

Г.В. Симоненко, В.В. Тучин

ОПТИЧЕСКИЙ ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИКЕ ЖИВЫХ СИСТЕМ

Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	2
ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ.....	3
ПРАКТИКУМ	8
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. Кинетика управления светорассеянием биологического образца.....	8
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. Оценка величины анизотропии показателя преломления биологического образца	18
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3. Конструкция простейшего цифрового микроскопа	44
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. Определение цветowych координат объекта	51

ВВЕДЕНИЕ

В настоящий момент времени в быстро развиваются методы оптической диагностики биологических образцов. В силу этого требуется полное понимание процесса распространения света в биологических тканях (биотканях). По своим оптическим свойствам биоткани являются сильно рассеивающими и анизотропными средами, исследование которых представляет не только чисто прикладной интерес, но академический. По своим оптическим свойствам биоткани схожи с жидкими кристаллами (ЖК). ЖК являются анизотропными жидкостями, а биоткани это в простейшем случае двухкомпонентная смесь. Вместе с этим оба класса веществ имеют большое светорассеяние и одновременно обладают оптической анизотропией. Кроме этого оптическими свойствами этих классов можно достаточно просто управлять: ЖК легко изменяют свои оптические свойства под действием внешних электрических полей, а оптические свойства биотканей можно изменять с помощью иммерсионной технологии. Для описания оптических свойств обоих классов можно использовать идентичные методы и подходы, основанные на аналогичных моделях, а также применять одинаковые принципы исследования динамики изменений оптических свойств ЖК или биоткани при внешних воздействиях. Поэтому при исследовании оптических свойств этих классов веществ возникают похожие задачи.

Управление оптическими свойствами биоткани очень важно для различных медицинских приложений. Например, возможность селективного просветления наружных слоев биоткани очень полезна для оптических методов реконструкции строения глазного яблока и обнаружения локальных неоднородностей в сильно рассеивающей среде методом низкокогерентной томографии. Динамика изменения оптических характеристик при иммерсионном просветлении биоткани может быть использована для определения коэффициента диффузии различных жидкостей в биотканях. В последнее время стимул к развитию получила поляризационно-чувствительная томография биотканей и органов, и поэтому появился интерес к исследованию взаимодействия света с поляризационно-анизотропной средой, для которого большую роль играет деполяризация излучения при распространении света в такой неоднородной среде. Что и определило актуальность разработки простых методик расчета оптических характеристик неоднородных сред, включая биоткани, с учетом их анизотропных и деполяризующих свойств. Кроме этого при использовании технологии иммерсионного просветления биотканей возникает вопрос об исследовании кинетики их иммерсионного просветления и построении теоретических моделей для описания этого процесса. В силу вышесказанного актуальным является создание комплекса лабораторных работ для студентов – физиков с целью изучения оптики биологических сред, чему и посвящено данное учебное пособие.

Учебное пособие является описанием к оптическому практикуму по физике живых систем. Практикум состоит из теоретической части и четырех исследовательско-лабораторных работ. Теоретическая часть содержит краткое описание основных оптических свойств биотканей и теоретических методов для их исследования.

Первая лабораторная работа уделяет внимание изучению кинетики процесса иммерсионного просветления биоткани. Целью работы является исследование процесса управления оптическими свойствами биоткани и пониманию физики этого явления.

Во второй лабораторной работе студентам предоставляется возможность исследования анизотропных оптических свойств биологического образца с помощью поляризационного микроскопа. Целью работы является углубленное изучение оптических свойств биоткани и более ясное представление о распространении света через неоднородную анизотропную среду.

Третья лабораторная посвящена конструированию цифрового микроскопа на базе персонального компьютера и поляризационного микроскопа. Целью данной работы является изучение современного экспериментального инструментария в области оптики биотканей.

В четвертой лабораторной работе студентам предлагается освоить понятие цветовых координат и способов их определения для объектов различной природы по их спектрам пропускания или отражения. Цель данной работы – дать основные понятия о цвете и его измерении с помощью программирования.

Работа выполнена в рамках осуществления гранта Президента РФ НШ-703.2014.2 и научно-исследовательского проекта под руководством ведущего ученого (№ 14.Z50.31.0004), поддержанного правительством РФ.

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Многие биологические структуры являются оптическими анизотропными. Широкий круг различных биотканей содержит одноосные двулучепреломляющие структуры. Например, для костной ткани это минерализованные пучки, а для мышечной ткани миозиновые. Как результат биологический образец начинает проявлять анизотропные свойства в целом. При этом анизотропия свойств проявляется как в рассеянии света, так и в наличии анизотропии показателей преломления биоткани. В настоящий момент времени большинство работ посвящено исследованию анизотропии рассеяния, что в первую очередь связано с тем, что биоткань является сильно рассеивающей средой. Если исследуются оптические свойства тонких образцов биоткани, например, гистологических срезов, или интересуются оптическими свойствами биологических структур с использованием технологии иммерсионного просветления, то на первый план выходят свойства оптической анизотропии, связанные с анизотропией показателей преломления. В этом случае анизотропия показателей преломления обусловлена многокомпонентным строением биоткани, которая в простейшем случае представляет из себя двухкомпонентную систему, составные элементы которой имеют существенно различные показатели преломления. При этом компоненты системы сами могут иметь изотропные свойства, но за счет геометрического фактора и различных показателей преломления такая двухкомпонентная система в целом будет проявлять анизотропию показателей преломления. Данная глава диссертации посвящена построению модели биоткани, которая проявляет свойства анизотропии показателей преломления в условиях полного отсутствия или малости рассеяния света, и позволяет рассчитывать спектральную зависимость коэффициентов пропускания или отражения биологических образцов. Кроме этого в данной главе рассмотрен вопрос о спектрах пропускания и отражения неоднородной анизотропной слоистой среды с хаотической ориентацией ее структурных элементов.

Для описания оптических свойств любой среды необходимо знать как минимум макроскопические значения показателя преломления образца, а также значения его коэффициентов рассеяния и поглощения. Поэтому измерения показателей преломления биоткани или ее отдельных компонентов является одной из актуальных задач оптики биотканей. Биологическим образцам свойственны следующие общие закономерности. Вещество, окружающее рассеиватели (межклеточная жидкость или базовое (основное) вещество) состоит из воды с растворенными в ней солями органическими веществами. Показатель преломления этого вещества колеблется в пределах от 1.35 до 1.37. Собственно рассеивающие структуры, фибриллы или коллагеновые волокна, имеют более высокий показатель преломления, который колеблется от 1.4 до 1.47. Различие в показателях преломления базового вещества и структурных элементов (например, коллагеновых волокон) обуславливает рассеяние света биотканями. Кроме этого для биотканей характерно, что в видимом диапазоне коэффициенты рассеивания больше чем коэффициенты поглощения. При этом коэффициенты рассеивания находятся в пределах от единиц обратных сантиметров до нескольких тысяч обратных сантиметров. В тоже время коэффициент поглощения изменяется от десятых долей обратных сантиметров до десятков обратных сантиметров.

Следует отметить, что большинство биотканей проявляют анизотропные свойства. При этом анизотропные свойства биологических образцов в первую очередь проявляются в анизотропии рассеяния, которая описывается параметром анизотропии рассеяния (так называемый g – фактор). Величина этого параметра также различна для разных типов биологических сред и обычно g – фактор находится в пределах 0.7 – 0.93. Анизотропия рассеивания проявляется, прежде всего, в сильной направленности индикатрисы рассеяния. При этом следует отметить, что коэффициенты рассеяния для света различной поляризации могут существенно отличаться друг от друга.

Кроме перечисленных выше оптических свойств большинство биотканей проявляют свойства анизотропии показателей преломления. Макроскопическая анизотропия морфологических и, соответственно, оптических характеристик некоторых биологических сред (например, мышечной ткани, сухожилий), обусловленная их фибриллярной структурой с частично ориентированными плотноупакованными волокнами, проявляется при поляризационной диагностике и визуализации подобных объектов. Широкий круг различных биотканей содержит одноосные двулучепреломляющие структуры. Анизотропные оптические свойства большинства биотканей можно легко объяснить его строением. Для костной ткани - это минерализованные пучки (кристаллы гидроксиапатита), для мышечной миозиновые, для кожи – коллагеновые пучки. Для мышечной ткани плотность упаковки пучков в мультифрактале выше, чем в костной ткани, и миозиновые волокна в них обладают меньшей величиной двулучепреломления ($\delta n \sim 10^{-3}$). Наличие преимущественной ориентации коллагеновых волокон в различных участках роговой оболочки приводит к появлению дихроизма формы. Ориентационная структура коллагеновых пучков

дермы кожи чрезвычайно разнообразна даже для небольших геометрических толщин гистологического среза. Кроме линейного двулучепреломления и дихроизма многие биологические объекты обладают оптической активностью.

На рис. 1 представлена модель, соответствующая типичному строению соединительной ткани. Обычно биологическая ткань состоит из коллагеновых, эластических, ретикулярных волокон, а также из основного вещества [139]. Средний показатель преломления коллагеновых волокон в видимом диапазоне длин волн находится в пределах 1.44 – 1.47, а показатель преломления основного вещества – 1.33 – 1.36. Поэтому, исходя из описания строения биоткани и данных поляризационной микроскопии, можно сказать, что большинство образцов биоткани обладает оптической анизотропией, обусловленной анизотропией формы. Заметим, что наличие хиральных молекул в составе биотканей (оптически активные белки, например, альбумин, или метаболические вещества, поступающие в ткань, такие как глюкоза) приводят к проявлению не только линейной, но и круговой анизотропии биоткани. Однако для физических условий и для сильно рассеивающих биотканей круговая анизотропия в оптических характеристиках не проявляется.

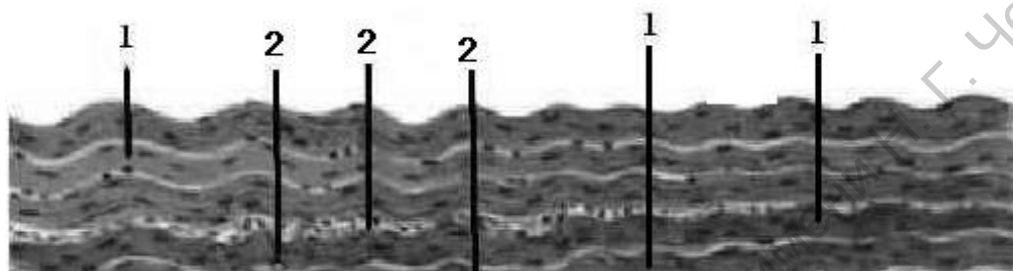


Рис. 1 Типичное строение соединительной ткани
1 - базовое вещество; 2 – коллагеновые волокна.

Для описания распространения света в биологических тканях используются различные математические методы, основанные как на скалярных волновых моделях, так и на векторных волновых моделях.

Биоткани оптически неоднородны, поэтому при распространении излучения в них существенную роль играют процессы светорассеяния. Рассеянное излучение несет информацию о формирующих биоткань факторах, таких как размеры и форма структурных элементов, их ориентация, оптические постоянные и другие параметры. Для того чтобы иметь возможность извлечь эту информацию и интерпретировать результаты экспериментов по светорассеиванию, необходимо построить адекватную оптическую модель биоткани и на ее основе решить задачу распространения и рассеяния излучения в данной среде. Точная теория о поглощении и рассеянии света биологическими тканями и частицами произвольных размеров и структур отсутствует, однако важную информацию об их оптических свойствах можно получить на основе исследования взаимодействия излучения с соответствующими модельными объектами. Сложность строения биотканей, высокая концентрация рассеивающих частиц, неоднородность их размеров, формы и оптических постоянных делает задачу построения адекватной оптической модели довольно сложной. Основные особенности эффектов светорассеивания контролируются, главным образом, простыми факторами. Можно считать, что такими факторами для отдельной частицы, в порядке важности, являются: размер и форма частицы, а также радиальное распределение массы.

Можно выделить два основных подхода к моделированию биоткани: представление биоткани средой с непрерывным случайным пространственным распределением оптических параметров и представление в виде дискретных рассеивателей. Выбор того или иного подхода диктуется как особенностями исследуемой биоткани, так и типом характеристик светорассеяния, которые необходимо получить в результате моделирования. Микроструктура биологических клеток и тканей достаточно сложна и ее трудно описывать количественно. Многие биологические ткани образованы структурами, размеры которых меняются в широких пределах. Если отсутствует один преобладающий размер структурных элементов, то представление ткани как ансамбля независимых изолированных рассеивателей нецелесообразно. Поэтому первый подход к моделированию оптических свойств биоткани базируется на том что, рассеяние в таких системах можно описать на основе представления о непрерывных случайных флуктуациях коэффициента преломления неоднородностей с различным пространственным масштабом.

Второй подход к моделированию биотканей состоит в представлении их как системы дискретных рассеивающих частиц. Эту модель целесообразно использовать для описания угловой зависимости

поляризационных характеристик рассеянного излучения. Примером важнейшей биологической дисперсной системы, полностью отвечающей модели дискретных рассеивателей, является кровь.

Для правильного выбора теоретического метода и приближений для расчета характеристик рассеяния системы частиц необходимо учитывать основные особенности строения биотканей, а именно форму и диапазон размеров отдельных частиц, их показатель преломления и концентрацию.

Достаточно строгое математическое описание процесса распространения света в рассеивающей среде может быть сделано с помощью стационарной теории переноса излучения (ТПИ). Обычно скалярное уравнение для описания распространения светового излучения используют в оптике биотканей в тех случаях, когда можно пренебречь поляризационными эффектами.

Более строгое решение уравнения переноса можно получить методом дискретных ординат (многопоточковая теория), когда уравнение переноса преобразуется в матричное дифференциальное уравнение для освещенности по многим дискретным направлениям (углам). Однако получение достаточно точного решения этим методом требует большого объема вычислений.

В оптике биотканей широкое применение нашли более простые методы решения уравнения переноса, такие как двух потоковая модель Кубелки — Мунка, трех-, четырех- и семи потоковые модели. Это эквивалентно представлению многих потоков по методу дискретных ординат только двумя (одномерная задача) или шестью (трехмерная задача) диффузными потоками. Такое представление естественно и весьма плодотворно при лазерном зондировании биоткани, так, например, четырех потоковая модель представляет собой два диффузных потока, распространяющихся навстречу друг другу (модель Кубелки - Мунка), и два коллимированных лазерных пучка - один падающий, а другой отраженный от задней границы образца. Очевидно, что в этой модели направление диффузных потоков выбирается совпадающим с соответствующим направлением лазерного пучка. Семи потоковая модель — это простейшее трехмерное представление рассеянного излучения и падающего лазерного пучка в полубесконечной среде. Конечно, простота и возможность очень быстрых расчетов дозы облучения или быстрого определения оптических параметров биоткани (решение обратной задачи рассеяния) даются ценой снижения точности. Недавно предложена уточненная диффузионная модель для описания прохождения лазерного излучения через сильнорассеивающую биологическую среду, которая, в отличие от общепринятых вариантов, учитывает мононаправленность источника фотонов. При этом авторами показано, что уточненная диффузионная модель обладает большей точностью по сравнению с «классической» диффузионной моделью в области малых значений толщины рассеивающего слоя.

Однако требуемая на практике надежная послойная дозиметрия лазерного излучения внутри биоткани, проблемы оптической диффузной томографии и спектроскопии биообъектов определяют необходимость развития методов решения задач теории переноса излучения для сред с произвольной конфигурацией и любыми граничными условиями. Для решения таких задач наиболее перспективным является метод Монте - Карло, широко применяемый для численного решения уравнения ТПИ в различных областях знаний (астрофизике, оптике атмосферы и океана и др.). В последние годы успешно развиваются приложения метода Монте - Карло в оптике биотканей. Метод Монте - Карло базируется на численном моделировании транспорта фотонов в рассеивающей среде. Случайное блуждание фотонов внутри образца биоткани прослеживается от точки влета в образец до его поглощения или выхода из образца.

Применение метода Монте - Карло базируется на использовании макроскопических оптических свойств среды, которые предполагаются однородными в пределах небольших объемов ткани. Известные алгоритмы позволяют учесть несколько слоев биоткани с различными оптическими свойствами, конечный размер падающего пучка, отражение света от границ раздела слоев. Следует отметить, что основной моделью биоткани является длинные диэлектрические круглые цилиндры (роговица, склера) или сферические частицы (хрусталик), распределенные в изотропном базовом веществе хаотически (склера, мутный хрусталик) или в соответствии с определенным законом (прозрачные роговица и хрусталик). Анализ светорассеяния в тканях глаза может быть выполнен на основе модели однократного рассеяния благодаря малому значению поперечного сечения рассеяния.

В модифицированном методе Монте – Карло, на основе которого выполняется расчет обратно рассеянного излучения в биоткани, включая когерентную составляющую, учтены линейная и круговая поляризации, без использования векторно – матричного формализма Стокса – Мюллера. В основе этой методики лежит подход в моделировании скалярного поля. Построение случайной траектории, найденной в рамках моделирования скалярного поля с заданной фазовой функцией, сопровождается вычислением вектора поляризации электрического поля в каждом акте рассеяния. В результате на выходе вычисляются компоненты бинарного корректора поле – поле для любых компонент электрического поля. Эта методика

позволяет значительно упростить моделирование векторного поля и свести его практически к моделированию скалярного поля.

При высокой точности и универсальности главным недостатком метода Монте - Карло являются большие затраты машинного времени. Хотя развитие аппаратных и программных средств вычислительной техники уменьшает роль фактора времени, разработка новых средств лазерной диагностики и терапии требует создания эффективных, сравнительно простых и надежных алгоритмов метода Монте - Карло.

Для описания распространения света через различные среды используются, как правило, различные варианты записи уравнений Максвелла. В настоящее время наибольшую практическую ценность, с точки зрения простоты расчета оптических характеристик сложных анизотропных сред с плоскопараллельными границами раздела, представляют матричные способы записи уравнений Максвелла. Наиболее подходящим математическим аппаратом для описания оптических свойств биологических тканей является формализм матриц Мюллера и векторов Стокса, так как только этот формализм позволяет одновременно учесть следующие три важных факта:

- 1) биоткани рассеивают свет;
- 2) биоткани обладают анизотропными оптическими свойствами;
- 3) оптические свойства биоткани зависят от состояния поляризации света.

В этом случае первые два важных свойства биотканей учитываются в построении той или иной матрицы Мюллера, а третий фактор учитывается с помощью вектора Стокса.

Основываясь на строении биоткани, представленной на рис. 1, можно считать, что биологические образцы обладают кристаллооптическими свойствами – наличием двулучепреломления и преимущественной ориентацией волокон, формирующих направление оси наибольшей скорости. Это позволяет моделировать их свойства как детерминированную совокупность оптически одноосных кристаллов. Способность к преобразованию поляризационно-фазовой структуры лазерного пучка, зондирующего такие объекты, наиболее полно можно описать с помощью матриц и векторов Джонса. Этот матричный формализм также часто используется для описания оптических свойств биотканей, учитывая второй и третий факт в оптических свойствах биотканей. Однако стоит заметить, что для экспериментальных исследований более удобным является иной оператор – матрица Мюллера, определяемая путём прямого измерения интенсивностей различно поляризованных компонентов объектного поля. В случае однократного светорассеяния существует однозначная взаимосвязь между матрицами Джонса и Мюллера. Подобный подход рассмотрен при описании распространения света в роговице и предложена оптическая модель биоткани, представляющая собой многослойную анизотропную систему, число слоёв которой равно числу ламелей (пластин). Рассмотрим несколько моделей, описывающих строение биоткани с различной взаимной ориентацией ламелей.

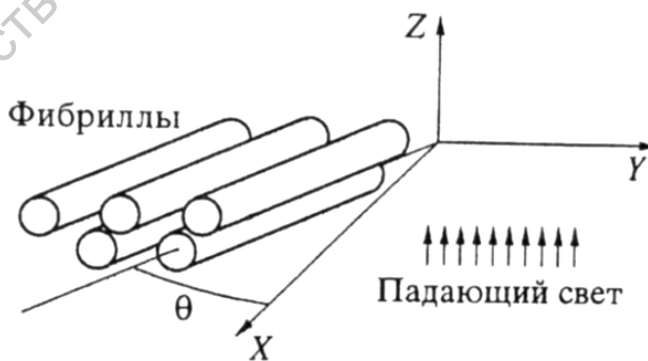


Рис. 2 Ориентация фибрилл в лабораторной системе координат.

В случае, когда ламели по всей толщине ориентированы одинаково, такой образец можно рассматривать как плоскую анизотропную пластинку, ось которой параллельна границе раздела (рис. 2). В этом случае матрица Джонса всего образца биоткани рассчитывается стандартным образом в предположении, что один однородный слой описывается матрицей Джонса для одноосной фазовой пластики, а матрица Джонса всего образца рассчитывается путем простого матричного умножения. В этом случае процесс нахождения матрицы Джонса биоткани полностью аналогичен тому, как это делается, например, для слоя ЖК.

