

рений, размера и его погрешности, овальности, среднего размера и гистограммы рассеяния погрешностей на заданном числе измерений в интервале 10...9999.

При расширении области применения системы представляется целесообразным проводить работы по пути дальнейшего повышения производительности контроля и разнообразия функций процессорной части системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Трофимова И. В. Современное состояние линейных измерений. (Интерференционные методы измерения длины штриховых мер).— М.: Госстандарт СССР, НПО и ВНИИМ им. Д. И. Менделеева, ВНИИКИ, 1978.
2. Лазерные интерферометры/Под ред. В. П. Короневича.— Новосибирск: изд. ИАиЭ СО АН СССР, 1978.
3. Александров В. К. Способ контроля линейных размеров микрообъектов. (Автор. свид-во № 612148).— БИ, 1978, № 23.
4. Александров В. К., Биенко Ю. Н., Ильин В. Н. Способ контроля линейных размеров микрообъектов. (Автор. свид-во № 742705).— БИ, 1980, № 23.
5. Александров В. К., Биенко Ю. Н., Ильин В. Н. Контроль поперечных размеров протяженных микрообъектов методом раздвоения изображения.— В кн.: Новые физические методы и средства контроля промышленных изделий. Минск: изд. АН БССР ОФНК, 1978, с. 315—317.
6. Александров В. К. и др. Система для автоматизации научных исследований точности изготовления протяженных микрообъектов.— В кн.: Автоматизация научных исследований на основе применения ЭВМ. [Тез. докл. на Всесоюз. конф. 11—13 июня 1979 г.]. Новосибирск: изд. ИАиЭ СО АН СССР, 1979, с. 160.
7. Dyson J. Precise Measurement by Image-Splitting.— JOSA, 1960, vol. 50, p. 754—757.
8. Mesch F. Systemtheoretische Beschreibung Optischelektrischer Messsysteme.— ATM, 1977, Bd 44, S. 249—258.

*Поступила в редакцию 25 июля 1979 г.;
окончательный вариант — 30 октября 1980 г.*

УДК 576.8.074 : 681.3

О. С. СЛАДКОВ, И. В. ЩУКИН
(Москва)

ВОЗМОЖНОСТИ КЛАССИФИКАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ ПРИЗНАКАМ МЕТОДАМИ ФУРЬЕ-МИКРОСКОПИИ И ОПТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ИНФОРМАЦИИ

Анализ изображений в биологии и медицине часто связан с определением особенностей формы микрообъектов. В качестве примеров укажем классификацию клеток крови лейкоцитарного ряда по форме ядра, а также задачу обнаружения индикаторных микроорганизмов при гидробиологических исследованиях*. В данной работе рассматриваются дифракционные методы решения указанного класса задач, основанные на анализе пространственного спектра изображений микрообъектов [1, 2]. По сравнению с традиционными методами анализа изображений, основанными на применении сканирующих микроскопов [3], дифракционные методы в сочетании с техникой оптической фильтрации позволяют

* В данной работе рассматриваются только те составляющие морфологического описания биологического объекта, которые связаны с его геометрическими характеристиками, морфологические же параметры, связанные, например, с цветом объекта, не учитываются. (Относительно использования цветовых характеристик биологических объектов в когерентно-оптических устройствах классификаций см. [4].)

в ряде случаев сравнительно просто реализовать следующие важные для практики преимущества: инвариантность к ориентации объекта; инвариантность к параллельным переносам объекта, позволяющая анализировать движущиеся микрообъекты, в частности живые микроорганизмы; инвариантность к масштабным изменениям объекта; сравнительно простые алгоритмы обработки, что связано со спецификой отображения структуры микрообъектов в пространственном спектре.

1. Получение информации о пространственном спектре микрообъекта из дифракционного эксперимента. Постановка задач дифракции применительно к классификации биологических объектов по морфологическим признакам обнаруживает некоторые особенности, отличающие эти задачи от известных, связанных с дифракцией на телах детерминированной формы, а также задач статистической теории дифракции [5, 6].

