечения отображения 3D объектов в виде, например, полупрозрачных цветных изображений в соответствующих областях пространства в зоне отображения 3D дисплеев, что, кстати, также требует больших вычислительных мощностей.

9. Решение задачи трехмерного отображения конфигурации исследуемых объектов

Для решения задачи трехмерного отображения конфигурации исследуемых объектов автор предлагает следующий подход. В большинстве практических случаев для исследователя важной оказывается информация о форме, какой то определенной области исследуемого объекта, например, форме поверхности клетки. То есть задача, таким образом, может быть сведена к задаче отображения поверхностей. Поверхность в свою очередь может быть представлена в виде сетки сформированной из данных небольшого числа сечений. Каждое двухмерное сечение 3D объекта находится из соответствующего сечения 3D Фурье-образа после выполнения процедуры обратного двумерного Фурье преобразования. Как показывает практика, достаточно выбрать порядка 20 параллельных друг другу сечений. На каждом таком сечении необходимо выполнить процедуры выделения изолиний соответствующих одинаковым значениям коэффициентов поглощения [6], выбрать из них изолинии соответствующие поверхности объекта. Далее используя алгоритмы стереоскопического представления информации в проекционном виде вычислить стереопары изображений (или просто проекционные изображения) поверхностей исследуемых объектов. При желании можно произвести «раскрашивание» полученных поверхностей, смоделировать эффекты их освещения от одного или нескольких источников и т. д., программное обеспечение для такого рода процедур весьма многообразно. В действительности, как показывает практика исследований целесообразно ограничиться «сетчатым» отображением поверхностей, что дает возможность наблюдать фактически «переднюю» и «заднюю» поверхности

объекта при произвольных ракурсах. Это особенно удобно при наблюдении объектов в динамике.

На рис. 3 представлена структурная схема пакета программного обеспечения для выполнения этапов малоракурсной томографической реконструкции рассмотренных в п.п. 6–9. Пакеты такого рода целесообразно «собирать» из отдельных функциональных модулей созданных применительно к данному типу экспериментов, выполняющих конкретные процедуры. Это позволяет во первых эффективно оптимизировать процедуры взаимодействия между отдельными модулями, а во вторых значительно упрощается процедура модернизации как отдельных модулей так и всего пакета в целом. На рис. 2. б схематически показаны отдельные этапы процедуры малоракурсной ВТ-реконструкции 3D конфигурации исследуемых объектов в результате подбора модельной функции при организации полного цикла математического моделирования [7]. Такой процесс является необходимым этапом, так позволяет выбрать оптимальные параметры и условия для систем сбора исходных данных, процедур дискретизации, фильтрации, вычисления недостающих проекций или отсчетов в них 3D реконструкции и отображения. Кроме того процедуры полного математического моделирования процесса малоракурсной ВТ реконструкции позволяют определить методические погрешности алгоритма в целом и отдельных этапов восстановления.

Заключение

Предложенный подход дает возможность получить действительно трехмерную информацию о структуре исследуемых биологических объектов и представить ее в наглядном виде. Процедуры вычисления — расчет прямых и обратных ФТ, определение недостающих данных и т. д., при этом в основном связаны с обработкой одномерных массивов данных, за исключением ограниченного количества двумерных сечений для формирования поверхностей в виде изолиний. Для ускорения процедур обратного 2D ФТ необходимых для восстановления ряда поперечных сечений целесообразно в конце процедуры формирования 3D Фурье-образа ограничиться форматом (512 x 512 x 512) элементов. Этот же формат желательнее оставить и для процедур отображения поверхностей, он, как показала практика

исследований, оказывается оптимальным. «Глубина объема» в этом случае может достигать 0,3 м, при использовании стандартных 17" мониторов, практически без потери качества отображения.

Выводы

1. Предлагаемый подход значительно ускоряет процедуры вычисления.
2. Дает возможность использовать для их реализации стандартные ПК, простейшие локальные сети, то есть упрощает конструкцию системы в целом.
3. Позволяет использовать системы такого рода в обычных лабораториях медико-биологического профиля.
4. Программное обеспечение, систем такого рода ориентировано на OS LINUX, но может быть реализовано для семейства OS WINDOWS класса NT.