В том случае, когда ориентация ламелей подчиняется определённым закономерностям, например, ламели могут быть ориентированы по спирали или группироваться вдоль выделенных направлений, биоткань представляется как многослойная анизотропная структура, оптические свойства которой описывает соответствующая матрица Джонса. Эта структура также полностью аналогична однородному слою холестерического жидкого кристалла или твист – структуре нематического жидкого кристалла, и методика поиска матрицы Джонса для такой системы может быть основана на матрице Берремана.

Литература.

1. Оптическая биомедицинская диагностика. Под ред. проф. В. В. Тучина М.: Физматлит. 2007. Т.1. С. 560. Т.2. С. 368
2. В.В. Тучин, Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях// М.: ФИЗМАТЛИТ. 2010. 488С.
3. В.В. Тучин, Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике, 2-е издание. Перевод с английского. М.: Физматлит. 2013. 811С.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

Кинетика управления светорассеянием биологического образца

Теоретическая часть

Основные результаты исследования кинетики просветления биоткани

Одним из направлений современной биомедицинской оптики является развитие методов зондирования биотканей излучением видимого и ближнего ИК-диапазонов, позволяющих осуществлять визуализацию ее структуры. В настоящее время можно выделить два основных направления в развитии оптической томографии. Первое, называемое оптической диффузионной томографией, связано с визуализацией крупномасштабных объектов (томография мозга, маммография) с целью выявления новообразований (гематом, опухолей и т.д.). Второе направление – морфологические исследования относительно тонких (~1 мм) слоёв биотканей на основе когерентных и поляризационных методов. Традиционным методом улучшения качества изображений в абсорбционной томографии является использование контрастирующих агентов, обладающих способностью накапливаться в диагностируемых тканях. Данный метод может быть использован и в оптической диффузионной томографии путём введения в ткани поглотителей с максимумом поглощения на длине волны зондирующего излучения, а также флуоресцирующих препаратов. Другой подход к управлению оптическими свойствами диагностируемых тканей основан на контролируемом изменении коэффициента рассеяния биоткани. Уменьшение коэффициента рассеяния биоткани может существенно расширить возможности оптической томографии, особенно при использовании когерентных методов. Развитие этого направления позволяет продвинуться как в области визуализации скрытых неоднородностей (опухолей), определении оптических параметров биотканей, так и в области новых лазерных хирургических технологий с управляемыми обратными связями по оптическому тракту. Несмотря на многочисленные исследования, связанные с управлением оптическими параметрами биотканей, кинетика процесса иммерсионного просветления различных типов биотканей и определение скорости диффузии жидкостей в биотканях остаются недостаточно изученными проблемами. Это обусловлено как сложным многокомпонентным строением биотканей, так и нелинейным характером процессов диффузии. Так как большинство биотканей являются сильно рассеивающими, то для улучшения контраста изображения и для увеличения глубины зондирования в оптической томографии используется метод введения различных иммерсионных жидкостей (например, рентгеноконтрастных агентов) в образец. Коэффициент рассеяния μ_s определяется величиной относительного показателя преломления рассеивателей n_s и окружающего вещества n_0 , $m = n_s/n_0$: $\mu_s \propto (m - 1)^2$. При этом небольшие изменения m вызывают значительные изменения коэффициента рассеяния и соответственно интенсивности прошедшего через объект зондирующего пучка (числа баллистических фотонов). Введение в биоткань иммерсионной жидкости, имеющей показатель преломления больший, чем у внутритканевой жидкости, вызывает частичное замещение внутритканевой жидкости иммерсионным раствором, выравнивание показателей преломления рассеивателей (например, коллагеновых волокон) ткани и окружающей их среды, и, как следствие, значительное снижение светорассеяния.

Согласно существующим в настоящее время представлениям диффузия различных веществ в биотканях происходит в несколько этапов. На первом этапе происходит проникновение веществ в межклеточное и межфибрилярное пространство и взаимодействие их с клеточными мембранами и внутритканевым матриксом биотканей. При этом, как правило, рождается встречный поток молекул воды из ткани наружу, поскольку применяемые растворы либо не содержат воды, либо содержат ее в меньшем количестве, чем в самой ткани (в среднем это 75% для мягких тканей). На следующем этапе, по-видимому, имеет место трансмембранная диффузия вещества в клетки, сопровождающаяся изменением внутриклеточного осмотического давления. При достаточном насыщении межфибрилярного пространства соединительной ткани просветляющим веществом, очевидно, будет происходить его взаимодействие с материалом фибрилл ткани, который также содержит воду. При *in vivo* исследованиях эти процессы сопровождаются диффузией иммерсионной жидкости из области введения и детектирования в окружающие слои, а воды обратно в эту область, в результате с течением времени происходит восстановление оптических свойств биоткани.

Существенное иммерсионное просветление склеры и кожи человека и животных было достигнуто в исследованиях *in vitro* и *in vivo* с помощью ряда иммерсионных химических агентов (рентгеноконтрастных веществ на основе сахаров – верографина и тразографа, а также глюкозы, глицерина, пропиленгликоля и др.).

На рис. Л1.1, Л1.2 представлены примеры кинетики изменения коллимированного пропускания света образцами склеры глаза и кожи человека, помещёнными в водный 40%-раствор глюкозы.

Из представленных данных видно, что кинетика изменения коллимированного пропускания образцов кожи несколько отличается от кинетики оптического просветления образцов склеры глаза. В первую очередь это проявляется в значительно более пролонгированном эффекте просветления. Оптическое просветление образца кожи в 40%-растворе глюкозы продолжается в течение часа, после чего процесс стабилизируется. Аналогичные результаты наблюдаются и при просветлении кожи глицерином. Такая пролонгированность эффекта просветления кожи, по сравнению с оптическим просветлением образцов склеры, объясняется затруднённой проникновением гиперосмотических жидкостей в кожу вследствие малой скорости диффузии жидкостей через плотные клеточные слои эпидермиса, выполняющего функции защитного барьера.

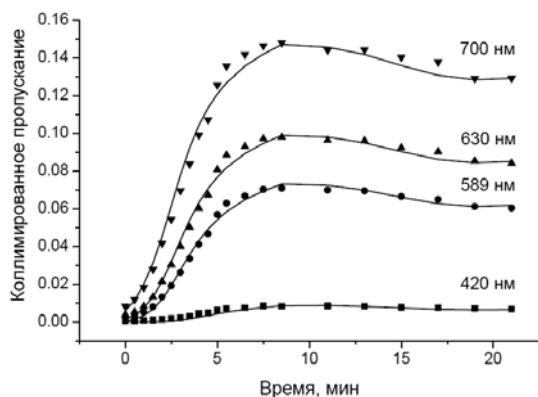


Рис. Л1.1 Кинетика изменения коллимированного пропускания образца склеры глаза человека, помещённого в 40%-раствор глюкозы.

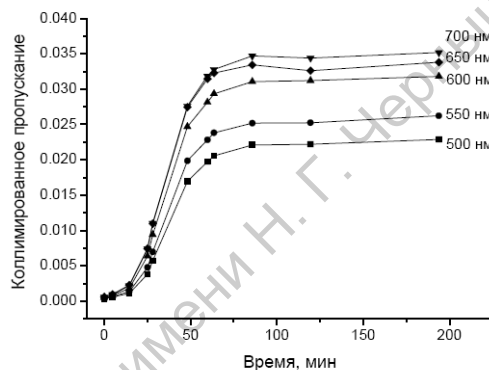


Рис. Л1.2 Кинетика изменения коллимированного пропускания образца кожи человека, помещённого в 40%-раствор глюкозы.

При изучении влияния иммерсионных агентов на фиброзные биоткани, особый интерес представляет механизм проникновения раствора в биоткань. Гликопротеины базового вещества фиброзных тканей (таких как склера, кожа, сухожилие), имеющие отрицательный заряд можно представить как полупроницаемую мембрану, и, следовательно, может иметь место явление проникновения в биоткань растворителя с растворённым в нём веществом – осмос. С другой стороны, благодаря фиброзной структуре ткани, возможно динамическое проникновение в неё различных жидкостей, т.е. свободная диффузия. Это также должно быть сформулировано более точно, поскольку имеют место оба процесса свободная и затрудненная (осмос) диффузия.

По мере проникновения раствора иммерсионной жидкости в биоткань наблюдается увеличение показателя преломления внутритканевой жидкости. Оценка величины показателя преломления внутритканевой жидкости в зависимости от времени диффузии может быть выполнена на основе закона Гладстона-Даля, согласно которому показатель преломления смеси невзаимодействующих жидкостей есть сумма произведений показателей преломления отдельных компонент смеси на объёмные доли данных компонент. Математически закон Гладстона-Даля записывается как

$$n_{\Sigma} = \sum_i n_i C_i, \text{ где } \sum_i C_i = 1 \quad (\text{Л1.1})$$

Здесь n_{Σ} – показатель преломления многокомпонентной смеси невзаимодействующих жидкостей, а n_i и C_i – показатели преломления и объёмные доли каждой компоненты. В случае двухкомпонентных растворов (в нашем случае такими компонентами являются внутритканевая жидкость биоткани и гиперосмотическая жидкость) закон Гладстона-Даля имеет вид:

$$n_i(t) = (1 - C(t))n_{base} + C(t)n_{osm}, \quad (\text{Л1.2})$$

где n_{base} – показатель преломления внутритканевой жидкости в начальный момент времени и n_{osm} – показатель преломления гиперосмотической иммерсионной жидкости (например, раствор верографина или тразографа).

Как показывают исследования изменение рассеивающих свойств фиброзных структур биологических тканей связано не только с изменением показателя преломления внутритканевой жидкости, окружающей рассеиватели, но и с изменением показателя преломления тканевых рассеивателей, в роли которых выступают различные компоненты клеток, например митохондрии. Кроме того, было отмечено, что введение в биоткань различных гиперосмотических веществ, например глюкозы или маннитола, вызывает сжатие клеток за счёт потери ими внутриклеточной жидкости, выходящей под действием осмотического давления, во внеклеточное пространство. При воздействии на печень растворов глюкозы, маннитола и сахарозы (причём в физиологических концентрациях – 200 mM), наблюдалось снижение редуцированного коэффициента рассеяния, вызванное как согласованием показателей преломления различных клеточных структур, на которых происходит рассеяние света, так и уменьшением размеров клеток в результате выхода из них внутриклеточной жидкости, вследствие осмотической природы растворов глюкозы, маннитола и сахарозы. При этом было отмечено, что коэффициент поглощения печени практически не изменился, т.е. воздействие происходит только на рассеивающие свойства биоткани.

Поскольку иммерсионные жидкости могут вызывать набухание или дегидратацию биотканей то, в общем случае, необходимо учитывать изменение геометрии эксперимента (т.е. изменение толщины образца). Однако во многих случаях изменение толщины биоткани минимально и при проведении расчётов им можно пренебречь.

Концепция иммерсионного просветления слоя движущейся или седиментирующей крови была успешно реализована применительно к диагностике атеросклеротических бляшек. Такое просветление важно для получения чётких изображений стенки сосуда (атеросклеротической бляшки) через слой крови с помощью ОКТ-эндоскопов. Высокой эффективностью в данном случае обладают, например, глицерин и декстран.

Экспериментальная установка и методика исследования кинетики иммерсионного просветления биотканей

В исследованиях используются различные по анизотропным свойствам и свойствам проницаемости для иммерсионных жидкостей биоткани: мениск, хрящевая ткань носовой перегородки, сухожилие, склера, вена, аорта, костная ткань бедра. Все образцы биотканей должны храниться при температуре не выше -5°C . Для исследований рекомендуется использовать образцы толщиной от 0.3 до 1 мм и площадью $1 \times 1 \text{ см}^2$. Образец биоткани необходимо закрепить в держателе и поместить в иммерсионную жидкость, а затем постепенно нагревать до температуры $36 - 37^{\circ}\text{C}$, при которой должны быть проведены исследования. В качестве иммерсионной жидкости, уменьшающей рассеяние биоткани, рекомендуется использовать 76% - раствор тразографа (рентгеноконтрастное вещество с показателем преломления равным 1.46). Тразограф представляет собой высокоосмолярное рентгеноконтрастное вещество (производную 2,4-трийодбензойной кислоты). Его молекулярная масса ≈ 500 , $\text{pH} \approx 6.7$.

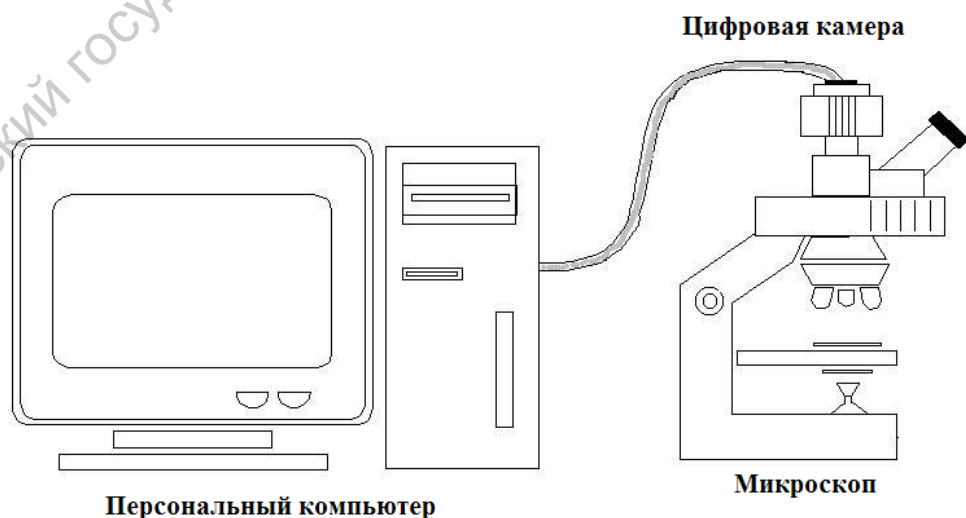


Рис. Л1.3 Схема экспериментальной установки

Для исследования кинетики увеличения коэффициента пропускания биоткани под воздействием иммерсионной жидкости используется экспериментальная установка, включающая микроскоп, оснащенный цифровой камерой, которая подключена к персональному компьютеру (Рис. Л1.3). Основными элементами установки являются:

- микроскопическая насадка;
- осветитель;
- узел фиксации измеряемого объекта;
- персональный компьютер.

Микроскопическая насадка состоит из микрообъектива с 8-кратным увеличением и тубуса, на окулярной части которого закреплена цифровая видеокамера EDC-1000 Electrim Corporation и предметного столика с двух координатной микрометрической подачей образца в плоскости столика (точность подачи 25 мкм). Микроскопическая насадка укреплена на вертикальной стойке. Настройка насадки на объект осуществляется вручную с помощью винта подачи объектива. Кроме этого, конструкция насадки позволяет осуществлять перемещение насадки в направлении, перпендикулярном направлению движения объектива при фокусировке.

Фиксатор объекта представляет собой кювету, собираемую вручную из предметного стекла с закрепленными образцами и покровного стекла, и заполняемую иммерсионной жидкостью по всей поверхности образца при той же температуре, что и образцы биотканей.

С помощью цифровой камеры, установленной на тринокуляр, регистрируются видеоизображения исследуемых образцов через определённые промежутки времени по мере уменьшения светорассеяния биоткани. Изображения, полученные с помощью цифровой камеры, переносятся на персональный компьютер, на котором они обрабатываются с помощью соответствующего программного обеспечения.

В качестве количественной характеристики степени просветления образца используется контраст изображения $C(t)$, величина которого вычисляется следующим образом:

$$C(t) = T(t)/T_{\max}, \quad (Л1.3)$$

где $T(t)$ – текущее среднее по площади пропускание в момент времени t , T_{\max} – максимальное среднее по площади пропускание образца.

Относительная погрешность измерения контраста изображения зависит от величины пропускания и составляет: не более 50% при уровне пропускания менее 10%; не более 20% при уровне пропускания менее 50%; не более 10% при уровне пропускания более 60%.

Процесс подавления рассеяния света в биотканях связан с процессом диффузии иммерсионных веществ в образце, поэтому скорость изменения контраста изображения однозначно связана со скоростью диффузии вещества в биоткани. Само увеличение коэффициента пропускания биоткани при введении в них веществ с высоким показателем преломления, близким по значению к показателю преломления коллагеновых волокон, связано с ослаблением рассеяния света на флуктуациях плотности благодаря выравниванию показателей преломления базового вещества и коллагеновых волокон. Для количественного описания процесса диффузии просветляющего вещества в ткань мы используем скорость изменения контраста C изображения во времени $V(t)$:

$$V(t) = dC(t)/dt. \quad (Л1.4)$$

Исследования показывают, что скорость изменения контраста изображения $V(t)$ хорошо описывается следующим эмпирическим выражением

$$V(t) = F + H \times \exp(-G \times t), \quad (Л1.5)$$

где F , H и G – эмпирические параметры, определяемые структурой биоткани, и характеризуют скорость диффузии иммерсионного агента.

Примеры кинетики иммерсионного просветления различных типов биотканей

На рисунках Л1.4-Л1.12 представлены кинетика просветления различных типов биотканей, а в табл. Л1.1 показаны значения параметров F , H и G и величина начального контраста. Из рис. Л1.4-Л1.12 и таблицы, хорошо видно, что скорость просветления ткани имеет два компонента: зависимый от времени и постоянный.

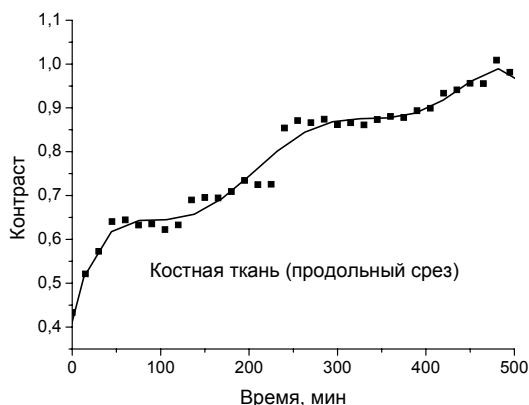


Рис. Л1.4 Кинетика иммерсионного просветления образца костной ткани. Квадратиками обозначены экспериментальные точки, сплошная линия – аппроксимационная кривая.

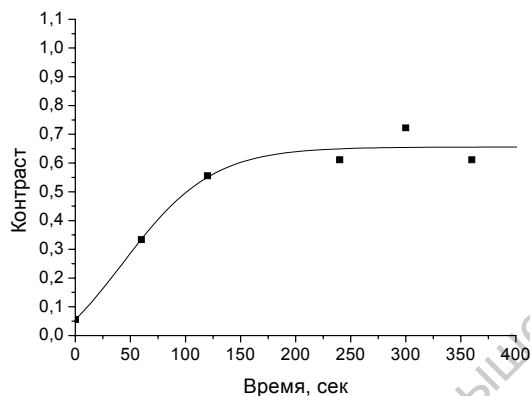


Рис. Л1.5 Кинетика иммерсионного просветления образца склеры глаза человека. Квадратиками обозначены экспериментальные точки, сплошная линия – аппроксимационная кривая.

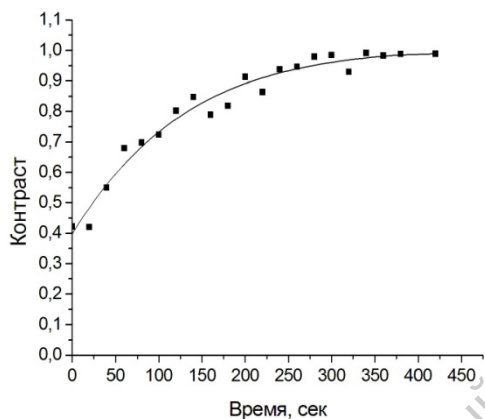


Рис. Л1.6 Кинетика иммерсионного просветления образца tunica testis. Квадратиками обозначены экспериментальные точки, сплошная линия – аппроксимационная кривая.

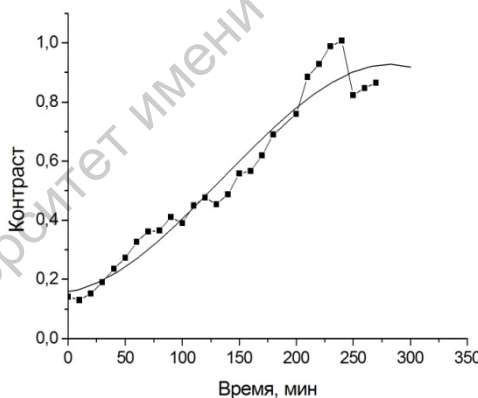


Рис. Л1.7 Кинетика иммерсионного просветления образца аорты. Квадратиками обозначены экспериментальные точки, сплошная линия – аппроксимационная кривая.