Первая из этих особенностей вызвана отсутствием или малой достоверностью информации об электродинамических параметрах классифицируемых биологических объектов. Это относится как к фиксированным и окрашенным клеткам, так и к живым микроорганизмам в задачах гидробиологии. Хотя такие данные в принципе могут быть получены, например, методами интерферометрии, объем исследований будет очень велик вследствие большого разнообразия подлежащих исследованию препаратов. Кроме того, при классификации микрообъектов по морфологическим признакам желательно иметь метод, инвариантный к параметрам, непосредственно не входящим в морфологическое описание объекта.

Таким образом, приходим к задачам дифракции в условиях малой априорной информации об электродинамических параметрах объекта.

Вторая особенность связана с существом проблемы классификации и заключается в том, что точные методы решения задач дифракции дают в значительной степени избыточные данные. По этой причине необходимо проводить сжатие информации с целью выделения устойчивых признаков в условиях вариабельности морфологии объектов.

Третья особенность связана с известной неопределенностью самого морфологического описания объектов, например, особенности формы ядер лейкоцитов определяются обобщенно, качественно: «ядро бобовидной формы», «ядро U- или S-образной формы» и т. п. [7]. С этой особенностью связана необходимость поиска количественных характеристик картины дифракции электромагнитных волн на объектах, форма которых задана обобщенно.

В условиях малой априорной информации об электродинамических параметрах объекта анализ того, как геометрические параметры его морфологии отражаются в картине дифракции, целесообразно вести применительно к той части общего дифрагированного поля, которая связана с теневым сечением объекта и обусловлена затенением объектом волнового фронта падающей световой волны. Как известно, выделение указанной составляющей из общего дифрагированного поля физически оправдано для тел, характерный размер L которых удовлетворяет соотношениям $L \gg \lambda$, $\lambda/L \ll n - 1$, где λ — длина волны, n — показатель преломления объекта [8, 9]. Составляющую дифрагированного поля, связанную с теневым сечением объекта, будем обозначать F_s . Составляющая F_s для тел с $L \gg \lambda$, локализованная в пределах угла $\Theta \sim \lambda/L$ по направлению падающей световой волны, определяется формой теневого сечения объекта и не зависит от электродинамических параметров объекта. Таким образом, вследствие малой априорной информации об электродинамических параметрах объектов истинное рассеянное поле в пределах углов $0 < \Theta \sim \lambda/L$ аппроксимируется F_s . К сожалению, в простой форме не удается дать оценку погрешности такой аппроксимации, так как эта погрешность (в отличие от F_s) сильно зависит от электродинамических параметров объекта, а также от его общей геометрии. Можно, однако, отметить, что при прочих

равных условиях эта погрешность меньше для поглощающих тел. Как показали эксперименты [10–12], для окрашенных ядер лейкоцитов с размером $L \approx (8-10)\lambda$ и для живых микроорганизмов с $L \approx 10^2\lambda$ составляющая F_s аппроксимирует дифрагированное поле в области углов $0 < \Theta \sim \lambda/L$ с точностью 15–20 %. В условиях дифракции Фраунгофера F_s связано с теневым сечением объекта преобразованием Фурье:

$$F_s = AF(\rho, \beta), F(\rho, \beta) = \mathcal{F}\{fs(r, \alpha)\}, \quad (1)$$

где ρ, β и r, α — полярные координаты в плоскости пространственных частот и теневого сечения объекта; fs — функция, определяющая теневое сечение; \mathcal{F} — символ преобразования Фурье; A — постоянный множитель (в дальнейшем опускается). Использование составляющей F_s дифрагированного поля в соответствии с теоремой о сечениях и проекциях пространственного спектра приводит к методу изучения трехмерного фурье-пространства по его проекциям [13].

2. Угловой спектр. Переход от трехмерного фурье-пространства объекта к проекции спектра приводит к значительному сжатию информации. Дальнейшее сжатие с сохранением морфологических особенностей объекта достигается введением углового спектра (УС) [2, 10, 11]:

$$I_\beta(\beta; \rho_1, \rho_2) = \frac{1}{2\pi} \int_{\rho_1}^{\rho_2} I(\rho, \beta) \rho d\rho, I(\rho, \beta) = |F(\rho, \beta)|^2, \quad (2)$$

$I(\rho, \beta)$ — интенсивность пространственного спектра. В частном случае при $\rho_1 = 0, \rho_2 = \infty$ функция $I_\beta(\beta; 0, \infty)$ является инвариантной к масштабным изменениям функции $fs(r, \alpha)$. Это свойство приближенно сохраняется и для конечных ρ_1 и ρ_2 при определенном их выборе. Полезность введения УС во многом связана с тем, что его структуру удается дешифровать в терминах обобщенного морфологического описания биологических объектов.