Литература

1. Kaupp G., Hermann A., Wagenblast G. Scanning near-field optical microscopy (SNOM) with uncoated tips – applications in fluorescence techniques and Raman spectroscopy // Proc. of the SPIE, 1999. Vol. 3607. P. 16–25. – (electronic version at <http://kaupp.chemie.uni-oldenburg.de>).
2. Design of functionalized lipids and evidence for their binding to photosystem II core complex by oxygen evolution measurements, atomic force microscopy, and scanning near-field optical microscopy / E. Trudel, J. Gallant, S. Mons et al. // Can. Biophys. J., 2001. Vol. 81. P. 563–571.
3. Подосинников И. В., Нилова Л. Г., Бабиченко И. В. // Лабораторное дело. 1981. №8. с. 68.
4. Dufrene Y.F. // Micron. 2001. V.32. p. 153.
5. Филонин О. В., Шадронов А. А. Цифровые методы обработки в компьютерной томографии, Труды международного симпозиума «Надежность и качество» 2004, Пенза, с. 257–259.
6. Филонин О. В., Шадронов А. А. Методы 3D визуализации внутренней структуры физических объектов по данным 2D томограмм, Труды международного симпозиума «Надежность и качество» 2004, Пенза, с. 255–257.
7. Филонин О. В. Малоракурсная ВТ диагностика структуры материалов в условиях тепловых нагрузок. Труды международного симпозиума «Надежность и качество» 2003, Пенза, с. 338–343.

Only a few projection optical 3D — a micro tomography of cellular structures

O. V. Phylonin

*The Samara state space university,
Russian Federation*

Abstract

In work the methods offered by the author, algorithms and an example of hardware realization for three-dimensional reconstruction of a configuration of cellular structures on the basis of only a few projection tomography the approach for problems of optical microscopy are described. For formation of initial bidimensional projective data it is offered to use coherent laser radiation. Shadow images of projections are fixed by two-coordinate detectors on the basis of CCD — detectors structures. Preliminary data processing is carried out by means of microprocessor controllers. Procedures tomografической reconstruction are organized on standard personal computers or local networks. Display of data is made in the form of projective, or three-dimensional, also the projective images, allowing to observe investigated objects in any foreshortenings. Results of mathematical modeling of the offered algorithms of reconstruction have shown, that they are effective enough, from the point of view of speed and data presentation.

Keywords: only a few projection tomography, a micro tomography, optical microscopy, a spatial configuration of cellular structures, Fourier — transformations, projective images, volumetric images.

Малоракурсна оптична 3D-мікротомографія клітинних структур

О. В. Філонін

*Самарський державний аерокосмічний
університет, Російська Федерація*

Резюме

У роботі описані запропоновані автором методи, алгоритми і приклад апаратної реалізації для тривимірної реконструкції конфігурації клітинних структур на основі малоракурсного томографічного підходу для задач оптичної мікроскопії. Для формування вихідних двовимірних проєкційних даних запропоновано використовувати однододове лазерне випромінювання. Тіньові зображення проєкцій фіксуються двокоординатними детекторами на основі ПЗС-структур. Попередня обробка даних здійснюється за допомогою мікропроцесорних контролерів. Процедури томографічної реконструкції організовані на стандартних ПК чи локальних мережах. Відображення даних виробляється у вигляді проєкційних, чи стереоскопічних, також проєкційних зображень, що дозволяють спостерігати досліджувані об'єкти в будь-яких ракурсах. Результати математичного моделювання запропонованих алгоритмів реконструкції показали, що вони досить ефективні, з погляду швидкодії і представлення даних.

Ключові слова: малоракурсна томографія, мікротомографія, оптична мікроскопія, просторова конфігурація клітинних структур, Фур'є-перетворення, проєкційні зображення, об'ємні зображення.

Переписка

О. В. Филонин

*Самарский государственный
аэрокосмический университет
Московское шоссе, 34
Самара, 443086, РФ
тел.: 241-53-61
эл. почта: phynist@mail.ru*