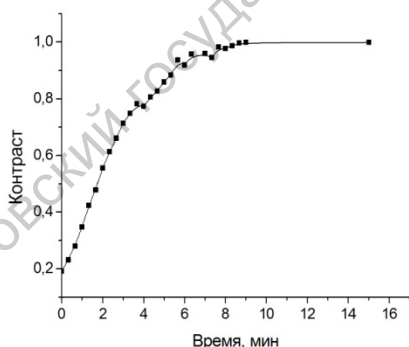


Рис. Л1.8 Кинетика иммерсионного просветления образца вены. Квадратиками обозначены экспериментальные точки, сплошная линия – аппроксимационная кривая.

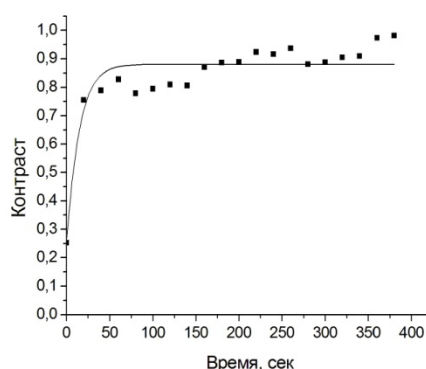


Рис. Л1.9 Кинетика иммерсионного просветления образца мениска. Квадратиками обозначены экспериментальные точки, сплошная линия – аппроксимационная кривая.

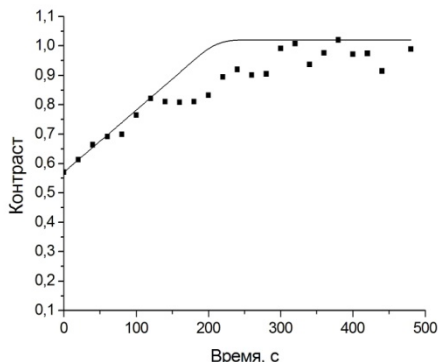


Рис. Л1.10 Кинетика иммерсионного просветления образца сухожилия (продольный срез). Квадратиками обозначены экспериментальные точки, сплошная линия – аппроксимационная кривая.

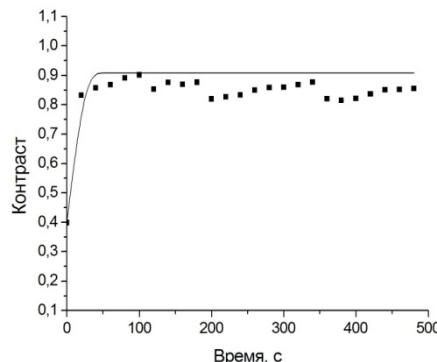


Рис. Л1.11 Кинетика иммерсионного просветления образца сухожилия (поперечный срез). Квадратиками обозначены экспериментальные точки, сплошная линия – аппроксимационная кривая.

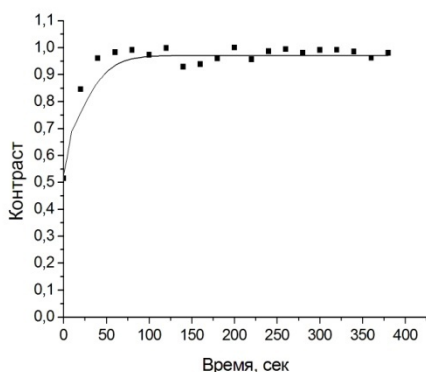


Рис. Л1.12 Кинетика иммерсионного просветления образца хрящевой ткани носовой перегородки. Квадратиками обозначены экспериментальные точки, сплошная линия – аппроксимационная кривая.

Таблица Л1.1

Параметры кинетики иммерсионного просветления различных биотканей без учета осцилляций.

Биоткань	F	H	G	$V(0) = F + H$
Склера	0.70	2.59	6.4	3.28
Testis tunic	0.19	3.49	6.6	3.68
Хрящевая ткань носовой перегородки	-0.57	7.08	10.6	6.51
Мениск коленного сустава	0.00	9.83	17.2	9.82
Вена	-1.24	2.54	0.446	1.3
Сухожилие (продольный срез)	-0,25	1,19	1,37	0,94
Сухожилие (поперечный срез)	-0,13	11,8	20	11,6
Аорта	0.003	0	0	0.003
Кость (продольный срез)	0.002	0	0	0.002

Анализ приведенных данных позволяет сгруппировать ткани по величине параметров F , H , G , например, склеру, хрящ, носовую перегородку и testis tunic можно отнести к одной группе, аорту можно отнести к другой группе, а костную ткань к третьей. Медленным процессом диффузии характеризуются вторая группа биотканей, в которую входят вена и аорта, при этом аорта просветляется в несколько раз медленнее вены. Это в первую очередь связано с тем, что аорта имеет толщину от 1 до 2 мм и высокую плотность

упаковки эластических волокон. Однако самую низкую скорость просветления имеет костная ткань, что можно объяснить тем, что костная ткань в основном состоит из минералов (50 – 60 %), которые обладают значительной плотностью и менее проницаемы для иммерсионных агентов. Костная ткань также имеет 20 – 27 % белков и 13 – 20 % воды. С точки зрения анизотропии физических свойств интересно сравнить различные срезы тканей. Так, например, сравнивая значения параметров F , H , G для различных срезов сухожилий можно сделать вывод, что диффузия вдоль коллагеновых волокон идет с существенно большей скоростью, чем поперек их. Под продольным срезом образца мы понимаем срез, сделанный вдоль коллагеновых волокон, а под поперечным – поперек коллагеновых волокон. Различия в скоростях просветления поперечного и продольного срезов сухожилия можно объяснить его строением, которое по своей природе явно анизотропное и вдоль волокна физические свойства этой ткани сильно отличаются от физических свойств, измеренных поперек коллагеновых волокон.

Экспериментальная часть

Описание работы с установкой

Экспериментальная установка показана на рис. Л1.3. Основным отличием настоящей экспериментальной установки от описанной выше заключается в цифровой камере. В данном случае используется камера VideoScan ICX 249 с платой обработки изображения VS 2001 UG, которая установлена на стандартном микроскопе ЛОМО ЛЮМАМ РПО – 11 и подключена к персональному компьютеру. Работа с экспериментальной установкой условно может быть разбита на отдельные этапы:

- работа с микроскопом;
- работа с цифровой камерой;
- работа с программным обеспечением.

Подробное описание работы с микроскопом дано в его паспорте, и поэтому здесь не проводится.

Электропитание цифровой камеры осуществляется через плату обработки изображения, которая установлена на материнской плате персонального компьютера. Поэтому при включении компьютера камера оказывается автоматически включенной. Непосредственная работа с цифровой камерой состоит из следующих последовательных шагов.

1. Запуск управляющей программы для обработки. Управляющая программа называется vs-cct.exe и находится на диске С в директории VIEWER_VS-CCT. Войдите в этот каталог и двойным щелчком левой клавиши мыши по файлу vs-cct.exe запустите управляющую программу.
2. Инициализации камеры. При запуске управляющей программы Вы оказываетесь в оболочке, из которой можно управлять цифровой камерой с помощью соответствующих пунктов меню. На рис. Л1.13 показано это меню. Входя в пункт меню «Фреймграбер», нажмите пункт «Инициализация». В этом случае программа запросит указать тип камеры и платы захвата изображения. Введите параметры по умолчанию (см. рис. Л1.14).

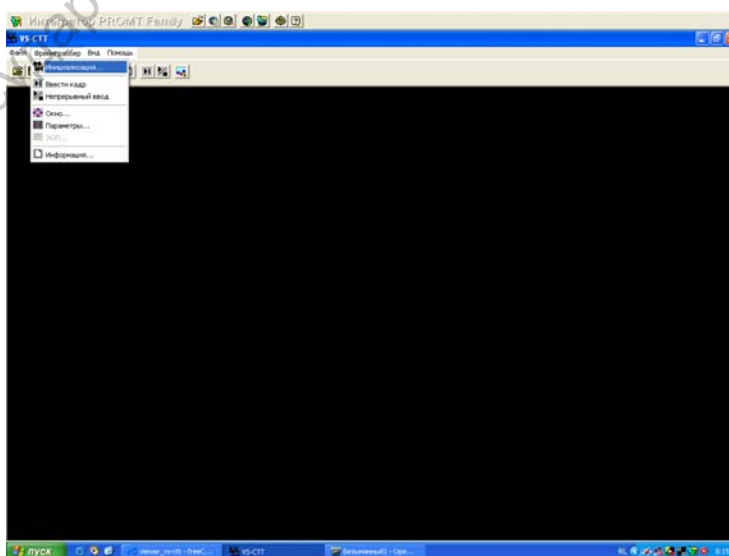


Рис. Л1. 13 Инициализация цифровой камеры

3. Установка усиления камеры. Одним из основных достоинств этой камеры является возможность ручного управления параметрами устройства. Одним из параметров, который можно изменять при работе с различными уровнями освещенности, является усиление. Чтобы изменить этот параметр необходимо войти в пункт меню «Фреймграбер» и выбрать подпункт «Параметры» и далее - «Усиление». Передвигая бегунок мышью или курсорными клавишами, можно изменять уровень усиления сигнала (см. рис. Л1.15).
4. Получение изображения. Откройте затвор тринокуляра. Войдите в пункт меню «Фреймграбер» и нажмите подпункт «Непрерывный ввод» (см. рис.Л1.16). После выполнения этих действий Вы должны получить изображение на экране компьютера.
5. Сохранение изображения. Полученное изображение объекта необходимо сохранить в цифровом формате для последующей работы с ним. Для этой цели войдите в пункт меню «Файл» и нажмите подпункт меню «Сохранить» (см. рис. Л1.17). Далее введите имя файла по правилам операционной системы. Файл буде сохранен в BMP – формате в каталоге VIEWER_VS-CCT.

Обработка изображения, полученного с помощью цифровой камеры и сохраненного в виде графического файла необходимо производить с помощью графического редактора типа GIMP или Photoshop. Результатом обработки изображения должно быть среднее значение яркостей пикселей, составляющих исследуемое изображение. Подробное описание работы с графическими редакторами дано в соответствующей литературе и поэтому здесь не приводится.

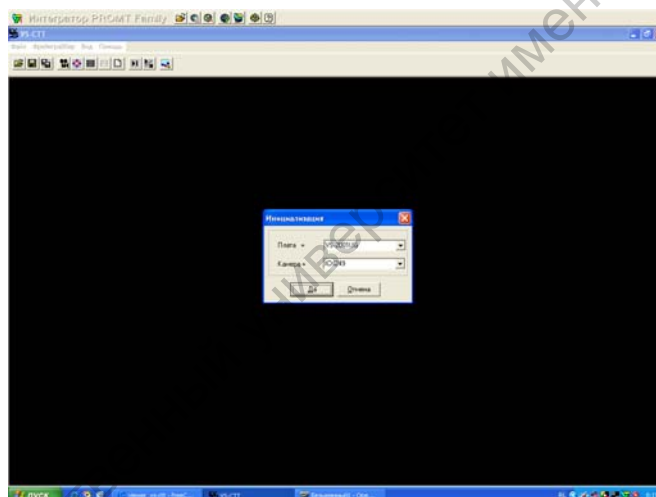


Рис. Л1.14 Параметры инициализации камеры.

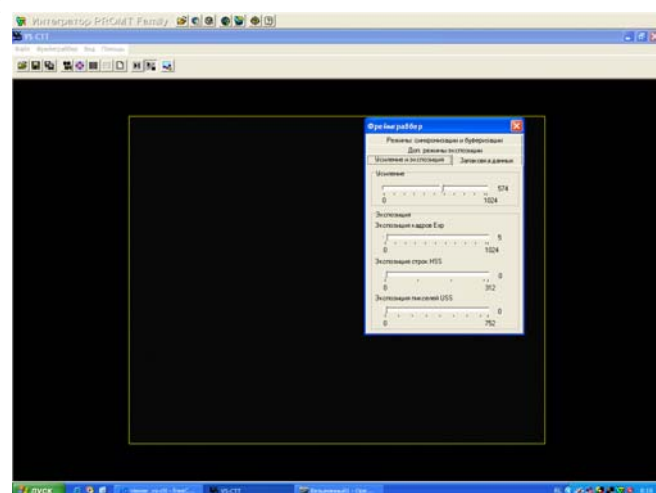


Рис. Л1.15 Изменение параметров цифровой камеры

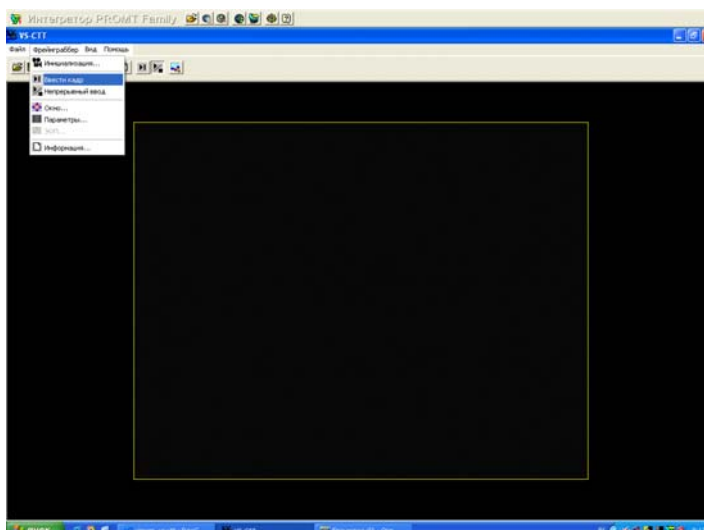


Рис. Л1.16 Получение изображения на экране компьютера

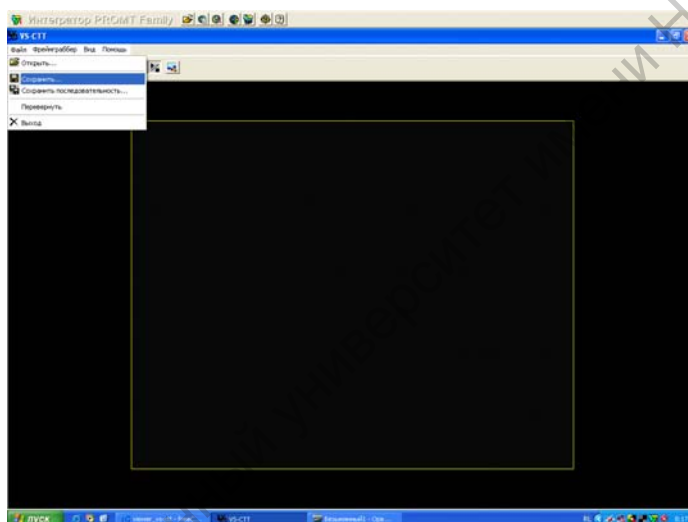


Рис. Л1.17 Сохранение полученного изображения

Замечание 1. При работе с цифровой камерой следует помнить, что значение яркостей пикселей, составляющих изображение при отсутствии объекта на предметном столике микроскопа не должно превышать 255. Для количественной верной обработки результатов измерений необходимо, чтобы это значение яркости не превышало 220 – 230.

Замечание 2. Для правильного вычисления необходимых величин не забывайте снимать значение фона. Это означает, что при выключенном осветителе Вы должны измерить по описанной выше методике соответствующее среднее значение яркостей пикселей, составляющих изображение.

Замечание 3. В ходе выполнения работы необходимо измерить зависимость контраста изображения от времени действия иммерсионной жидкости. Для этой цели используются соотношения (Л1.3) и (Л1.4).

Задание.

В качестве исследуемого объекта удобно использовать филе курицы или хрящевую ткань, которую легко получить из бедренных костей. Для получения исследуемого образца следует выполнить следующую процедуру.

1. Для получения образца используется специальный нож, с помощью которого можно получить срез образца требуемой толщины (0.1 – 0.3 мм). Перед использованием ножа его необходимо поместить в морозильную камеру на 10 – 20 минут и только после этого им можно работать. Прежде чем делать срез биоткани (филе курицы и бедренные кости курицы) требуемой толщины, необходимо часть образца размером не более $1 \times 1 \times 0.5 \text{ см}^3$ поместить в

морозильную камеру также на 10 – 20 минут. После того как нож и образец заморозятся можно делать срез, требуемой толщины.

2. В малую чашку Петри необходимо налить раствор иммерсионной жидкости (рекомендуется использовать 76% раствор тразографа или верографина). Предварительно раствор иммерсионной жидкости должен быть нагрет до температуры 36 – 37°C. После этого исследуемый образец помещают на предметный столик микроскопа.
3. В течение 30 минут (через каждые 2 минуты) делают цифровые снимки изображения. Полученную последовательность файлов обрабатывают по описанной выше методике и данные заносят в таблицу (Табл. Л1.2). Результатом вычислений является зависимость пропускания (вычисляется по формуле (Л1.3)) от времени иммерсионного воздействия.

Таблица Л1.2

Зависимость пропускания от времени при воздействии иммерсионной жидкости

Время, мин									
Пропускание T									

4. Вычислить временную зависимость контраста изображения с использованием формулы (Л1.5) и построить график этой зависимости.

Литература.

1. Оптическая биомедицинская диагностика. Под ред. проф. В. В. Тучина М.: Физматлит. 2007. Т.1. С. 560. Т.2. С. 368
2. В.В. Тучин, Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях// М.: ФИЗМАТЛИТ. 2010. 488С.
3. В.В. Тучин, Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике, 2-е издание. Перевод с английского. М.: Физматлит. 2013. 811С.
4. Описание к микроскопу ЛЮОММ РПО – 11.
5. Описание графического редактора GIMP.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

Оценка величины анизотропии показателя преломления биологического образца

Теоретическая часть

Общие положения

Биологические ткани являются оптически неоднородными поглощающими средами со средним показателем преломления большим, чем у воздуха, поэтому на границе раздела биообъект – воздух часть излучения отражается (френелевское отражение), а остальная часть проникает в биоткань. Объемное рассеяние является причиной распространения значительной доли излучения в обратном направлении (обратное рассеяние). Хорошо известно, что основным источником рассеяния света в биотканях является различие в значениях показателей преломления различных компонент биотканей, т.е. между митохондриями, ядром, другими компонентами и цитоплазмой клеток; или внутритканевой жидкостью и структурными элементами соединительной (фиброзной) ткани (коллагеновыми и эластиновыми волокнами). Имеются данные о том, что в зависимости от степени малигнизации (злокачественности) новообразований ткани увеличивается хаотизация клеточных структур, возрастает разброс размеров отдельных клеточных ядер относительно среднего значения, которое также увеличивается от 10 — 12 мкм в норме до 20 — 50 мкм для патологических тканей, одновременно может изменяться и относительный показатель преломления ядро — цитоплазма. Все это ведет к изменению характера рассеяния ткани.

С оптической точки зрения, биоткани (включая и биожидкости: кровь, лимфу и пр.) можно разделить на два больших класса: 1 — сильно рассеивающие (оптически мутные), такие как кожа, мышцы, хрящ, мозг, стенка сосуда, кровь, склера, оптические свойства которых могут быть достаточно хорошо описаны в модели многократного рассеяния скалярных волн в случайно-неоднородной среде с поглощением; 2 — слабо рассеивающие (прозрачные), такие как ткани переднего отрезка глаза (роговица, хрусталик), оптические свойства которых описываются в модели однократного (или малократного) рассеяния упорядоченной среды с плотной упаковкой рассеивателей, которые содержат поглощающие центры.

Ослабление коллимированного (лазерного) пучка света в биоткани происходит по экспоненциальному закону, интенсивность прошедшего коллимированного света может быть оценена на основе закона Бугера–Беера:

$$I(z) = (1 - R) \cdot I_0 \cdot e^{-\mu_t z}, \quad (Л2.1)$$

где R - коэффициент френелевского отражения, при нормальном падении пучка, $R = ((n - 1)/(n + 1))^2$, n — относительный показатель преломления биоткани; I_0 - интенсивность падающего света; $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ - коэффициент экстинкции (коэффициент ослабления), μ_a — коэффициент поглощения, μ_s - коэффициент рассеяния; z — толщина образца.

Интенсивность коллимированного света, проникающего через слой рассеивающей ткани со средней плотностью рассеивателей ρ и толщиной l , определяется соотношением

$$I(z) = I_0 e^{-\rho \sigma_s l}, \quad (Л2.2)$$

где I_0 — интенсивность падающего пучка, а сечение рассеяния

$$\sigma_s = \frac{1}{\rho I_0} \cdot \int I(\theta) d\Omega \quad (Л2.3)$$

Однако скалярное приближение является недостаточным, так как не учитывает векторную природу падающих и рассеянных волн, особенно это существенно для прозрачных тканей. В рассеивающей среде векторный характер волн проявляется как возникновение поляризации у первоначально неполяризованного пучка света или как деполяризация при распространении в среде первоначально поляризованного пучка. При этом информативными параметрами, характеризующими структуру биотканей и ансамблей клеток, являются как степень деполяризации первоначально поляризованного света, характер преобразования поляризации из одного вида в другой, так и появление поляризованного компонента в рассеянном свете при облучении объекта неполяризованным излучением. Состояние поляризации многократно рассеянного света анализируется либо в условиях пространственной диффузии фотонов, когда угловой спектр излучения практически изотропен, либо при мало-угловом рассеянии в средах с крупномасштабными

неоднородностями. Отметим, что анализ состояния поляризации при мало-угловом многократном рассеянии важен для многих задач оптической диагностики биологических сред. При этом среды могут быть представлены в виде случайных систем с дальнедействующими корреляциями флуктуаций диэлектрической проницаемости и, которые показывают когерентные эффекты рассеяния или от которых следует ожидать флуктуации поляризации рассеянного света как от неупорядоченных сред с крупномасштабными неоднородностями.