В простейших случаях УС может быть вычислен аналитически; это возможно, например, в важном частном случае, когда fs имеет вид эллипса. Пространственный спектр эллипса определяется соотношением

$$F(\rho, \beta; e) = \pi ab^2 [I_1(x\sqrt{1-e^2 \sin^2 \beta})/x\sqrt{1-e^2 \sin^2 \beta}], \quad (3)$$

где a, b — размеры большой и малой полуосей; $e = (1 - (b^2/a^2))^{1/2}$; $x = \rho a$. Учитывая (2), для УС эллипса имеем

$$\begin{aligned} I_\beta(\beta; e, x_1, x_2) &= \frac{2\pi b^2}{1 - e^2 \sin^2 \beta} \int_{x_1}^{x_2} \frac{I_1^2(x\sqrt{1-e^2 \sin^2 \beta})}{x} dx = \frac{2\pi b^2}{1 - e^2 \sin^2 \beta} \times \\ &\times [\Phi(x_2\sqrt{1-e^2 \sin^2 \beta}) - \Phi(x_1\sqrt{1-e^2 \sin^2 \beta})]. \end{aligned} \quad (4)$$

Здесь $x_1 = \rho_1 a, x_2 = \rho_2 a, \Phi(t) = 1 - I_0^2(t) - I_1^2(t), I_0, I_1$ — функции Бесселя 1-го рода нулевого и первого порядков.

Соотношение (4) упрощается, если $x_1 = 0, x_2 = \infty$:

$$I_\beta(\beta; e, 0, \infty) = I_\beta(\beta; e) = \pi b^2 / (1 - e^2 \sin^2 \beta). \quad (5)$$

На рис. 1, а приведены графики функции $I_\beta(\beta; e)$ для $x_1 = 3, x_2 = 8^*$. Удобной характеристикой УС является его гармонический состав. Так как $I_\beta(\beta; e) = I_\beta(\beta + \pi; e)$, то гармонический состав определяется только четными гармониками. На рис. 1, б показан гармонический состав УС I_β .

В большинстве интересных для практики случаев аналитический расчет УС невозможен. Для сложных функций $fs(r, \alpha)$ численный расчет пространственного спектра, а следовательно, и УС весьма трудоемок. По этой причине целесообразно при расчете УС использовать для пространственного спектра $F(\rho, \beta)$ приближение метода стационарной

* Графики рис. 1 построены по результатам вычисления А. О. Бакрунова.

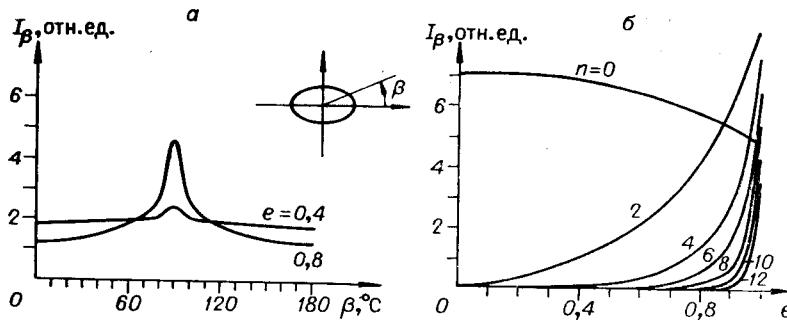


Рис. 1. Угловой спектр эллипса.