В практическом плане ожидается, что поляризационные методы должны привести к более простым, по сравнению с временными и фазово-частотными методами, схемам оптической медицинской томографии, а также дать новую информацию о структуре биотканей.

Многие биоткани содержат двулучепреломляющие структуры. Для костной ткани - это минерализованные пучки (кристаллы гидроксиапатита), для мышечной - миозиновые, для кожи - коллагеновые пучки. Для мышечной ткани плотность упаковки пучков выше, чем в костной ткани, а миозиновые волокна в них обладают меньшей величиной двулучепреломления, чем кристаллы гидроксиапатита. Наличие преимущественной ориентации коллагеновых волокон в различных участках роговицы глаза приводит к появлению дихроизма формы. Ориентационная структура коллагеновых пучков дермы кожи чрезвычайно разнообразна даже для небольших геометрических толщин гистологического среза.

Анизотропные оптические свойства большинства биотканей можно легко объяснить ее строением. На рис. 1 представлена модель, соответствующая типичному строению соединительной ткани. Обычно биологическая ткань состоит из коллагеновых, эластиновых, миозиновых и ретикулярных волокон, а также из основного вещества. Характерным компонентом структуры фиброзных тканей являются коллагеновые волокна. Коллагеновые волокна входят в состав разных видов соединительной ткани и определяют их прочность на разрыв. В рыхлой неоформленной волокнистой соединительной ткани коллагеновые волокна располагаются в различных направлениях в виде волнообразно изогнутых тяжей толщиной 1—3 мкм и более. Коллагеновые волокна состоят из пучков параллельно расположенных фибрилл толщиной в среднем 30—100 нм, связанных между собой гликозаминогликанами и протеогликанами. Толщина волокон зависит от числа фибрилл. Основное вещество – это гелеобразная среда, заполняющая пространство между клетками и волокнами соединительной ткани. Показатель преломления коллагеновых волокон находится в пределах 1.44 – 1.47, а показатель преломления основного (базового) вещества – 1.33 – 1.36. Поэтому, исходя из описания строения биоткани, можно сказать, что она обладает оптической анизотропией, обусловленной анизотропией формы. Заметим, что наличие хиральных молекул в составе биотканей (оптически активные белки, например, альбумин, или метаболические вещества, поступающие в ткань, такие как глюкоза) приводят к проявлению не только линейной, но и круговой анизотропии биоткани. Однако для физически достижимых условий в сильно рассеивающих биотканях круговая анизотропия проявляется слабо. По свойствам оптической анизотропии различные типы биоткани можно разделить на три группы: изотропные, показывающие свойства одноосных кристаллов, показывающие свойства двуосных кристаллов. В табл. 1 представлены некоторые биоткани и их тип оптической анизотропии.

Следует отметить, что оптическая анизотропия мышечной ткани, хрящевой ткани, роговицы и частично вены и артерии обусловлена сильным упорядочением рассеивающих свет структурных элементов. С другой стороны, как это показано в табл. Л2.1, патологические ткани не обладают анизотропными оптическими свойствами. Возможно, это связано в первую очередь с тем, что при развитии патологии плотная упаковка белковых волокон и их ориентация нарушается.

Таблица Л2.1

Примеры оптической анизотропии некоторых биотканей.

Изотропные	Свойства одноосного кристалла	Свойства двуосного кристалла
Саркома мышечной ткани; лимфосаркома	Мышцы; вена; аорта; хрящ; роговица	Склера; сухожилие

Измерение показателей преломления биотканей и отдельных ее компонентов является одной из актуальных задач оптики биотканей. Такие исследования ведутся сравнительно давно, однако нельзя сказать, что в литературе можно найти достаточно полную информацию даже о среднем значении показателя преломления отдельных биотканей \bar{n} . Согласно данным, значения \bar{n} для многих биотканей лежат в диапазоне 1.335 - 1.620 для видимого света, например, для рогового слоя кожи $\bar{n} = 1.55$, для эмали зуба 1.62, а для поверхности хрусталика - 1.386. Следует отметить, что результаты *in vitro* и *in vivo* измерений \bar{n} могут существенно отличаться, например, для брыжейки крысы *in vitro* измерения дают

$\bar{n} = 1.52$, а *in vivo* только 1.38. Это означает, что рассеивающие свойства живой и препарированной ткани могут существенно различаться. Для многих биотканей оптические свойства, в том числе и показатель преломления, определяются содержащейся в биоткани водой. Значения показателя преломления воды в широком диапазоне длин волн 0.2 - 200 мкм таковы, для $\lambda = 0.2$ мкм $\bar{n} = 1.396$, 0.5 мкм - 1.335, 2.8 мкм - 1.142, 3.5 мкм - 1.400, 10 мкм - 1.218, 200 мкм - 2.130.

Для отдельных частей клетки значения показателей преломления на $\lambda = 900$ нм могут быть оценены как следующие: среда вне клетки - $n = 1.35$, цитоплазма - $n = 1.37$, мембрана клетки - $n = 1.46$, ядро - $n = 1.39$, меланин - $n = 1.7$.

Измерения показателя преломления некоторых сильно рассеивающих биотканей на $\lambda = 633$ нм с помощью волоконно-оптического рефрактометра показывают, что наибольшее значение \bar{n} из исследованных тканей имеет жировая ткань (1.455), наименьшее - ткань легких (1.380) и печень (1.368), а среднее - кровь и селезенка (1.400), мышечная ткань (1.410) и почки (1.418). Оказалось, что гомогенизация ткани мало влияет на результаты измерений (изменения не превышают ошибку измерений, равную 0.006), коагулированная ткань имеет более высокий показатель преломления, чем нативная (например, для яичного белка \bar{n} изменяется от 1.321 до 1.388), имеется тенденция к снижению показателя преломления при увеличении длины волны света от 400 до 700 нм (например, для мышечной ткани быка в пределах 1.42 - 1.39), что характерно для большинства родственных материалов.

Поскольку лазерное излучение довольно эффективно используется в стоматологии, рассмотрим особенности строения зубной ткани с точки зрения прохождения света через нее. Как известно, в твердой части зуба различают эмаль и дентин. Эмаль является сравнительно прозрачной тканью, поэтому оптические свойства зуба (поглощение, рассеяние, цвет) определяются, в основном, дентином. Дентин построен из основного вещества, пронизанного канальцами. Канальцы берут начало в пульпе, около внутренней поверхности дентина, и веерообразно расходясь, заканчиваются на его наружной поверхности. Внутренний слой стенки дентиновых канальцев содержит много минерализованных, по сравнению с остальным веществом дентина, волокон. Диаметр дентиновых канальцев составляет 1 — 5 мкм, их плотность колеблется в диапазоне $3 \cdot 10^6 - 7.5 \cdot 10^6$ см⁻². Поглотителями в дентине являются белковоподобные молекулы, а рассеивателями - кристаллы гидроксиапатита диаметром 2.0 - 3.5 нм и длиной вплоть до 100 нм. Таким образом, строение зуба представляет собой пучки согласованных природных световодов. Извитая форма световодов определяет высокую эффективность освещения пульпы практически независимо от того, каким образом свет попадает на внешнюю поверхность зуба. Свет, падая на поверхность эмали, рассеивается на неоднородностях и частично захватывается оптическими волноводами, роль которых в эмали выполняют эмалевые призмы, а в дентине - область дентина между канальцами. Волноводы обеспечивают эффективный транспорт световой энергии от поверхности эмали к пульпе. Каждая точка поверхности эмали оказывается оптически связанной с вполне определенной точкой полости зуба. Волноводный эффект существенно более выражен в дентине, чем в эмали.

Рассеяние света на периодических структурах зубной ткани дает информацию о ее строении. Обычно для этих целей используют шлифы зубной ткани. Однако, как показали исследования рассеяния лазерного излучения с $\lambda = 633$ нм, на периодических структурах дентина (свет направляется поперек дентинных канальцев) существующие теоретические модели дифракции света на оптических неоднородностях дентина не в полной мере описывают экспериментальные результаты.

Модели для описания оптических свойств биоткани.

Биоткани оптически неоднородны, поэтому при распространении излучения в них существенную роль играют процессы светорассеяния. Рассеянное излучение несет информацию о формирующих биоткань факторах, таких как размеры и форма структурных элементов, их ориентация, оптические постоянные и другие параметры. Для того чтобы иметь возможность извлечь эту информацию и интерпретировать результаты экспериментов по светорассеиванию, необходимо построить адекватную оптическую модель соответствующей биоткани и на ее основе решить задачу распространения излучения в данной среде. Точная теория о поглощении и рассеянии света биологическими тканями и частицами произвольных размеров и структур отсутствует, однако важную информацию об их оптических свойствах можно получить на основе исследования взаимодействия излучения с соответствующими модельными объектами. Сложность строения биотканей, высокая концентрация рассеивающих частиц, неоднородность их размеров, формы и оптических постоянных делает задачу построения адекватной оптической модели довольно сложной. Можно предположить, что модели, на которых базируются уравнения распространения света, должны выглядеть как можно ближе к реальным объектам. Однако практически этот критерий «похожести» часто может чрезмерно увеличить важность детализации. Основные особенности эффектов

светорассеивания контролируются, главным образом, простыми факторами. Можно считать, что такими факторами для отдельной частицы, в порядке важности, являются размер и форма частицы, главное радиальное распределение массы, т.е. крупная структура, детали внутри этого распределения. Отсюда для многих целей влияние деталей строения на рассеяние будет пренебрежимо мало.

В общем случае, коэффициент рассеяния ткани зависит от соотношения коэффициентов преломления межклеточной жидкости, цитоплазмы, ядра клетки и других органелл; для фиброзных тканей, таких как склера, дерма и мышечная ткань, – от соотношения показателей преломления базового вещества, коллагеновых и эластиновых волокон. Для кровенаполненных тканей, таких как печень, их пропитывание растворами с различной осмотической активностью также может приводить к выравниванию коэффициентов преломления и уменьшению коэффициента рассеяния, но при этом эффект не столь выражен, как для кожи и склеры, поскольку сопровождается заметными изменениями размера клеток вследствие осмотического стресса.

Мягкие ткани образованы плотноупакованными группами клеток, заключёнными в волокнистую матрицу, сквозь которую может фильтроваться тканевая жидкость. В микроскопических масштабах компоненты ткани не имеют чётко выраженных границ. Их можно представить в виде непрерывной структуры с пространственными вариациями коэффициента преломления.

Можно выделить два основных подхода к моделированию биоткани: представление биоткани средой с непрерывным случайным пространственным распределением оптических параметров и представление в виде дискретных рассеивателей. Выбор того или иного подхода диктуется как особенностями исследуемой биоткани, так типом характеристик светорассеяния, которые необходимо получить в результате моделирования. Микроструктура биологических клеток и тканей достаточно сложна и ее трудно описать количественно. Микроструктуру клетки или ткани можно увидеть с помощью световой или электронной микроскопии как пространственные флуктуации плотности, обусловленные вариациями интенсивности и окраски различных структурных компонентов. Многие биологические ткани образованы структурами, размеры которых меняются в широких пределах. Если отсутствует один преобладающий размер структурных элементов, то представление ткани как ансамбля независимых изолированных рассеивателей нецелесообразно. Рассеяние в таких системах можно описать на основе представления о непрерывных случайных флуктуациях коэффициента преломления неоднородностей с различным пространственным масштабом.

Второй подход к моделированию биотканей состоит в представлении их как системы дискретных рассеивающих частиц. Эту модель целесообразно использовать для описания угловой зависимости поляризационных характеристик рассеянного излучения. Примером важнейшей биологической дисперсной системы, полностью отвечающей модели дискретных рассеивателей, является кровь.

Для правильного выбора теоретического метода и приближений для расчета характеристик рассеяния системы частиц необходимо учитывать основные особенности строения биотканей, а именно форму и диапазон размеров отдельных частиц, их показатель преломления и концентрацию.

Достаточно строгое математическое описание процесса распространения немодулированного света в рассеивающей среде может быть сделано с помощью стационарной теории переноса излучения (ТПИ). Теория переноса справедлива для ансамбля достаточно удаленных друг от друга рассеивателей и с успехом применяется при решении ряда практических задач из оптики биотканей. Основное стационарное уравнение ТПИ для монохроматического света имеет вид:

$$\frac{\partial I(\bar{r}, \bar{s})}{\partial \bar{s}} = -\mu_t I(\bar{r}, \bar{s}) + \frac{\mu_s}{4\pi} \int_{4\pi} I(\bar{r}, \bar{s}') p(\bar{s}, \bar{s}') d\Omega', \quad (12.4)$$

где $I(\bar{r}, \bar{s})$ — лучевая интенсивность в точке \bar{r} в направлении \bar{s} , Вт·м⁻²·стерадиан⁻¹ $p(\bar{s}, \bar{s}')$ — фазовая функция рассеяния; $d\Omega'$ — единичный телесный угол в направлении \bar{s}' ; $\mu_s / \mu_t \equiv \Lambda$ — альbedo единичного рассеивателя. Предполагается, что внутри среды отсутствуют источники излучения.

Если процесс переноса излучения исследуется в области $G \subset R^3$, а ∂G — граница области, то граничные условия на ∂G могут быть записаны в общем виде:

$$I(\bar{r}, \bar{s}) \Big|_{(\bar{s} \cdot \bar{n}) < 0} = S(\bar{r}, \bar{s}) + \hat{R} I(\bar{r}, \bar{s}) \Big|_{(\bar{s} \cdot \bar{n}) > 0}, \quad (12.5)$$

где $\bar{r} \in \partial G$; \bar{n} — внешняя нормаль к ∂G ; $S(\bar{r}, \bar{s})$ — лучевая интенсивность падающего света, \hat{R} — оператор отражения.

При наличии в области G отражающих или преломляющих свет поверхностей условия, аналогичные (Л2.5), должны быть заданы на каждой из них.

Практический интерес, как правило, представляет не сама функция $I(\bar{r}, \bar{s})$, а интегралы от нее по некоторым областям фазового пространства (\bar{r}, \bar{s}) . Например, при оптическом зондировании биотканей измеряемой величиной часто является функция распределения выходящего излучения на поверхности среды:

$$\Phi(\bar{r}) = \int_{(\bar{s} \cdot \bar{n}) > 0} I(\bar{r}, \bar{s})(\bar{s} \cdot \bar{n}) d\Omega \quad (Л2.6)$$

где $\bar{r} \in \partial G$.

В задачах дозиметрии оптического излучения в биотканях такой величиной является полная освещенность в точке

$$U(\bar{r}) = \int_{4\pi} I(\bar{r}, \bar{s}) d\Omega \quad (Л2.7)$$

Фазовая функция $p(\bar{s}, \bar{s}')$ описывает рассеивающие свойства среды и представляет собой функцию плотности вероятности для рассеяния в направлении \bar{s}' фотона, движущегося в направлении \bar{s} , т.е. характеризует элементарный акт рассеяния. Если рассеяние симметрично относительно направления падающей волны, тогда фазовая функция зависит только от угла θ между направлениями \bar{s} и \bar{s}' , т.е. $p(\bar{s}, \bar{s}') = p(\theta)$.

Предположение о случайном распределении рассеивателей в среде, что означает отсутствие в структуре биоткани пространственной корреляции, ведет к следующей нормировке:

$$\int_0^\pi p(\theta) 2\pi \sin\theta d\theta = 1 \quad (Л2.8)$$

Во многих практических случаях фазовая функция хорошо аппроксимируется с помощью постулированной функции Хензи–Гринштейна:

$$p(\theta) = \frac{1}{4\pi} \cdot \frac{1-g^2}{(1+g^2-2g\cos\theta)^{3/2}}, \quad (Л2.9)$$

$$g = \langle \cos\theta \rangle = \int_0^\pi p(\theta) \cos\theta \cdot 2\pi \sin\theta d\theta, \quad (Л2.10)$$

θ - угол рассеяния; g - средний косинус угла рассеяния (параметр анизотропии рассеяния). Значение g изменяется в пределах от 0 до 1: $g = 0$ соответствует случаю изотропного (рэлеевского) рассеяния, $g = 1$ - полному рассеянию вперед (рассеянию Ми на крупных частицах).

При учёте векторного характера электромагнитного поля лучевую интенсивность нужно заменить на матрицу, которая описывает не только интенсивность, но и поляризационные свойства излучения, причём μ_s и μ_t также становятся матричными величинами. Необходимо учитывать, в каком порядке входят матрицы в уравнения. Скалярное уравнение (Л2.4) используют в оптике для описания светового излучения в тех случаях, когда можно пренебречь поляризационными эффектами.

Интегродифференциальное уравнение (Л2.4) является сложным для анализа распространения света в рассеивающих средах, поэтому часто оно упрощается путем представления решения в виде сферических гармоник. Такое упрощение приводит к системе из $(N+1)^2$ связанных дифференциальных уравнений в частных производных, известной как P_N приближение. Эта система уравнений может быть сведена к одному дифференциальному уравнению $(N+1)$ порядка. Например, для $N = 1$ необходимы четыре связанных дифференциальных уравнения, которые сводятся к единственному уравнению диффузионного типа. Для изотропной среды оно имеет следующий вид:

$$(\nabla^2 - \mu_d^2)U(\bar{r}) = -Q(\bar{r}), \quad (Л2.11)$$

где

$$\mu_d = \left\{ 3\mu_a (\mu_a + \mu'_s) \right\}^{0.5} \quad (Л2.12)$$

— диффузионный коэффициент (или эффективный коэффициент ослабления);

$$Q(\vec{r}) = D^{-1} \cdot q(\vec{r}), \quad (Л2.13)$$

$q(\vec{r})$ — функция источника, т.е. число фотонов, инжектируемых в единицу объема;

$$D = c [3(\mu_a + \mu'_s)]^{-1} \quad (Л2.14)$$

— коэффициент диффузии фотонов;

$$\mu'_s = (1 - g)\mu_s \quad (Л2.15)$$

— редуцированный (или транспортный) коэффициент рассеяния;

c — скорость света в среде.

Средняя транспортная длина пробега фотона

$$l_\delta \equiv \delta^{-1} = (\mu_a + \mu'_s)^{-1}, \quad (Л2.16)$$

где δ^{-1} — транспортный коэффициент.

Отметим важное обстоятельство, что средняя транспортная длина пробега фотона в среде с анизотропным однократным рассеянием существенно выше длины свободного пробега в среде с изотропным однократным рассеянием: $l_\delta \gg l_{ph}$. Транспортная длина l_δ означает такую длину, на которой фотон теряет свое первоначальное направление.

Диффузионная теория оказывается хорошим приближением в случае малых значений фактора анизотропии однократного рассеяния ($g \leq 0.1$) и больших альбедо ($\Lambda \rightarrow 1$). Для большинства биотканей $g \approx 0.6 - 0.9$, а для крови даже может достигать 0.995, что существенно ограничивает применимость

диффузионного приближения. Считается, что при оптических толщинах объекта, $\tau = \int_0^s \mu_t ds = 10 \div 20$,

диффузионное приближение можно использовать при $g < 0.9$. Диффузионное приближение оказывается также неприменимым вблизи поверхности объекта на входе светового пучка, где преобладает однократное или малократное рассеяние.

Сделаем краткий обзор других решений транспортного уравнения. Если на оптически тонкую ($\tau < 1$) поглощающую (альбедо $\Lambda \ll 0.5$) биоткань падает плоская волна, интенсивность рассеянного поля оказывается много меньше интенсивности проходящей (когерентной) волны, которая описывается простым соотношением (Л2.1) или аналогичным:

$$I_T(s) = I_T(0) \cdot \exp(-\tau). \quad (Л2.17)$$

Это так называемое решение первого порядка. Если пучок узкий (например, лазерный), то такое приближение применимо и для более плотных (более рассеивающих) тканей ($\tau > 1$, $\Lambda < 0.9$). Однако для некоторых тканей в области длин волн терапевтического окна $\Lambda \approx 1$, что делает неприменимым приближение первого порядка даже при $\tau \ll 1$.

Более строгое решение уравнения переноса можно получить методом дискретных ординат (многопоточковая теория), когда уравнение переноса (Л2.4) преобразуется в матричное дифференциальное уравнение для освещенности по многим дискретным направлениям (углам). При увеличении числа углов решение приближается к точному. Можно раскладывать освещенность в ряд по сферическим гармоникам с разделением транспортного уравнения на компоненты для сферических гармоник. При достаточном числе сферических гармоник такой путь также ведет к точному решению. Однако при желании получить достаточно точное решение эти методы требуют объемных вычислений.

В оптике биотканей широкое применение нашли более простые методы решения уравнения переноса, такие как двух-поточковая модель Кубелки — Мунка, трех-, четырех- и семи-поточковые модели. Это эквивалентно представлению многих потоков по методу дискретных ординат только двумя (одномерная задача) или шестью (трехмерная задача) диффузными потоками. Такое представление естественно и весьма плодотворно при лазерном зондировании биоткани, так, например, четырех-поточковая модель представляет собой два диффузных потока, распространяющихся навстречу друг другу (модель Кубелки — Мунка), и два коллимированных лазерных пучка — один падающий, а другой отраженный от задней границы образца. Очевидно, что в модели направление диффузных потоков выбирается совпадающим с соответствующими направлениями лазерных пучков. Семи-поточковая модель - это простейшее трехмерное представление рассеянного излучения и падающего лазерного пучка в полубесконечной среде. Конечно,

простота и возможность очень быстрых расчетов дозы облучения или быстрого определения оптических параметров биоткани (решение обратной задачи рассеяния) даются ценой снижения точности.

Требуемая на практике надежная послойная дозиметрия лазерного излучения внутри биоткани, проблемы оптической диффузной томографии и спектроскопии биообъектов определяют необходимость развития методов решения задач теории переноса излучения для сред с произвольной конфигурацией и любыми граничными условиями. Для решения таких задач перспективен метод Монте - Карло, широко применяемый для численного решения уравнения ТПИ в различных областях знаний (астрофизике, оптике атмосферы и океана и др.). В последние годы успешно развиваются приложения метода Монте - Карло в оптике биотканей. Метод Монте - Карло базируется на численном моделировании транспорта фотонов в рассеивающей среде. Случайное блуждание фотонов внутри образца биоткани прослеживается от точки влета в образец до его поглощения или выхода из образца.

Распределение интенсивности внутри биоткани является функцией коэффициента поглощения μ_a , коэффициента рассеяния μ_s , параметра анизотропии g , а также размеров лазерного пучка. Это приводит к значительным трудностям в количественной дозиметрии излучения при лазерной терапии. Исследования распределения света внутри биоткани со сложной многослойной структурой с целью упрощения анализа могут быть проведены в рамках одномерной теории, которая справедлива, когда размеры лазерного пучка значительно больше глубины проникновения света в ткань, что реализуется для многих видов фототерапии. Типичными примерами многослойной биоткани являются кожа, стенки мочевого пузыря, матки, кровеносных сосудов.

Применение метода Монте - Карло базируется на использовании макроскопических оптических свойств среды, которые предполагаются однородными в пределах небольших объемов ткани. Моделирование не учитывает детали распространения энергии излучения внутри отдельной клетки. Известные алгоритмы позволяют учесть несколько слоев биоткани с различными оптическими свойствами, конечный размер падающего пучка, отражение света от границ раздела слоев.

При высокой точности и универсальности главным недостатком метода Монте - Карло являются большие затраты компьютерного времени. Хотя развитие аппаратных и программных средств вычислительной техники уменьшает роль фактора времени, разработка новых средств лазерной диагностики и терапии требует создания эффективных, сравнительно простых и надежных алгоритмов метода Монте - Карло.

Здоровые биоткани переднего отрезка глаза, такие как роговица и хрусталик, являются исключительно прозрачными в видимой области спектра, что связано с отсутствием сильно поглощающих хромофоров и упорядоченной структурой этих тканей. Рассеяние также является важным при распространении света в тканях глаза. Размеры рассеивателей и расстояние между ними меньше или сравнимы с длиной волны видимого излучения, относительный показатель преломления вещества рассеивателей невелик ("мягкие частицы"). Типичными моделями тканей глаза являются длинные диэлектрические круглые цилиндры (роговица, склера) или сферические частицы (хрусталик), распределенные в изотропном базовом веществе хаотически (склера, мутный хрусталик) или в соответствии с определенным законом (прозрачные роговица и хрусталик). Анализ светорассеяния в тканях глаза может быть выполнен на основе модели однократного рассеяния благодаря малому значению поперечного сечения рассеяния.

При неупорядоченном расположении рассеивателей результирующая интенсивность поля является суммой интенсивностей полей, рассеянных отдельными частицами. В случае упорядоченной системы рассеивателей необходимо складывать не интенсивности, а поля, т.е. учитывать интерференционные эффекты, возникающие в присутствии ближнего порядка рассеивателей. В интегральном виде индикатриса рассеяния (зависимость интенсивности рассеяния от угла рассеяния) для симметричного рассеяния частиц с парной корреляцией описывается выражением:

$$I(\theta) = I_0(\theta) \left\{ 1 + \rho \int_0^{\infty} [g(r) - 1] \exp[i(\bar{s}_1 - \bar{s}_0)\bar{r}] d^3r \right\} = I_0(\theta) F, \quad (Л2.18)$$

где $I_0(\theta)$ - индикатриса изолированной частицы; θ - угол рассеяния; ρ - плотность частиц; $g(r)$ - функция распределения рассеивающих центров (отношение локальной плотности к средней плотности рассеивающих центров (рис. Л2.1) для невзаимодействующих центров $g(r) \rightarrow 1$); \bar{s}_0, \bar{s}_1 - единичные вектора для падающей и рассеянной волн; \bar{r} - радиус-вектор рассеивателя; d^3r - объем рассеивателя; F - учитывает интерференционные эффекты.

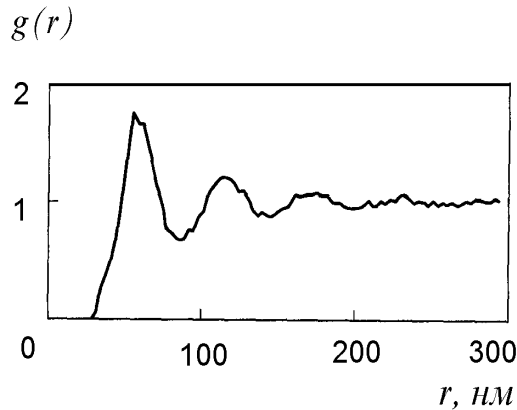


Рис. Л2.1 Функция распределения рассеивающих центров стромы роговицы глаза кролика, восстановленная на основе обработки электронных микрофотографий срезов ткани.

Соотношение (Л2.18) справедливо для монодисперсной системы рассеивателей, и для его использования необходимо знать индикатрису рассеяния на одной частице, $I_0(\theta)$, которая рассчитывается на основе теории Ми или соответствующих приближенных соотношений. Для случайно распределенных в пространстве рассеивателей (например, модель склеры) полидисперсность может быть учтена достаточно просто с использованием гамма-распределения частиц по их радиусам.

Для упорядоченных биотканей, таких как прозрачная роговица и хрусталик, учет полидисперсности является сложной проблемой. В простейшем случае двухфазной системы рассеивателей выражение аналогичное (Л2.18) может быть найдено с использованием четырех структурных функций $g_{11}(r)$, $g_{22}(r)$, $g_{12}(r)$ и $g_{21}(r)$, которые характеризуют взаимодействие частиц одного и разных сортов. Двухфазная система, состоящая из ансамбля одинаковых по размеру малых частиц и небольшой примеси крупных частиц, является хорошей моделью патологической ткани, например, катарактального хрусталика.

Для системы длинных цилиндров интерференционный член F определяется выражением:

$$F = 1 + \rho \int_0^{\infty} J_0(\bar{S} \cdot \bar{r}) \cdot r [g(r) - 1] dr, \quad (\text{Л2.19})$$

а для ансамбля сферических частиц аналогично имеем:

$$F = 1 + 4\pi \rho \int_0^{\infty} r^2 [g(r) - 1] \frac{\sin(\bar{S}r)}{(\bar{S}r)} dr, \quad (\text{Л2.20})$$

где J_0 — функция Бесселя нулевого порядка; $|\bar{S}| = 2k \sin(\theta/2)$; $k = 2\pi n / \lambda_0$.

Матричный способ описания оптических характеристик биоткани.

Для описания распространения света через различные среды используются, как правило, различные варианты записи уравнений Максвелла. В настоящее время наибольшую практическую ценность, с точки зрения простоты расчета оптических характеристик сложных анизотропных сред с плоскопараллельными границами раздела, представляют матричные способы записи уравнений Максвелла.

Рассмотрим преобразование состояния поляризации любого типа (линейной, круговой или эллиптической) в рассеивающей среде с типичными для биотканей параметрами, а затем сравним глубину распространения круговой и линейной поляризации в различных средах. Для этого проанализируем взаимодействие монохроматической плоской волны с изолированным рассеивателем. Состояние поляризации рассеянного света описывается вектором Стокса:

$$\vec{I}_S = M \cdot \vec{I}_i, \quad (\text{Л2.21})$$

где M - 4×4 матрица, описывающая оптические свойства среды (или матрица Мюллера); \vec{I}_i - вектор Стокса падающего излучения.

Вектор Стокса определяется как

$$\vec{I} = \begin{bmatrix} I \\ Q \\ U \\ V \end{bmatrix}, \quad (Л2.22)$$

где

$$I, Q = \langle E_x E_x^* \pm E_y E_y^* \rangle, \quad U, V = \langle E_x E_y^* \pm E_y E_x^* \rangle, \quad (Л2.23)$$

E_x и E_y - ортогональные компоненты вектора электрического поля, в лабораторной системе координат XYZ (при этом считается, что свет распространяется вдоль оси Z), $\langle \rangle$ скобки означают усреднение по времени. В результате рассеяния на частице свет в общем случае становится эллиптически поляризованным. Для сферически симметричных частиц из оптически неактивного материала

$$M = \begin{vmatrix} M_{11} & M_{12} & 0 & 0 \\ M_{12} & M_{11} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & M_{33} & M_{34} \\ 0 & 0 & -M_{34} & M_{33} \end{vmatrix} \quad (Л2.24)$$

Элементы матрицы рассеяния света (МРС) зависят от угла рассеяния θ , длины волны, геометрических и оптических параметров рассеивателей.

Степень линейной поляризации рассеянного света через параметры Стокса определяется как

$$P_L = Q_s / I_s \quad (Л2.25)$$

а круговой как

$$P_C = M_{33} / M_{11}. \quad (Л2.26)$$

Для ансамбля взаимодействующих частиц в приближении однократного рассеяния элементы МРС имеют вид:

$$M_{ij}(\theta) = M_{ij}^0(\theta) N F(\theta), \quad (Л2.27)$$

где M_{ij}^0 — элементы МРС изолированной частицы; N — число рассеивателей; $F(\theta)$ — интерференционный член, учитывающий пространственную корреляцию частиц.

Отметим, что нормированные элементы МРС (M_{ij}/M_{11}) не зависят от учета пространственной корреляции рассеивателей и совпадают с элементами МРС для изолированных частиц (предполагается монодисперсная система частиц). Если характер преобразования вектора Стокса на каждом акте рассеяния известен, то можно найти состояние поляризации света после его многократного рассеяния в объемной среде, используя различные приближения теории многократного рассеяния или метод Монте - Карло. В частности, для малых частиц эффекты многократного рассеяния проявляются в нарушении соотношения симметрии для элементов МРС (см. (Л2.24)), $M_{12}(\theta) \neq M_{21}(\theta)$, $M_{33}(\theta) \neq M_{44}(\theta)$, существенно снижается степень линейной поляризации рассеянного излучения при углах, близких к $\pi/2$.

Для системы малых пространственно некоррелированных частиц степень линейной ($i = L$) и круговой ($i = C$) поляризации в дальней зоне света, прошедшего слой толщиной d и первоначально полностью поляризованного (линейно или по кругу), определяется соотношением

$$P_i \cong \frac{2d}{l_s} \sinh(l_s / \xi_i) \cdot \exp(-d / \xi_i), \quad (Л2.28)$$

где $l_s = l/\mu_s$,

$$\xi_i = (\zeta_i \cdot l_s / 3)^{0.5} \quad (Л2.29)$$

- характеристическая длина деполаризации для слоя рассеивателей, $d \gg \xi_i$, $\xi_L = l_s/\ln(10/7)$, $\xi_C = l_s/\ln 2$.

Отсюда следует, что характеристическая длина деполаризации для падающего света с линейной поляризацией больше (в $\sqrt{2}$ раз), чем соответствующая длина для распространения света с сохранением круговой поляризации. Соотношения (Л2.28) и (Л2.29) справедливы и для системы сферических частиц

больших размеров (сравнимых с длиной волны, рассеяние Ми), если заменить l_s на транспортную длину $l_s \equiv 1/\mu'_s$.

Почти все материалы, за исключением монокристаллов, являются в том или ином смысле неупорядоченными. Фрактальная геометрия количественно учитывает случайность и поэтому позволяет характеризовать такие случайные системы, как полимеры, коллоидные агрегаты и пористые материалы. Качественной особенностью фрактальных объектов является присущая им инвариантность основных геометрических особенностей при изменении масштаба (таких, как изменение увеличения в микроскопе). Поскольку многие типы биотканей обладают пространственным самоподобием, фрактальный анализ является мощным средством их исследования. Фрактальные свойства рассеивающих систем сильно влияют на рассеяние ими света. Одна и та же масса частиц может давать небольшое рассеяние в плотном кластере и значительно большее рассеяние во фрактальном кластере. Наиболее яркие проявления фрактальной структуры при рассеянии имеют место в случае многократного рассеяния. Особенности многократного рассеяния на фракталах обусловлены медленным спаданием корреляции плотности частиц. Фрактальные эффекты в многократном рассеянии проявляются уже при рассеянии на фрактальных кластерах с размерами, меньшими длины волны. Статистическое самоподобие подразумевает, что объект образован блоками с внутренней статистической регулярностью, описываемой степенным законом. Структуры биоткани можно представить в виде мультифрактала, сформированного различными типами фрактальных образований. Для костной ткани основными фрактальными элементами являются трабекулы (образования с плоской укладкой минерализованных волокон) и остеоны (области со спиралеобразной ориентацией волокон с углами подъёма от 30 до 60°). Указанные типы фракталов образуют архитектурно-структурную мультифрактальную сеть. Геометрические размеры биофракталов достаточно велики (100–1000 мкм). Во многих случаях фрактальная геометрия даёт ключ к пониманию особенностей светорассеяния таких объектов. Рассмотренные модели микрооптических свойств биотканей могут использоваться в различных областях биомедицинской оптики.

На основе современных представлений о морфологической природе таких оптически активных биотканей, как, например, костная и мышечная ткань, их структуру можно полагать мультифрактальной. Основными компонентами этих структур являются коллагеновые волокна, костные трабекулы (совокупность минерализованных волокон коллагена), а также пучки ориентированных в пространстве волокон миозина. Такие биофракталы обладают схожими кристаллооптическими свойствами – наличием двулучепреломления и преимущественной ориентацией волокон, формирующих направление оси наибольшей скорости. Это позволяет моделировать их свойства как детерминированную совокупность оптически одноосных кристаллов. Способность к преобразованию поляризованно - фазовой структуры лазерного пучка, зондирующего такие объекты, наиболее просто описывает матрица Джонса:

$$\Pi = \begin{vmatrix} \cos^2 \Theta + \sin^2 \Theta \exp(-i\delta), & \cos \Theta \sin \Theta [1 - \exp(-i\delta)] \\ \cos \Theta \sin \Theta [1 - \exp(-i\delta)], & \sin^2 \Theta + \cos^2 \Theta \exp(-i\delta) \end{vmatrix}. \quad (Л2.30)$$

Здесь Θ – угол, характеризующий ориентацию оси наибольшей скорости, которая в свою очередь определяется ориентацией укладки волокон коллагена или миозина; δ – фазовый сдвиг, вносимый оптически активным веществом биофрактала. Однако для экспериментальных исследований более удобным является иной оператор – матрица Мюллера, так как эта матрица определяется путём прямого измерения интенсивностей различно поляризованных компонентов объектного поля. В случае отсутствия светорассеяния существует однозначная взаимосвязь между матрицами Джонса и Мюллера:

$$\begin{aligned} m_{11} &= 0.5(G_{11}J_{11} + G_{21}J_{21} + G_{12}J_{12} + G_{22}J_{22}), \\ m_{12} &= 0.5(G_{11}J_{11} + G_{21}J_{21} - G_{12}J_{12} - G_{22}J_{22}), \\ m_{13} &= 0.5(G_{11}J_{12} + G_{21}J_{21} + G_{12}J_{11} + G_{22}J_{21}), \\ m_{14} &= 0.5i(G_{11}J_{11} + G_{21}J_{21} - G_{12}J_{12} - G_{22}J_{22}), \\ m_{21} &= 0.5(G_{11}J_{11} + G_{12}J_{12} - G_{21}J_{21} - G_{22}J_{22}), \\ m_{22} &= 0.5(G_{11}J_{11} + G_{22}J_{22} - G_{21}J_{21} - G_{12}J_{12}), \\ m_{23} &= 0.5(G_{12}J_{11} + G_{11}J_{12} - G_{22}J_{21} - G_{21}J_{22}), \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 m_{24} &= 0.5i(G_{11}J_{12} + G_{22}J_{22} - G_{21}J_{22} - G_{12}J_{11}), \\
 m_{31} &= 0.5(G_{11}J_{21} + G_{22}J_{11} + G_{12}J_{22} + G_{22}J_{12}), \\
 m_{32} &= 0.5(G_{11}J_{21} + G_{21}J_{11} - G_{12}J_{22} - G_{22}J_{12}), \\
 m_{33} &= 0.5(G_{11}J_{22} + G_{21}J_{12} + G_{12}J_{21} + G_{21}J_{11}), \\
 m_{34} &= 0.5i(G_{11}J_{22} + G_{21}J_{12} - G_{12}J_{21} - G_{22}J_{11}), \\
 m_{41} &= 0.5i(G_{21}J_{11} + G_{22}J_{12} - G_{11}J_{21} - G_{12}J_{22}), \\
 m_{42} &= 0.5i(G_{21}J_{11} + G_{12}J_{12} - G_{11}J_{21} - G_{22}J_{12}), \\
 m_{43} &= 0.5i(G_{21}J_{12} + G_{22}J_{11} - G_{11}J_{22} - G_{12}J_{21}), \\
 m_{44} &= 0.5i(G_{22}J_{11} + G_{11}J_{22} - G_{12}J_{21} - G_{21}J_{12}),
 \end{aligned} \tag{J2.31}$$

где m_{ij} и J_{ij} – компоненты матриц Мюллера и Джонса соответственно; G_{ij} – компоненты матрицы, полученной транспонированием матрицы J , в которой затем каждый матричный элемент заменялся на комплексно-сопряжённый ему. Таким образом, отличные от нуля элементы матрицы Мюллера определяются соотношениями

$$\begin{aligned}
 q_{22} &= \cos^2 \rho + \sin^2 \rho \cos \delta, \\
 q_{23} &= q_{32} = \frac{1}{4} \sin 4\rho - \frac{1}{2} \cos \delta, \\
 q_{24} &= -q_{42} = \cos 2\rho \sin \delta, \\
 q_{33} &= \sin^2 \rho + \cos^2 \rho \cos \delta, \\
 q_{34} &= -q_{43} = \cos 2\rho \sin \delta, \\
 q_{44} &= \cos \delta.
 \end{aligned} \tag{J2.32}$$

На примере роговицы предложена оптическая модель биоткани, представляющая собой многослойную анизотропную систему, число слоёв которой равно числу ламелей (пластин). Ламели расположены параллельно поверхности роговицы. Каждая ламель состоит из коллагеновых волокон, окружённых базовым веществом. В пределах каждой ламели волокна ориентированы параллельно друг другу и плоскости ламели. Поэтому под ориентацией ламели принимается ориентация её оси – линии, параллельной осям образующих её волокон и пересекающую выделенную нормаль к поверхности образца биоткани. Так как многие биоткани в простейшем случае могут быть представлены в виде двух компонентной системы, одна из компонент которой имеет протяжённую форму, то такая система имеет оптическую анизотропию, обусловленную анизотропией формы. Рассмотрим несколько моделей, описывающих строение биоткани с различной взаимной ориентацией ламелей.