фазы [14]. Важным дополнительным основанием для применения метода стационарной фазы является возможность дешифровки УС в терминах морфологического описания объекта [1, 2, 10]. Представление пространственного спектра, использующее метод стационарной фазы, соответствует переходу к анализу высокочастотной части пространственного спектра функции f_s (для f_s в виде круга к этой области можно отнести часть пространственного спектра, лежащую за пределами первого пуль картины дифракции Эйри, где погрешность, даваемая методом стационарной фазы, составляет единицы процентов). В приближении метода стационарной фазы пространственный спектр $F(\rho, \beta)$ функции $f_s(r, \alpha)$ на луче $\beta = \beta_0$ определяется суперпозицией волн точечных источников, расположенных в точках контура теплового сечения, касательные к контуру в которых перпендикулярны лучу $\beta = \beta_0$, амплитуда волн источников обусловливается кривизнами или их производными в указанных точках стационарной фазы контура. Если кривизна в стационарных точках отлична от нуля, то

$$F(\rho, \beta) = (2\pi)^{1/2} \rho^{-3/2} \sum_{j=1}^{N_\beta} [K_j(\beta)]^{-1/2} \exp \left\{ i \left[\rho r_j \cos(\beta - \alpha_j) - \frac{3}{4} \operatorname{sign} K_j(\beta) \right] \right\}; \quad (6)$$

для случая, когда кривизна в стационарных точках равна нулю,

$$F(\rho, \beta) = 2^{4/3} \pi \rho^{-4/3} \sum_{j=1}^{M_\beta} [K'_j(\beta)]^{-1/3} A_i \xi_j \exp \{i [\rho r_j \cos(\beta - \alpha_j)]\}, \quad (7)$$

где K_j и K'_j — кривизна и производная кривизны контура в j -й стационарной точке; r_j , α_j — координаты j -й стационарной точки; N_β и M_β — число стационарных точек, соответствующих лучу β с кривизной, отличной и равной нулю соответственно; sign — знак K_j ; $A_i \xi_j$ — функция Эйри, аргумент которой определяется соотношением

$$\xi_j = -(2\rho^2/K'_j)^{1/3} |\beta - \alpha_j - \pi/2|. \quad (8)$$

Для углов $|\beta - \alpha_j - \pi/2| > (K'_j/2\rho^2)^{1/3}$, т. е. при $|\xi_j| > 1$, соотношение (7) переходит в (6).

В качестве первого примера использования метода стационарной фазы рассмотрим УС выпуклой фигуры. Для выпуклой фигуры по каждому направлению β существует только две стационарные точки, кривизна в этих точках отлична от нуля. Учитывая (6), для интенсивности пространственного спектра имеем

$$I(\rho, \beta) = (2\pi/\rho^3) [R_1(\beta) + R_2(\beta) - 2(R_1(\beta)R_2(\beta))^{1/2} \sin \rho d_0(\beta)], \quad (9)$$

где $r_1 \cos(\beta - \alpha_1) - r_2 \cos(\beta - \alpha_2) = d_0(\beta)$ для диаметра выпуклой фигуры в направлении луча β , связанного с важной геометрической харак-

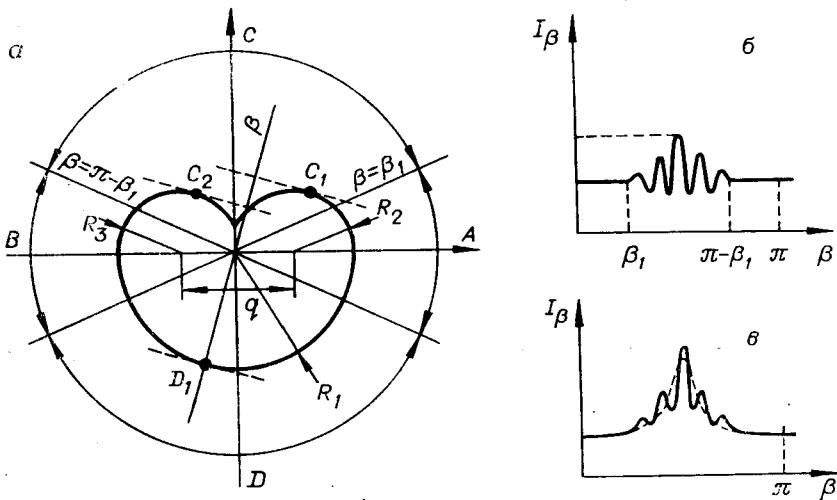


Рис. 2. Угловой спектр невыпуклой фигуры.