В случае, когда ламели по всей толщине ориентированы одинаково, такой образец можно рассматривать как плоскую анизотропную пластинку, ось которой параллельна границе раздела. Пусть на такой слой толщиной d , находящийся в среде с показателем преломления $n_0 = 1.33$, падает плоская электромагнитная волна. С учётом интерференции на границах матрица пропускания такого слоя имеет вид:

$$T = R_{\xi} \times \begin{pmatrix} \cos^2 \chi + Fe^{-i\delta_0} \sin^2 \chi & \sin \chi \cos \chi (1 - Fe^{-i\delta_0}) \\ \sin \chi \cos \chi (1 - Fe^{-i\delta_0}) & \sin^2 \chi + Fe^{-i\delta_0} \cos^2 \chi \end{pmatrix}, \tag{J2.33}$$

где χ – угол ориентации оси пластин относительно оси X (Рис.3) и

$$F = \frac{N_{\perp}(N_{\parallel} + 1)^2 - (N_{\parallel} - 1)^2 \exp(-2ikN_{\parallel}d)}{N_{\parallel}(N_{\perp} + 1)^2 - (N_{\perp} - 1)^2 \exp(-2ikN_{\perp}d)}, \tag{J2.34}$$

$$R_{\xi} = \frac{4N_{\parallel} \exp(-ikn_0d) \exp(-ikN_{\parallel}d)}{(N_{\perp} + 1)^2 - (N_{\parallel} - 1)^2 \exp(2ikN_{\parallel}d)}, \quad (J12.35)$$

$$\delta_0 = k(N_{\perp} - N_{\parallel})d, \quad k = 2\pi/\lambda$$

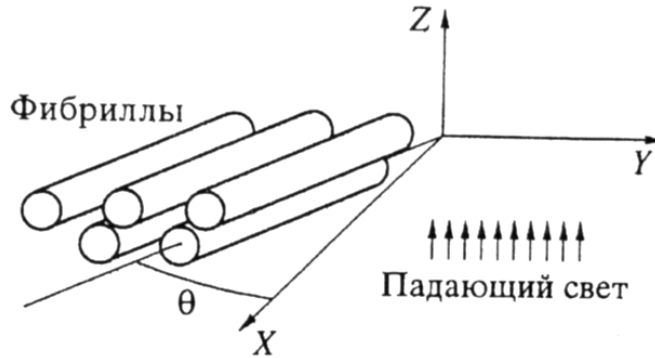


Рис. J12.2 Ориентация фибрилл в лабораторной системе координат.

При соответствующем выборе ориентации системы координат матрица (J12.33) может быть приведена к диагональному виду

$$T = R_{\xi} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & Fe^{-i\delta_0} \end{pmatrix} \quad (J12.36)$$

И, наконец, в том случае, когда ориентация lamелей подчиняется определённым закономерностям, например, lamели могут быть ориентированы по спирали или группироваться вдоль выделенных направлений, биоткань представляется как многослойная анизотропная структура, оптические свойства которой описывает соответствующая матрица Джонса.

При расчётах элементов матрицы Джонса такой системы предположим, что все lamели идентичны. Обозначим толщину lamели через h , число lamелей через L , а тензор относительной диэлектрической проницаемости отдельной lamели через ϵ . Пусть плоская электромагнитная волна с частотой ω распространяется вдоль оси Z и нормально падает на образец. В рассматриваемой модели учёт ориентации lamелей осуществляется поворотом тензора ϵ вокруг своей главной оси, совпадающей с осью Z .

Преобразуем уравнение Максвелла в систему 4 обыкновенных дифференциальных уравнений, исключив из них проекции E_z и H_z ,

$$\frac{d}{dz} \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ H_x \\ H_y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & i\omega \\ 0 & 0 & -i\omega & 0 \\ -i\omega\epsilon_{yx} & -i\omega\epsilon_{yy} & 0 & 0 \\ i\omega\epsilon_{xx} & i\omega\epsilon_{xy} & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ H_x \\ H_y \end{pmatrix} \quad (J12.37)$$

Или в сокращённом обозначении

$$\frac{d\mathbf{X}}{dz} = A\mathbf{X}, \quad (J12.38)$$

Где $\mathbf{X} = (E_x, E_y, H_x, H_y)^T$, T – знак транспонирования.

Для i -й lamели толщиной h решение задачи Коши системы (J12.38) имеет вид

$$\mathbf{X}_i(z_i + h) = M_i \mathbf{X}_i(z_i) = \exp(A_i h) \mathbf{X}_i(z_i) \quad (J12.39)$$

где M_i – матрица передачи i -го слоя. В случае, когда A является матрицей простой структуры, M_i можно вычислить, используя спектральное представление функции от матрицы

$$M_i = \sum_{j=1}^s \exp(\lambda_j h) \prod_{k \neq j} \frac{(A_i - \lambda_k I)}{(\lambda_j - \lambda_k)}, \quad (J2.40)$$

где s – число собственных чисел λ матрицы \mathbf{A} , \mathbf{I} – единичная матрица.
Тогда матрица передачи L -слоистой структуры K^L определяется как

$$K^L = K_L \times \dots \times K_1 \quad (J2.41)$$

Для того чтобы определять граничные условия, выразим магнитную компоненту поля во внешней изотропной среде через характеристический импеданс Z_e и электрическую компоненту поля и учтём, что среда не магнитная (то есть $\mu = 1$)

$$H_y = \frac{E_x}{Z_e} = n\varepsilon_0 c E_x, \quad H_x = \frac{E_y}{Z_e} = -n\varepsilon_0 c E_y, \quad (J2.42)$$

где n – показатель преломления среды, c – скорость света. Далее, обозначив вектор поля падающей волны – \mathbf{X}^i , отражённой волны – \mathbf{X}^r , прошедшей волны – \mathbf{X}^t , отдельно рассмотрим случаи взаимно ортогональных s -поляризации ($E_x = 1, E_y = 0$)

$$\begin{aligned} \mathbf{X}^i &= (1, 0, 0, -n\varepsilon_0 c)^T, \\ \mathbf{X}^r &= (R_{ss}, R_{ps}, -R_{ps}n\varepsilon_0 c, R_{ss}n\varepsilon_0 c)^T, \\ \mathbf{X}^t &= (T_{ss}, T_{ps}, T_{ps}n\varepsilon_0 c, -T_{ss}n\varepsilon_0 c)^T \end{aligned} \quad (J2.43)$$

и p -поляризации ($E_x = 0, E_y = 1$)

$$\begin{aligned} \mathbf{X}^i &= (0, 1, n\varepsilon_0 c, 0)^T, \\ \mathbf{X}^r &= (R_{sp}, R_{pp}, -R_{pp}n\varepsilon_0 c, R_{sp}n\varepsilon_0 c)^T, \\ \mathbf{X}^t &= (T_{sp}, T_{pp}, T_{pp}n\varepsilon_0 c, -T_{sp}n\varepsilon_0 c)^T \end{aligned} \quad (J2.44)$$

где R_{ij}, T_{ij} при $(i, j = p, s)$ – элементы матриц Джонса для отражения и пропускания.

Считая поле стационарным, запишем связь между компонентами полей падающей, отражённой и прошедшей волн на границе $z_0 = 0$ в виде системы 4 неоднородных линейных уравнений

$$\mathbf{X}^i + \mathbf{X}^r = K^L \mathbf{X}^t \quad (J2.45)$$

Подставляя (J2.43) и (J2.44) в (J2.45) и решая полученную систему уравнений, можно получить все элементы матриц Джонса отражения и пропускания биоткани.

Двухшаговая модель описания оптических свойств биоткани.

Обычно при рассмотрении ослабления света образцом биоткани учитывают только рассеяние света на флуктуациях плотности. Однако по своему строению биоткань является анизотропным материалом, оптические свойства которого подобны оптическим свойствам неориентированных образцов жидких кристаллов. Для таких сред определяющее значение величины сечения рассеяния дает рассеяние на флуктуациях ориентации. В общем случае анализ рассеяния света анизотропной средой при корректном учете изменения показателя преломления при изменении ориентации луча и корректном определении фотометрических интенсивностей довольно сложен. Для упрощения рассмотрим случай коллимированного пропускания света образцом и ограничимся предельным случаем малой анизотропии, тогда можно считать, что падающая и рассеянная волны распространяются в изотропных средах. Сначала сравним сечения рассеяния биоткани, обусловленное флуктуациями плотности $\sigma_{\text{изотроп}}$ с сечением рассеяния, которое определяется рассеянием на флуктуациях ориентации $\sigma_{\text{анизотроп}}$. Для оценки порядка величины $\sigma_{\text{анизотроп}} / \sigma_{\text{изотроп}}$ используем соотношение:

$$p = \frac{\sigma_{\text{анизотроп}}}{\sigma_{\text{изотроп}}} = \frac{1}{(qa)^2}, \quad (J2.46)$$

где q – волновой вектор рассеяния, a – характерный размер рассеивателя.

В таблице J2.2 приведены значения a для основных типов структурных элементов биотканей и соответствующие им рассчитанные значения величин p для видимого диапазона длин волн света. Как видно из этой таблицы только рассеяние на достаточно больших структурах полностью может быть объяснено флуктуациями плотности. С другой стороны есть ткани, в которых существенную роль должны играть флуктуации ориентации, и в первую очередь к ним следует отнести костную ткань. Вместе с тем рассеяние света в мышечной ткани, если исходить из данных приведенных в таблице, обусловлено в большей степени флуктуациями плотности. Таким образом, следует сказать, что рассеяние света в

биоткани обусловлено не только флуктуациями плотности, но и флуктуациями ориентации структурных образований биотканей.

Таблица Л2.2

Размеры рассеивателя a и отношение сечений рассеяния p

NN	Структура	Размер a (нм)	Отношение p
1	Микрофибриллы	3,5	520
2	Субфибриллы	10 – 20	64 – 16
3	Фибриллы	50 – 500	3 – 0,03
4	Палочкообразные неорганические кристаллы (в костной ткани)	5	255

Простая модель для расчета оптических свойств биотканей.

Нашей задачей является построение простой феноменологической модели распространения света через биоткань, которая на основе физических (показатель преломления базового вещества, анизотропия показателей преломления коллагена, степень деполяризации ткани) и геометрических (размер коллагеновых волокон и плотность их упаковки) параметров позволит количественно описывать поляризационные спектры коллимированного пропускания биоткани. Мы предлагаем двухшаговую модель. На первом шаге на основе теории рассеяния света с учетом физических и геометрических параметров рассчитывается спектральная зависимость оптической плотности биоткани. На втором шаге с помощью матриц Мюллера и вектора Стокса вычисляются спектры коллимированного пропускания света, прошедшего через образец биоткани, с учетом свойств анизотропии образца и степени деполяризации падающего на него света.

Для описания оптических свойств биоткани с учетом анизотропии ее показателя преломления мы используем модель, представляющую собой анизотропную дисперсную систему со сложной (двухуровневой) пространственной организацией:

1-й уровень – система диэлектрических цилиндров, помещённых в базовое вещество с меньшим показателем преломления.

2-й уровень – последовательность плоскопараллельных анизотропных слоёв, каждый из которых образован параллельными фибриллами и вследствие этого обладает анизотропией формы, подобной одноосной фазовой пластинке с осью, параллельной поверхности слоя. Оптические оси этих слоёв повернуты относительно друг друга на некоторый угол (Рис. Л2.3). Каждая из анизотропных пластин с номером i характеризуется анизотропией показателя преломления $\Delta n_i(\lambda)$ на длине волны λ , толщиной h_i и углом ориентации θ_i оптической оси фазовой пластинки относительно выбранной системы координат. При этом в модели учитывается частичная или полная деполяризация световой волны, прошедшей через биоткань, и ее зависимость от длины волны света, падающего на образец.

Большинство биотканей является анизотропными структурами, проявляющими оптические свойства, схожими с оптическими свойствами нематических жидких кристаллов. В связи с этим, следуя работе, мы используем простое аналитическое выражение для сечения рассеяния на флуктуациях ориентации для расчёта спектра пропускания света прошедшего сквозь биоткань:

$$\sigma_{\text{анизотрон}} = V \left(\frac{\epsilon_a \omega^2}{4\pi c^2} \right)^2 \cdot \frac{k_B T}{K q^2}, \quad (\text{Л2.47})$$

где V – объем образца, K – модуль упругости образца биоткани, T – абсолютная температура, k_B – постоянная Больцмана, λ – длина волны света, ω – циклическая частота световой волны, c – скорость света, q – модуль волнового вектора рассеяния, ϵ_a – диэлектрическая анизотропия.

Для этого случая оптическая плотность образца D определяется следующим соотношением:

$$D = \frac{Nl}{\ln 10} \cdot V \cdot \frac{k_B \Delta n^2 (n_c + n_{\text{баз}})^2 T}{4K\lambda^2}, \quad (\text{Л2.48})$$

где l – толщина всего образца, V – объем образца, N – концентрация коллагеновых волокон, $n_{\text{баз}}$ – показатель преломления базового вещества образца, n_c – показатель преломления рассеивателей (например, коллагеновых волокон), Δn – анизотропия показателей преломления образца. При этом считается, что пропускание образца биоткани для коллимированного пучка света подчиняется закону Бугера. Анизотропия показателей преломления образца биоткани ($\Delta n = (n_e - n_o)$, n_e , n_o – показатели преломления для необыкновенной и обыкновенной волн соответственно) в целом определяется геометрическим фактором и разницей показателей преломления коллагеновых волокон и базового вещества. Если

использовать двухкомпонентную модель, и коллагеновые волокна представить в виде длинных цилиндров, то можно показать, что в общем случае оптическая анизотропия определяется следующим выражением:

$$\Delta n = (n_e - n_o) = \frac{(n_c^2 - n_{\text{баз}}^2)(n_c + n_{\text{баз}})v(1-v)}{(1+v)n_c^2 + (1-v)n_{\text{баз}}^2}, \quad (\text{Л2.49})$$

где v – объемная концентрация коллагеновых волокон.

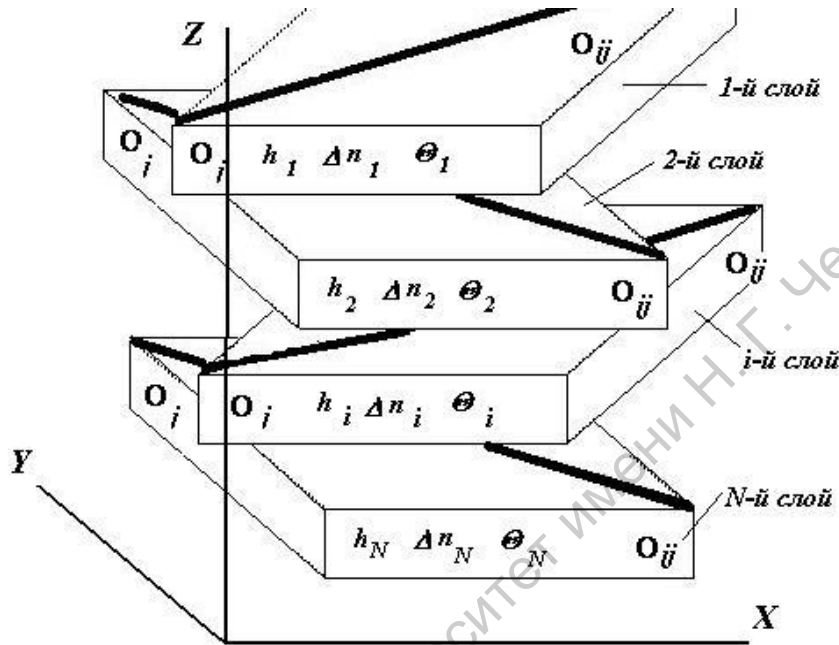


Рис. Л2.3 Слоистая модель анизотропной биоткани. O_i, O_j – оптическая ось i -го слоя биоткани; h_i – толщина i -го слоя биоткани; Δn_i – анизотропия показателей преломления i -го слоя биоткани; Θ_i – угол ориентации оптической оси i -го слоя биоткани.

Заметим, что часто для вычисления величины оптической анизотропии биоткани используют более простое выражение, которое получено в приближении, когда размер неоднородностей существенно меньше длины волны света:

$$\Delta n = (n_e - n_o) = \frac{(1-v)v(n_c - n_{\text{баз}})^2}{vn_c + (1-v)n_{\text{баз}}}. \quad (\text{Л2.50})$$

Однако как следует из таблицы для части биотканей размер неоднородностей сравним с длиной волны, а в некоторых случаях превышает ее. На рис. Л2.4 показаны концентрационные зависимости оптической анизотропии, которые рассчитаны по формулам (Л2.49) и (Л2.50). Из этого рисунка видно, что значения оптической анизотропии, полученные с помощью выражения (Л2.49), значительно выше, чем значения, рассчитанные с помощью выражения (Л2.50). Известно, что величина оптической анизотропии хрящевой тканей, находящейся в условиях иммерсионного просветления при толщине образца 800 мкм составляет 0.002, что близко к значению оптической анизотропии рассчитанной по формуле (Л2.49). Таким образом, для расчета коллимированного пропускания света образцом биологической ткани можно использовать выражения (Л2.48) и (Л2.49).

На втором этапе с использованием уже вычисленного значения оптической плотности можно рассчитать поляризационные спектры пропускания для коллимированного пучка света, прошедшего сквозь биоткань. Образец биоткани представляется набором анизотропных одноосных пластин, обладающих определенной степенью деполяризации света, а их оптические оси повернуты друг относительно друга. Для описания оптических свойств биоткани удобно использовать формализм матриц Мюллера и векторов Стокса. В отличие от других матричных методов расчета оптических характеристик различных систем, этот аппарат позволяет одновременно учесть анизотропию показателя преломления образца и деполяризацию светового излучения исследуемого образца. Рассмотрим оптическую систему, состоящую из плоского образца биоткани, который расположен между двумя скрещенными поляризаторами. На

систему по нормали к поверхности образца биоткани падает световая волна. Выберем лабораторную декартову систему отсчета так, что ось Z этой системы совпадает с направлением распространения света, а ось X этой системы совпадает с максимальным пропусканием входного поляризатора. В этом случае оптические характеристики можно описать с помощью следующего матричного выражения:

$$S_{out} = P_{out} \cdot M_{sam} \cdot P_{in} \cdot S_{in}, \quad (J12.51)$$

где S_{in} – вектор Стокса падающей на системы неполяризованной световой волны единичной интенсивности; S_{out} – вектор Стокса световой волны, вышедшей из системы, первый элемент которого в данном случае равен пропусканию системы; P_{in} , P_{out} – матрицы Мюллера входного и выходного поляризаторов, соответственно, которые имеют следующий вид:

$$P_{in} = \begin{bmatrix} (T_{max}(\lambda) + T_{min}(\lambda))/2 & (T_{max}(\lambda) - T_{min}(\lambda))/2 & 0 & 0 \\ (T_{max}(\lambda) - T_{min}(\lambda))/2 & (T_{max}(\lambda) + T_{min}(\lambda))/2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \sqrt{(T_{max}(\lambda) \cdot T_{min}(\lambda))} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \sqrt{(T_{max}(\lambda) \cdot T_{min}(\lambda))} \end{bmatrix}, \quad (J12.52)$$

$$P_{out} = \begin{bmatrix} (T_{max}(\lambda) + T_{min}(\lambda))/2 & -(T_{max}(\lambda) - T_{min}(\lambda))/2 & 0 & 0 \\ -(T_{max}(\lambda) - T_{min}(\lambda))/2 & (T_{max}(\lambda) + T_{min}(\lambda))/2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \sqrt{(T_{max}(\lambda) \cdot T_{min}(\lambda))} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \sqrt{(T_{max}(\lambda) \cdot T_{min}(\lambda))} \end{bmatrix},$$

где $T_{max}(\lambda)$, $T_{min}(\lambda)$ – соответственно максимальное и минимальное пропускание входного и выходного поляризаторов.

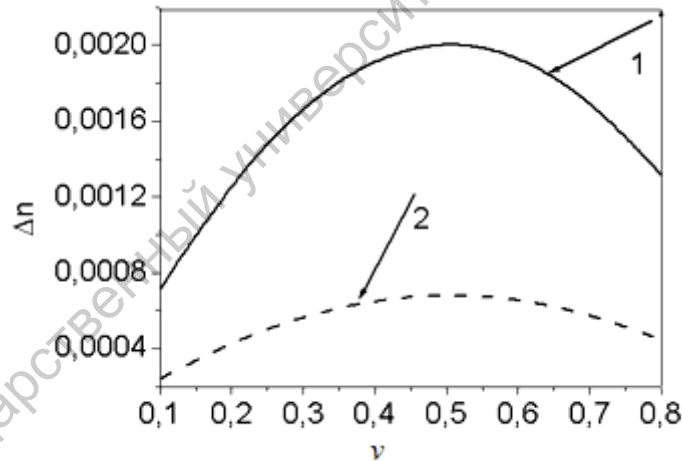


Рис. 12.4 Концентрационные зависимости оптической анизотропии
 1 - оптическая анизотропия рассчитанная по формуле (J12.49);
 2 - оптическая анизотропия рассчитанная по формуле (J12.50).

Матрицу Мюллера для плоскопараллельного образца биоткани M_{sam} можно записать в виде:

$$M_{sam} = (1 - d(\lambda)) \cdot M_{ph} + d(\lambda) \cdot R, \quad (J12.53)$$

где R – матрица Мюллера идеального деполаризатора, которая выражается следующим образом

$$R = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}, \quad (J12.54)$$

$d(\lambda)$ – степень деполяризации образца биоткани ($0 \leq d(\lambda) \leq 1$), M_{ph} – матрица Мюллера для системы плоскопараллельных анизотропных фазовых пластинок, имеющая следующий вид:

$$M_{ph} = 10^{-D(\lambda)} \cdot \prod_{i=1}^N M_i \quad (J12.55)$$

$$M_i = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos^2 2\theta_i + \sin^2 2\theta_i \cdot \cos \delta_i & \cos 2\theta_i \cdot \sin 2\theta_i \cdot (1 - \cos \delta_i) & -\sin 2\theta_i \cdot \sin \delta_i \\ 0 & \cos 2\theta_i \cdot \sin 2\theta_i \cdot (1 - \cos \delta_i) & \sin^2 2\theta_i + \cos^2 2\theta_i \cdot \cos \delta_i & \cos 2\theta_i \cdot \sin \delta_i \\ 0 & \sin 2\theta_i \cdot \sin \delta_i & -\cos 2\theta_i \cdot \sin \delta_i & \cos \delta_i \end{bmatrix}, \quad (J12.56)$$

$$\delta_i = 2\pi \frac{\Delta n_i(\lambda) h_i}{\lambda}, \quad (J12.57)$$

где N – количество однородных анизотропных пластинок, каждая из которых с номером i характеризуется анизотропией показателя преломления $\Delta n_i(\lambda)$ на длине волны λ , толщиной h_i и углом ориентации θ_i оптической оси фазовой пластинки относительно выбранной системы координат. При этом под степенью деполяризации биоткани нами понимается степень деполяризации света, прошедшего сквозь образец. $D(\lambda)$ – это оптическая плотность образца биоткани на длине волны λ , которая учитывает ослабление коллимированного светового потока.

Таким образом, использование описанной выше двухшаговой модели распространения света сквозь биоткань является полностью достаточным для того, чтобы на основе физических (показатель преломления базового вещества, показатель преломления коллагена, объемные концентрации базового вещества и коллагена, дисперсия показателей преломления, степень деполяризации ткани) и геометрических (размер коллагеновых волокон и плотность их упаковки, размер образца) параметров образца количественно описать поляризационные спектры коллимированного пропускания биоткани. Применение подобной модели позволяет подробно исследовать анизотропные свойства биологических объектов, которые имеют большое практическое значение с точки зрения поляризационной томографии.

Результаты моделирования

Экспериментальные спектры коллимированного пропускания образцов получают с помощью спектрофотометра Cary-2415, предназначенного для измерения оптических спектров пропускания и отражения различных, в том числе и сильно рассеивающих объектов. В данном случае экспериментальные и расчетные спектры пропускания образцов получены для коллимированного пучка света. Оптическая схема для измерений коллимированного пропускания, представлена на Рис. J12.5. Для обеспечения коллимированности проходящего излучения используется система из трёх диафрагм диаметром 2 мм, с расстоянием между первой и второй диафрагмами 20 мм, и между второй и третьей – 110 мм.

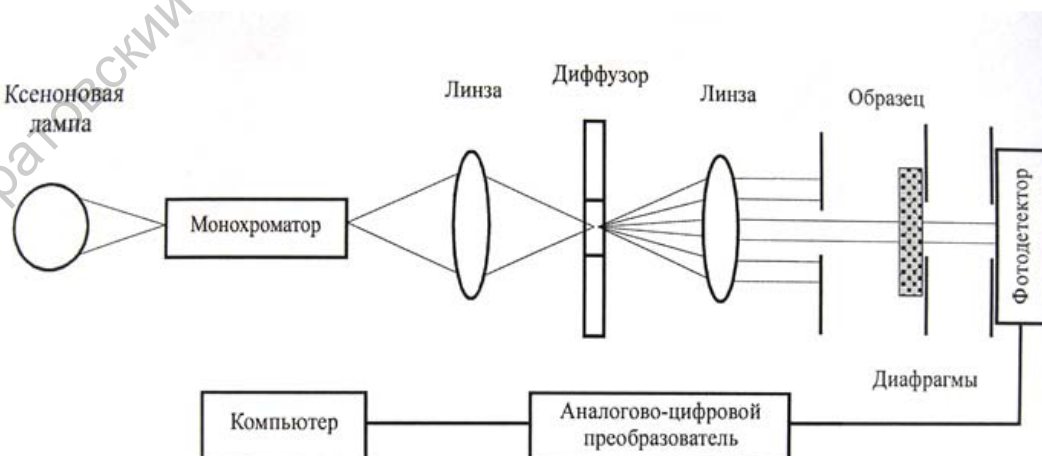


Рис. J12.5 Экспериментальная схема для измерения коллимированного пропускания.

В качестве исследуемых образцов используются тонкие срезы костной, зубной, хрящевой и мышечной ткани размером 1 см × 1 см. Для уменьшения рассеяния света с целью увеличения пропускания образца использована техника иммерсионного просветления. Образцы биотканей были помещены в 76%-раствор тразографа при температуре 37°C. При этом зубная и костная ткань находились в растворе более 8 часов, а хрящевая и мышечная – не более 30 минут. Иммерсионное просветление образцов биоткани необходимо для исследования их анизотропных свойств, которые в обычных условиях трудно наблюдаемы из-за сильного рассеяния (деполяризации). Образец, размещенный между двумя предметными стеклами, помещался в спектрофотометр. Для получения спектров поляризованного пропускания образца на внешние стороны предметных стекол наклеивались поляроидные пленки NPF-250 DU.

Анализ показывает, что одним из основных факторов, определяющих совпадение экспериментальных и расчетных спектров пропускания, является дисперсия показателей преломления вещества рассеивателей и базового вещества. На рисунках Л2.6 – Л2.9 приведены измеренные и рассчитанные по формуле (Л2.48) спектральные зависимости оптической плотности для образцов скелетной мышечной ткани, зубной, костной и хрящевой ткани при иммерсионном воздействии на них 76%-раствора тразографа. При этом в расчетах учитывалась дисперсия показателей преломления коллагеновых элементов и базового вещества.

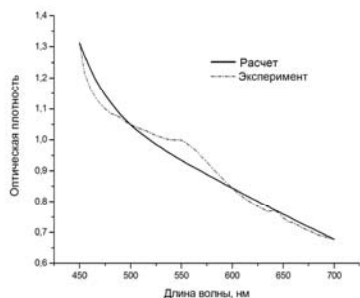


Рис. Л2.6 Экспериментальная и рассчитанная спектральные зависимости оптической плотности скелетной мышечной ткани, при воздействии на неё 76%-раствора тразографа.

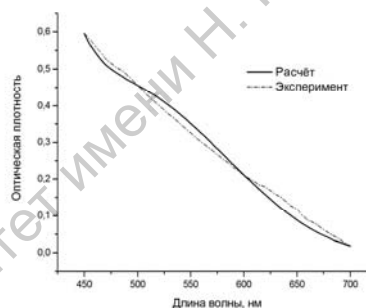


Рис. Л2.7 Экспериментальная и рассчитанная спектральные зависимости оптической плотности зубной ткани, при воздействии на неё 76%-раствора тразографа.

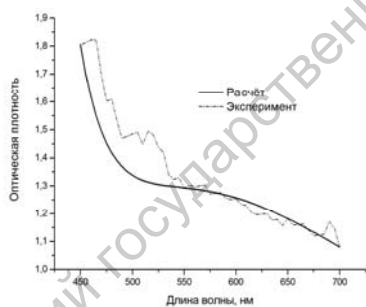


Рис. Л2.8 Экспериментальная и рассчитанная спектральные зависимости оптической плотности костной ткани при воздействии на неё 76%-раствора тразографа.

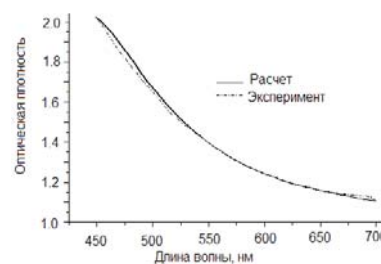


Рис. Л2.9 Экспериментальная и рассчитанная спектральные зависимости оптической плотности хрящевой ткани при воздействии на неё 76%-раствора тразографа.

Спектральная зависимость показателя преломления вещества рассеивателей и базового вещества этих тканей была аппроксимирована с помощью дисперсионной формулы Коши, наиболее часто используемой для такого рода аппроксимаций:

$$n_d = a + \frac{b}{\lambda^2} + \frac{c}{\lambda^4} + \frac{d}{\lambda^6}, \quad (Л2.58)$$

a , b , c и d – параметры, вычисленные путём решения обратной задачи для спектров коллимированного пропускания света биоткани.

На рисунках Л2.10 – Л2.17 представлены соответствующие дисперсионные кривые для образцов мышечной, зубной, костной и хрящевой ткани.

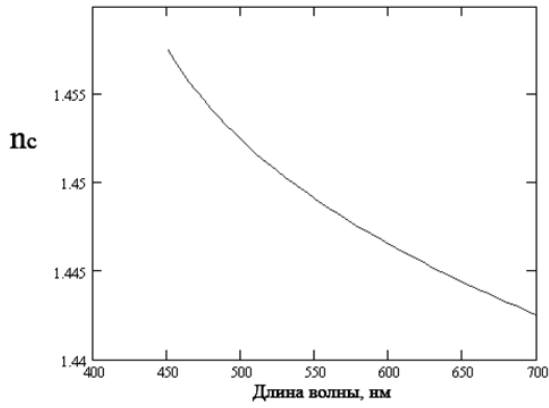


Рис. Л2.10 Дисперсионная кривая среднего показателя преломления рассеивателей скелетной мышечной ткани при воздействии на неё 76%-раствора тразографа.

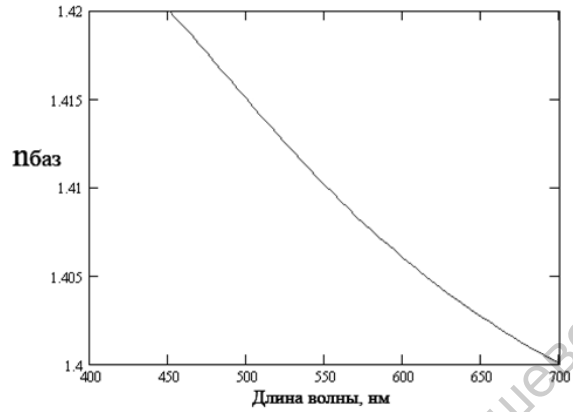


Рис. Л2.11 Дисперсионная кривая показателя преломления базового вещества скелетной мышечной ткани при воздействии на неё 76%-раствора тразографа.

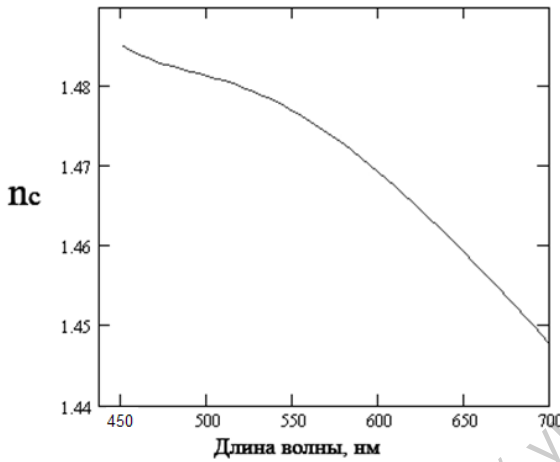


Рис. Л2.12 Дисперсионная кривая среднего показателя преломления рассеивателей зубной ткани при воздействии на неё 76%-раствора тразографа.

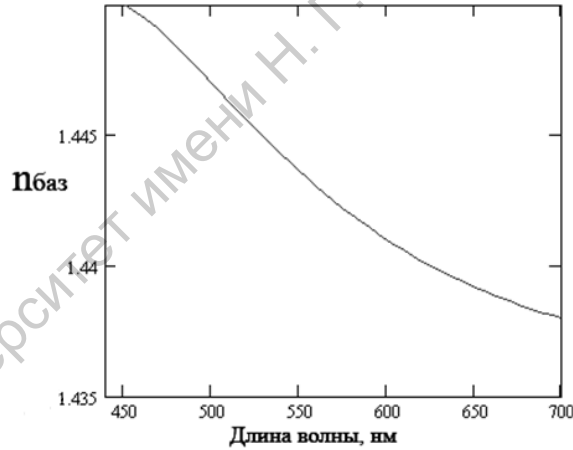


Рис. Л2.13 Дисперсионная кривая показателя преломления базового вещества зубной ткани при воздействии на неё 76%-раствора тразографа.

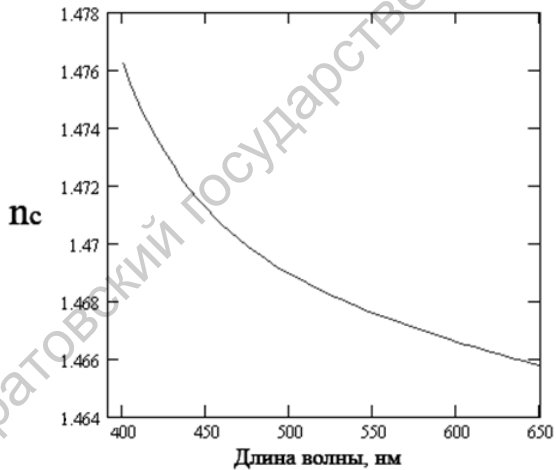


Рис. Л2.14 Дисперсионная кривая среднего показателя преломления рассеивателей костной ткани при воздействии на неё 76%-раствора тразографа.

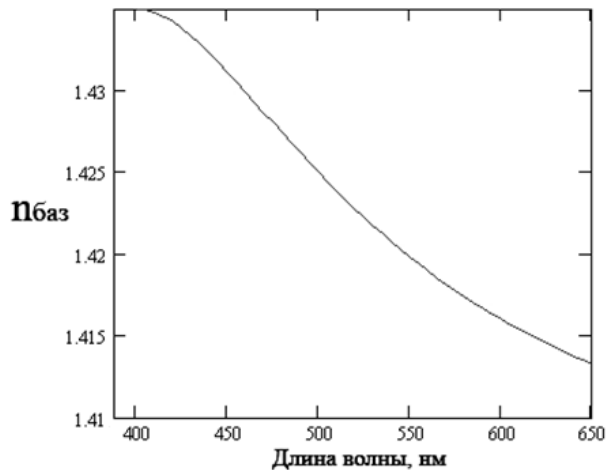


Рис. Л2.15 Дисперсионная кривая показателя преломления базового вещества костной ткани при воздействии на неё 76%-раствора тразографа.

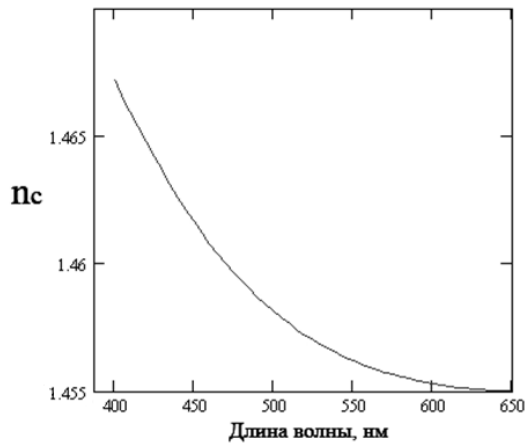


Рис. Л2.16 Дисперсионная кривая среднего показателя преломления рассеивателей хрящевой ткани при воздействии на неё 76%-раствора тразографа.

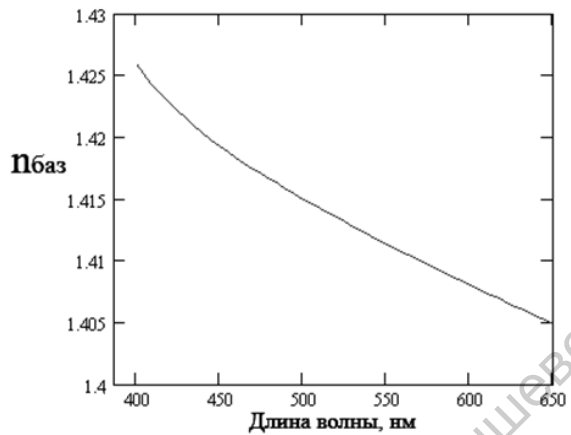


Рис. Л2.17 Дисперсионная кривая показателя преломления базового вещества хрящевой ткани при воздействии на неё 76%-раствора тразографа

Таким образом, из приведённых рисунков можно сделать вывод, что предложенное выражение для вычисления величины оптической плотности при расчете спектров пропускания биотканей (первый шаг моделирования распространения света в биологических образцах) даёт хорошее количественное согласие между теоретическими и экспериментальными данными. Это говорит о том, что в рассмотренных образцах костной, хрящевой, мышечной и зубной ткани существенную роль в рассеянии света играет рассеяние на флуктуациях ориентации структурных элементов.

Если на первом шаге моделирования рассматривается вопрос о вычислении оптической плотности образца биоткани с учетом его анизотропных свойств, то на втором этапе с использованием уже вычисленного значения оптической плотности можно рассчитать поляризационные спектры пропускания для коллимированного пучка света, прошедшего биоткань.

На рисунках Л2.18 – Л2.25 показаны экспериментальные и рассчитанные спектры поляризованного пропускания для просветленных образцов мышечной, зубной, костной и хрящевой ткани при параллельной и скрещенной ориентации поляризатора и анализатора.

Рассчитанный спектр поляризованного пропускания мышечной ткани с учетом ее анизотропных свойств был получен для следующих физических параметров образца: $N = 3$; $\Delta n_1 = \Delta n_2 = \Delta n_3 = 0.01$; $\theta_1 = 11^\circ$; $\theta_2 = 19^\circ$; $\theta_3 = 4^\circ$; $h_1 = h_2 = h_3 = 0.1$ мм. Для зубной ткани спектры получены при следующих параметрах $N = 1$; $\Delta n = 0.08$; $\theta = 7^\circ$; $h = 0.2$ мм. Для костной ткани следующие параметры: $N = 1$; $\Delta n = 0.04$; $\theta = 13^\circ$; $h = 0.3$ мм. Для хрящевой ткани соответственно: $N = 2$; $\Delta n_1 = \Delta n_2 = 0.02$; $\theta_1 = 4^\circ$; $\theta_2 = 12^\circ$; $h_1 = h_2 = 0.3$ мм. В расчетах использовалось выражение для зависимости степени деполаризации биоткани от длины волны света, которое было получено методом подгонки:

$$d(\lambda) = A - \frac{B}{\sqrt{\pi/2}} \exp \left(-2 \cdot \left(\frac{\lambda - C}{D} \right)^2 \right), \quad (\text{Л2.59})$$

где λ - длина волны света, выраженная в нм; A , B , C и D – варьируемые параметры, значения которых зависят от типа исследуемого образца. В табл. Л2.6 представлены параметры моделей для четырёх типов биотканей.

Как видно из сопоставления экспериментального и рассчитанного спектров пропускания вышеприведённых тканей с учетом их анизотропных свойств, предложенная физическая модель даёт удовлетворительное количественное описание оптических характеристик образца биоткани. Отклонение физических параметров в расчетной модели, от указанных выше, приводит только к увеличению расхождения между экспериментальными и рассчитанными спектрами.

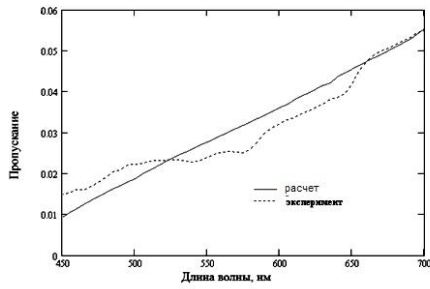


Рис. Л2.18 Экспериментальный и рассчитанный спектры поляризованного пропускания для просветленного образца скелетной мышечной ткани при параллельной ориентации поляризатора и анализатора.

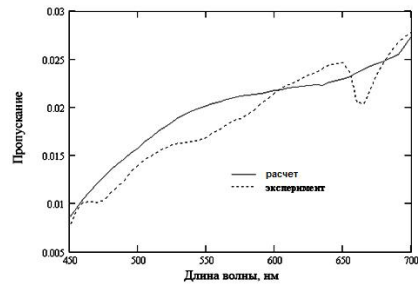


Рис. Л2.19 Экспериментальный и рассчитанный спектры поляризованного пропускания для просветленного образца скелетной мышечной ткани при скрещенной ориентации поляризатора и анализатора.

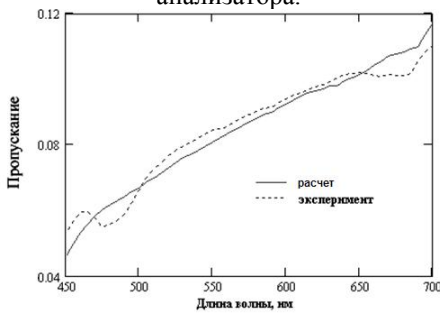


Рис. Л2.20 Экспериментальный и рассчитанный спектры поляризованного пропускания для просветленного образца зубной ткани при параллельной ориентации поляризатора и анализатора.