теристикой выпуклой фигуры — опорной функцией; $R_1(\beta)$ и $R_2(\beta)$ — радиусы кривизны в точках стационарной фазы. Подставляя (9) в (2), для УС получаем

$$I_\beta(\beta; \rho_1, \rho_2) = [R_1(\beta) + R_2(\beta)] (\rho_1^{-1} - \rho_2^{-1}) - 2(R_1(\beta) R_2(\beta))^{1/2} [\text{sinc } \rho_1 d_0(\beta) - \text{Ci } \rho_1 d_0(\beta) - \text{sinc } \rho_2 d_0(\beta) + \text{Ci } \rho_2 d_0(\beta)]. \quad (10)$$

Здесь $\text{sinc } x = \sin x/x$, $\text{Ci } x$ — интегральный косинус. Условия применимости метода стационарной фазы в данном случае означают, что $\rho_1 d_{0\min} \gg 1$, где $d_{0\min}$ — минимальный диаметр выпуклой фигуры. Если, кроме того, $\rho_2 \gg \rho_1$, то (10) упрощается:

$$I_\beta(\beta; \rho_1, \rho_2) \simeq [R_1(\beta) + R_2(\beta)] (\rho_1^{-1} - \rho_2^{-1}) \simeq (R_1(\beta) + R_2(\beta))/\rho_1. \quad (11)$$

Таким образом, для выпуклой фигуры УС определяется суммарным радиусом кривизны контура f_s в точках стационарной фазы.

В качестве второго примера использования метода стационарной фазы рассмотрим, как оказывается свойство невыпуклости фигуры на структуре УС. На рис. 2, а приведена невыпуклая фигура, образованная дугами трех окружностей с радиусами R_1 и $R_2 = R_3 = R < R_1$. Лучи $\beta = \beta_1$ и $\beta = \pi - \beta_1$, перпендикулярные касательным к контуру, в точке излома делят плоскость пространственных частот на четыре сектора. В секторах A и B для каждого луча β имеются две стационарные точки с пепулевой кривизной. Поэтому согласно (10) и (11)

$$I_\beta(\beta) \simeq (R_1 + R)(\rho_1^{-1} - \rho_2^{-1}), \quad -\beta_1 \leq \beta \leq \beta_1 \text{ и } \pi - \beta_1 \leq \beta \leq \pi + \beta_1. \quad (12)$$

В секторах C и D для каждого луча β имеются три стационарные точки: например, C_1 и C_2 с одинаковым знаком кривизны и D_1 с противоположным. С помощью (6) для УС находим

$$I_\beta(\beta) = (R_1 + R)(\rho_1^{-1} - \rho_2^{-1}) + 2R \{ \rho_1^{-1} \cos(2\rho_1 q \cos \beta) - \rho_2^{-1} \cos(2\rho_2 q \cos \beta) + 2q \cos \beta [\text{Si}(2\rho_1 q \cos \beta) - \text{Si}(2\rho_2 q \cos \beta)] \}, \quad (13)$$

где q — смещение центров дуг окружностей радиуса R ; $\text{Si } x$ — интегральный синус; соотношение (13) справедливо для углов $\beta_1 \leq \beta \leq \pi - \beta_1$ и $\pi + \beta_1 \leq \beta \leq 2\pi - \beta_1$. Вид УС в данном случае поясняет рис. 2, б, на рис. 2, в показан также УС для эллиптической фигуры с изломом. Таким образом, в данном случае свойство невыпуклости фигуры отражается в структуре УС появлением характерной пульсации.

Следует обратить внимание на то, что УС может использоваться для получения обобщенных геометрических характеристик сложных

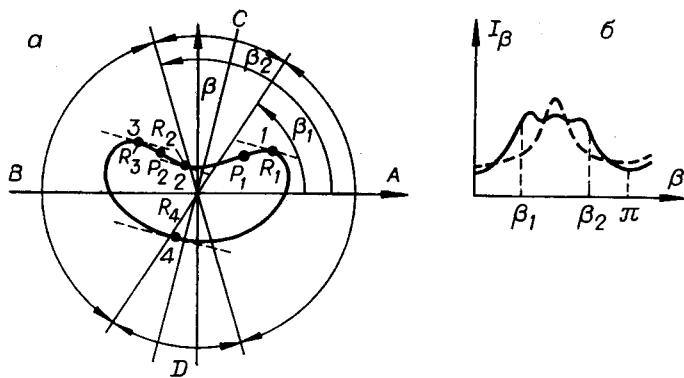


Рис. 3. Угловой спектр лейкоцита бобовидной формы.

фигур. Так, выполняя сглаживание УС, можно определить геометрические параметры выпуклой оболочки фигуры. Выделяя вторую гармонику УС и учитывая графики рис. 1, б, можно найти обобщенный параметр эллиптичности, вытянутости сложной фигуры.

3. Угловые спектры некоторых биологических объектов. Экспериментальные исследования возможности использования УС для классификации биологических объектов проводились применительно к задачам анализа лейкоцитарных клеток крови по форме ядра, а также обнаружения индикаторных микроорганизмов в гидробиологии [10—12]. Для получения пространственных спектров микрообъектов использовался фурье-микроскоп [15]. Исследования УС лейкоцитов были выполнены на фиксированных и окрашенных препаратах; в исследованиях для гидробиологии УС получали лишь для живых (как правило, движущихся) микроорганизмов.

Исследование УС лейкоцитов включало анализ 82 клеток (30 — сегменто-ядерных нейтрофилов, 8 — палочкоядерных нейтрофилов, 30 — лимфоцитов, 14 — моноцитов). Методом дешифровки УС, аналогичным изложенному в п. 2, было установлено, как в структуре УС отражаются такие морфологические особенности ядер лейкоцитов, как бобовидность, *S*- и *U*-образность, многоядерность и т. п. Подобные же задачи решались при дешифровке УС индикаторных микроорганизмов в гидробиологии. При выполнении дешифровки УС использовались аналитические методы и методы цифрового моделирования [10, 11]. В качестве примеров рассмотрим дешифровку УС моноцита, нейтрофила с *U*-образной особенностью и микроорганизма *Vorticella*.

Бобовидное ядро моноцита (рис. 3, а) представляет собой эллиптическую фигуру с вмятинкой, расположенной на стороне с наименьшей кривизной. Для бобовидной фигуры характерным является наличие двух точек перегиба P_1 и P_2 . Лучи $\beta = \beta_1$ и $\beta = \beta_2$, перпендикулярные касательным в точках перегиба, делят плоскость пространственных частот на четыре сектора. В секторах *A* и *B* для каждого луча β имеются две стационарные точки с ненулевой кривизной. В этой области УС определяется соотношением, аналогичным (11), в секторах *C* и *D* — точками перегиба и четырьмя точками стационарной фазы с ненулевой кривизной (рис. 3, б). Расчет УС в этих секторах проводится с использованием соотношений (6) и (7). Как показывает анализ, для УС бобовидного объекта по сравнению с объектом эллиптической формы характерно уширение максимумов, причем тем большее, чем сильнее выражена бобовидность. Для бобовидного объекта так же, как для объекта, соответствующего рис. 2, а, характерны пульсации на вершинах максимумов, величина которых увеличивается с ростом отношения $\tau = R_\Sigma / (K_p)^{2/3}$, $R_\Sigma = R_1 + R_2 + R_3 + R_4$ (см. рис. 3, а).

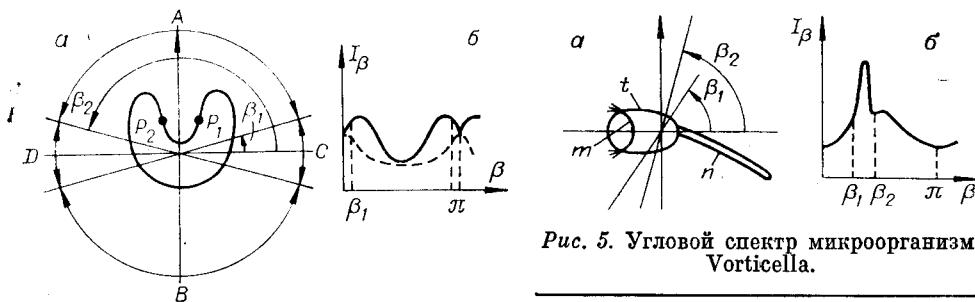


Рис. 5. Угловой спектр микроорганизма Vorticella.

Рис. 4. Угловой спектр лейкоцита *U*-образной формы.

U-образное ядро нейтрофила представляет собой эллиптическую фигуру с ярко выраженной вмятиной, расположенной на стороне с наибольшей кривизной, параметр τ для *U*-образного ядра больше, чем для бобовидного. В связи с этим в УС уширяется максимум, сдвинутый влево на $\pi/2$ по оси β , на вершине максимума наблюдается характерный провал (рис. 4, а, б). При уменьшении параметра τ форма максимума становится близкой к той, которая наблюдается для бобовидного ядра, это объясняется тем, что в этом случае геометрические характеристики *U*-образного и бобовидного ядер сближаются.

Основными элементами микроорганизма *Vorticella* (рис. 5, а) являются тело (*t*), головка (*m*) и ножка (*n*). Тело и головка имеют эллипсообразную форму, ножка — форму эллипсообразной дуги. УС (рис. 5, б) определяется соотношением

$$I_\beta \sim R_{tm}(\beta) + \varepsilon(\beta)R_n(\beta),$$

где $R_{tm}(\beta)$ — сумма радиусов кривизны в стационарных точках тела и головки; $R_n(\beta)$ — радиус кривизны ножки; $\varepsilon(\beta)$ — множитель, определяемый угловой протяженностью ножки $\varepsilon(\beta) = \begin{cases} 1, & \beta_1 \leq \beta \leq \beta_2; \\ 0, & \beta < \beta_1, \beta > \beta_2. \end{cases}$

В заключение авторы выражают признательность М. А. Беляевой, С. Г. Потаповой и Л. Ф. Юдиной за помощь в выполнении медико-биологической части экспериментов, А. О. Бакрунову — за обсуждение отдельных разделов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Щукин И. В.— В кн.: Средства и методы квантовой электроники в медицине. Саратов: изд. СГУ, 1976, с. 187—189.
2. Щукин И. В.— В кн.: Проблемы голографии. М.: изд. МИРЭА, 1977, вып. IX, с. 137—143.
3. Иваницкий Г. Р., Литинская Л. Л., Шихматова В. Л. Автоматический анализ микрообъектов.— М.: Энергия, 1967.
4. Щукин И. В.— В кн.: Труды МИЭМ. М., 1974, вып. 37, с. 105—117.
5. Хенл Х., Мауз А., Вестфаль К. Теория дифракции.— М.: Мир, 1964.
6. Рытов С. М., Кравцов Ю. А., Татарский В. И. Введение в статистическую радиофизику.— М.: Наука, 1978, ч. 11.
7. Касирский К. А., Алексеев Г. А. Клиническая гематология.— М.: Медицина, 1970.
8. Шифрин К. С. Рассеяние света в мутной среде.— М.— Л.: ГИТГЛ, 1951.
9. Ван де Хюлст Г. Рассеяние света малыми частицами.— М.: ИЛ, 1961.
10. Щукин И. В., Бакрунов А. О., Сладков О. С.— В кн.: Средства и методы квантовой электроники в медицине. Саратов: изд. СГУ, 1976, с. 189—191.
11. Бакрунов А. О., Сладков О. С., Щукин И. В.— В кн.: I Всесоюз. конф. «Статистические свойства микроструктур». М.: Онтитэймикробиопром, 1978, с. 47—49.
12. Гюнтер Л. И. и др.— В кн.: Микробиологические методы борьбы с загрязнениями окружающей среды. Пущино: изд. АН СССР, 1979, с. 135—137.
13. Щукин И. В.— В кн.: Формирование оптического изображения и методы его коррекции. Всесоюз. конф. Могилев: ИФ АН БССР, 1979, с. 5—6.
14. Федорюк М. Ф. Метод перевала.— М.: Наука, 1977.
15. Бакрунов А. О., Щукин И. В. Устройство для оптической обработки и анализа изображений микрообъектов.— Автометрия, 1980, № 5.

Поступила в редакцию 1 августа 1980 г.