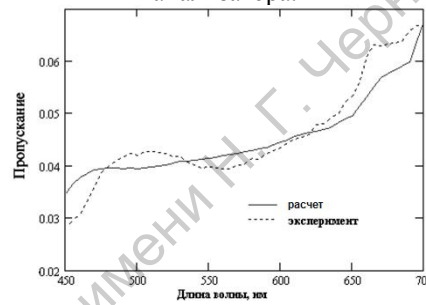


Рис. Л2.21 Экспериментальный и рассчитанный спектры поляризованного пропускания для просветленного образца зубной ткани при скрещенной ориентации поляризатора и анализатора.

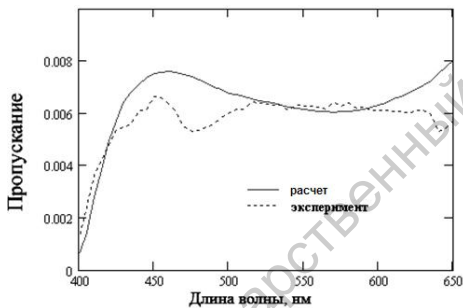


Рис. Л2.22 Экспериментальный и рассчитанный спектры поляризованного пропускания для просветленного образца костной ткани при параллельной ориентации поляризатора и анализатора.

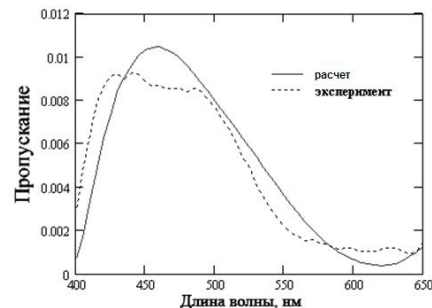


Рис. Л2.23 Экспериментальный и рассчитанный спектры поляризованного пропускания для просветленного образца костной ткани при скрещенной ориентации поляризатора и анализатора.

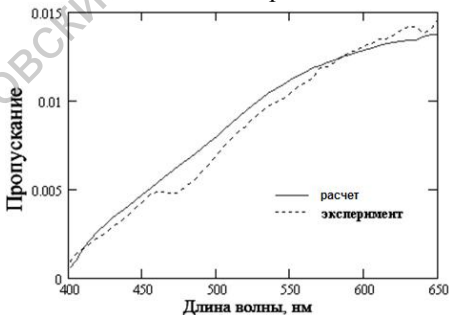


Рис. Л2.24 Экспериментальный и рассчитанный спектры поляризованного пропускания для просветленного образца хрящевой ткани при параллельной ориентации поляризатора и анализатора.

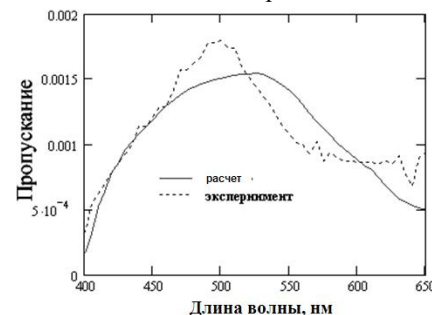


Рис. Л2.25 Экспериментальный и рассчитанный спектры поляризованного пропускания для просветленного образца хрящевой ткани при скрещенной ориентации поляризатора и анализатора.

Таблица Л2.6

Параметры модели для выражения степени деполяризации различных типов биотканей.

Параметр	Скелетная мышечная ткань	Хрящевая ткань	Костная ткань	Зубная ткань
<i>A</i>	1.07	1.41	3.11	3.52
<i>B</i>	1.31	1.75	3.89	3.948
<i>C</i>	661	691	650	649
<i>D</i>	233	719	645	644
Количество пластин в модели	3	2	1	1
(Δnd), мкм	3	1.8	6	5

Экспериментальная часть

Описание экспериментальной установки.

Для исследования оптических свойств биоткани используется экспериментальная установка, включающая микроскоп, оснащенный цифровой камерой, которая подключена к персональному компьютеру (Рис. Л2.26). Основными элементами установки являются:

- поляризационный микроскоп ПОЛАМ Р-11(ЛОМО) с тринокулярной насадкой, которая позволяет одновременно наблюдать изображение непосредственно в окуляры и передавать изображение на систему регистрации;
- система регистрации изображения;
- персональный компьютер.

Приемы работы с поляризационным микроскопом подробно описаны в его технической документации, которую необходимо изучить перед началом работы с микроскопом. Система регистрации изображения состоит из CCD камеры KT&C DSP Color, установленной с помощью адаптера на тринокуляр микроскопа, и платы захвата изображения AverMedia EZCapture. В этом разделе несколько подробнее остановимся на основных приемах работы с программным обеспечением, позволяющим делать элементарную обработку цифрового изображения микрообъектов.

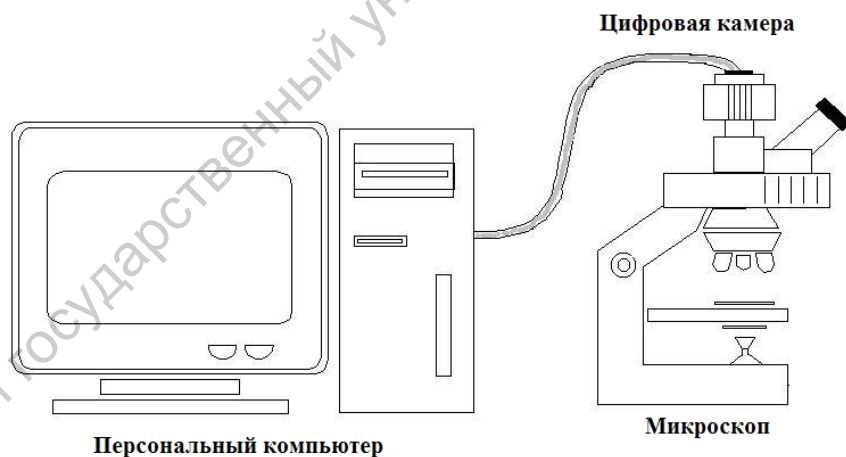


Рис. Л2.26 Схема экспериментальной установки.

Работа с экспериментальной установкой состоит из нескольких частей.

Часть первая – работа с микроскопом, которая подробно описана в техническом описании к микроскопу.

Часть вторая. Управление цифровой камерой осуществляется с помощью программы EZCapture, которая запускается с помощью соответствующей иконки, расположенной в закладке «AverMedia EZCapture» кнопки «Пуск». Перед запуском программы CCD камера должна быть подключена к электросети с помощью блока питания. Включите камеру и запустите программу EZCapture. На экране компьютера появится окно управляющей программы, скрин – шот которой показан на рис. Л2.27.

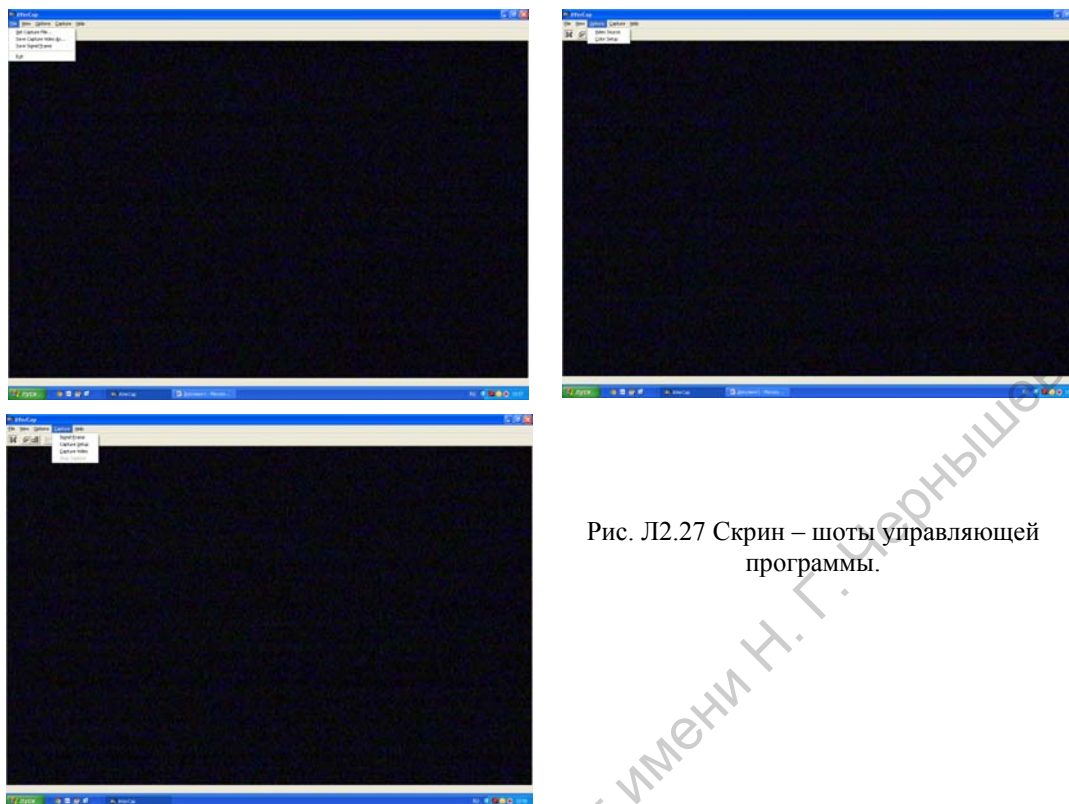


Рис. Л2.27 Скрин – шоты управляющей программы.

Сохранение файла изображения производится с помощью опции «File» (закладка «Set Capture File»). Выбор источника изображения и опций изображения делается с помощью пункта меню «Options», а с помощью пункта меню «Capture» выбираются опции для съемки изображения. Работа с программным обеспечением проста и интуитивно понятна, но более подробно описана на сайте изготовителя платы захвата изображения.

Примечание. Если при включенной CCD камере на экране компьютера не появляется изображение объекта, то проверьте, открыт ли затвор тринокуляра. Если после этого действия изображение не появилось, то обратитесь к преподавателю.

Задания.

В качестве исследуемого объекта удобно использовать *филе курицы*. Для получения исследуемого образца следует выполнить следующую процедуру. Для получения образца используется специальный нож, с помощью которого можно получить срез образца требуемой толщины (0.1 – 0.3 мм). Перед использованием ножа его необходимо поместить в морозильную камеру на 10 – 20 минут и только после этого им можно работать. Прежде чем делать срез биоткани требуемой толщины, необходимо часть образца размером не более $1 \times 1 \times 0.5 \text{ см}^3$ поместить в морозильную камеру также на 10 – 20 минут. После того как нож и образец заморозятся можно делать срез, требуемой толщины. После получения среза биоткани, его располагают на предметном стекле, а сверху прижимают покровным стеклом. Образец в таком виде помещают на предметный столик поляризационного микроскопа. В исследованиях оптических свойств биотканей рекомендуется использовать 2-х или 8-и кратные объективы.

1. *Измерение размеров неоднородностей в биотканях.* Поместите на предметный столик микрометрический тест – объект и получите его изображение. При этом изображение тест – объекта должно быть получено без ввода анализатора микроскопа в рабочее положение. Поворотом предметного столика, расположите тест – объект так, чтобы его изображение было расположено параллельно длинной стороне дисплея компьютера. Сохраните это изображение в файл. Затем поверните тест – объект на 90° и снова сохраните изображение в следующий файл. Запустите графический редактор Paint и рассчитайте, сколько пикселей изображения приходится на единицу длины тест – объекта в продольном и поперечном расположении. Запишите эти данные. Этот процесс называется калибровкой изображения. Уберите с предметного столика тест объект. Введите в рабочее положение анализатор микроскопа и ориентируйте его в скрещенное положение с поляризатором (в этом положении изображение, получаемое от цифровой камеры должно иметь минимальную яркость). Расположите на предметном столике исследуемый образец биоткани. При

этом исследуемый образец биоткани должен иметь неоднородное и разноцветное изображение. В данном случае окраска образца обусловлена его анизотропными оптическими свойствами, а неоднородность окраски образца связана с его строением. Сохраните полученное изображение образца в файл. Используя калибровку изображения, рассчитайте средние размеры неоднородности образца биоткани в поперечном и продольном направлениях. Результаты запишите.

2. *Оценка значения оптической анизотропии образца биоткани.* Для оценки значения оптической анизотропии образца биоткани предлагается использовать метод сравнения, который основан на том, что если анизотропные образцы имеют одинаковую поляризационную окраску, то значения оптической анизотропии у таких образцов считается одинаковой. Отметим, что мы используем визуальную оценку. Поэтому возникает вопрос: как все вышеперечисленные схемы согласуются с физиологией глаза человека? Ответ прост – практически никак. Хотя рецепторы глаза действительно воспринимают красный, зелёный и синий, есть некоторые особенности восприятия, не учитываемые схемой RGB. Однако же в некоторых случаях предельно точное отображение цвета может оказаться необходимым. Цветовые координаты и способ их вычисления подробно описаны в данном пособии в лабораторной работе №4 .

В наших дальнейших исследованиях предлагается использовать цветовые координаты исследуемого образца, которые получаются из рис. Л2.28 путем визуального сравнения цвета образца с цветом, указанным на этом рисунке. Для исследования оптической анизотропии биоткани предлагается использовать только хорошо окрашенные и максимальные по размеру области образца. Лучше всего выделить только одну область, которая имеет максимально насыщенный цвет и максимальный размер. Таким образом, в результате обработки файла изображения, полученного в первом задании, мы получаем цветовые координаты (x, y) окрашенной области биоткани. Далее нам необходимо получить цветовые координаты эталонного образца с известной оптической анизотропией. В качестве эталонного образца лучше всего использовать однородно ориентированный нематический жидкий кристалл, так как он имеет очень высокую оптическую анизотропию показателей преломления, которую достаточно просто менять с помощью управляющего электрического поля. Поэтому нами предлагается следующий подход к определению оптической анизотропии биоткани. Пусть мы имеем однородный нематический жидкий кристалл, помещенный между двумя скрещенными идеальными поляризаторами, тогда интенсивность света, прошедшего сквозь такую систему можно определить следующим образом:

$$I = I_0 \sin^2 2\beta \sin^2\left(\frac{\Delta\varphi}{2}\right), \Delta\varphi = \frac{2\pi\Delta n(\lambda)d}{\lambda}, \quad (\text{Л2.60})$$

где I, I_0 – интенсивности света прошедшего сквозь систему и падающего на нее соответственно; Δn – разность показателей преломления жидкого кристалла; β – угол ориентации оси поляризатора относительно оптической оси жидкого кристалла.

Если учесть, что пропускание образца T по определению – это отношение интенсивностей света прошедшего через образец (I) к интенсивности света, падающего на него (I_0), цветовые координаты образца можно вычислить следующим образом:

$$X = \int_{400}^{700} X(\lambda)T(\lambda)d\lambda, Y = \int_{400}^{700} Y(\lambda)T(\lambda)d\lambda, Z = \int_{400}^{700} Z(\lambda)T(\lambda)d\lambda \quad (\text{Л2.61})$$

и соответственно координаты цвета равны:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z}, y = \frac{Y}{X+Y+Z}. \quad (\text{Л2.62})$$

Следовательно, зная спектральную зависимость оптической анизотропии жидкого кристалла, толщину слоя жидкого кристалла и угол ориентации оптической оси жидкого кристалла относительно оси поляризатора, можно рассчитать цвет образца, который соответствует определенному набору значений оптических параметров системы. Изменяя толщину слоя жидкого кристалла и угол оси ориентации жидкого кристалла относительно оси поляризатора, можно уравнивать координаты цвета биоткани и эталона (жидкого кристалла).

Таким образом, задание для нахождения значения оптической анизотропии биоткани может быть сформулировано следующим образом. Используя формулы (Л2.60) – (Л2.62) разработать программу для расчета координат цвета образца. Спектральная зависимость оптической анизотропии жидкого кристалла может быть рассчитана по известной формуле Коши, учитывая данные представленные в таблице Л2.7. В таблице Л2.8 приведены необходимые данные для расчета цветовых координат.

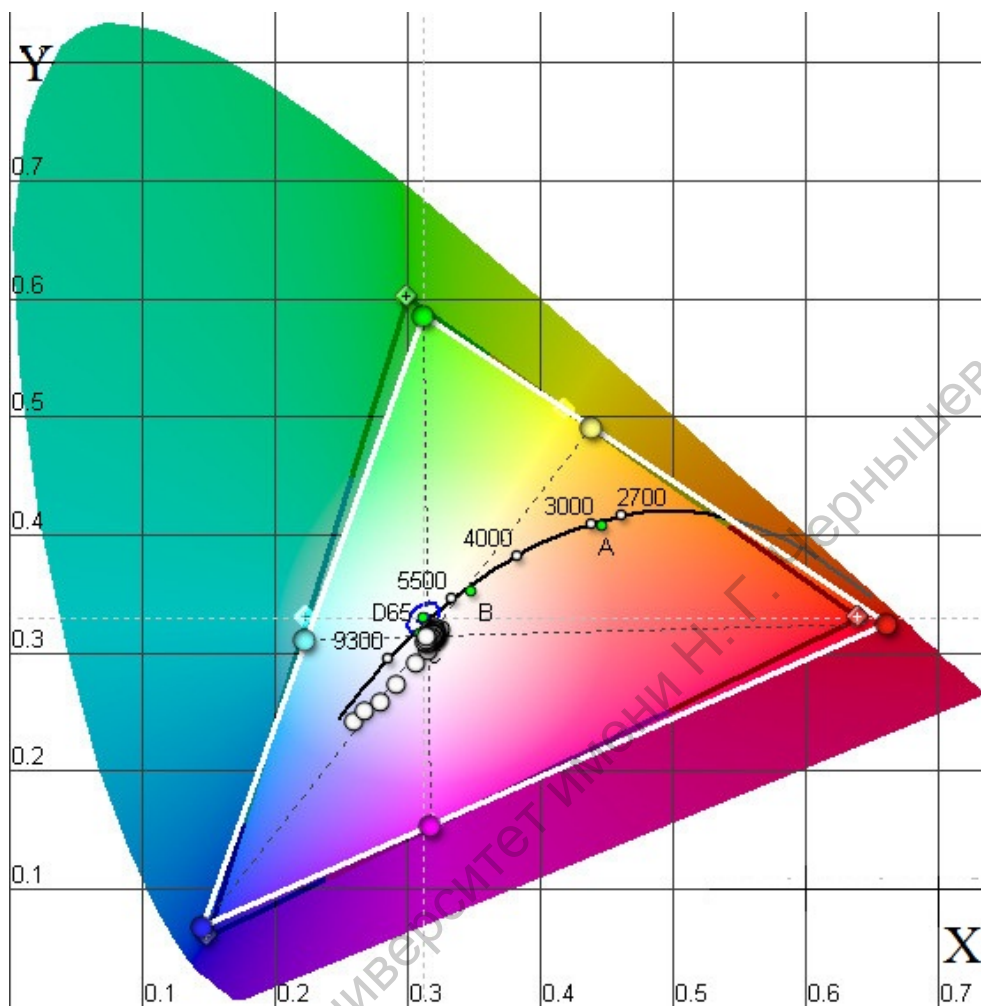


Рис. Л2.28 Цветовой треугольник.

Изменяя значение толщины слоя жидкого кристалла d и угол ориентации оптической оси жидкого кристалла β , можно добиться минимальной разности между координатами цвета образца биоткани и координатами цвета нематического жидкого кристалла. За оптическую анизотропию образца биоткани принимают в этом случае оптическую анизотропию жидкого кристалла, при которой разница координат цвета биоткани и жидкого кристалла минимальна.

Таблица Л2.7

Спектральная зависимость оптической анизотропии жидкого кристалла.

Δn	0.1394	0.1104	0.0996
λ , нм	450	589	650

Процедура оценки оптической анизотропии биоткани состоит из следующих шагов:

- 1) На цветовой треугольник (рис. Л2.29) ставится точка, соответствующая цвету выбранной области образца биоткани;
- 2) Используя выражения (Л2.60) – (Л2.62) и данные табл. Л2.7 и Л2.8, составляется программа расчета координат цвета жидкого кристалла, помещенного между двумя скрещенными поляризаторами, в зависимости от толщины слоя d и угла ориентации оси β жидкого кристалла.
- 3) Изменяя толщину слоя жидкого кристалла d и угол ориентации жидкого кристалла β , подгоняют координаты цвета жидкого кристалла к координатам цвета биоткани, используя для этих целей разработанную программу и рис. Л2.29.
- 4) Равенство координат цвета образца биоткани и слоя жидкого кристалла говорит о равенстве значений их оптической анизотропии. При этом за величину оптической анизотропии образца мы будем принимать величину $\delta = \Delta n(\lambda = 550 \text{ нм}) \cdot d$.

Спектральные зависимости основных цветов в системе XYZ МКО 1931.

λ , нм	$\bar{X}(\lambda)$	$\bar{Y}(\lambda)$	$\bar{Z}(\lambda)$
390	0.01	0	0.1
400	0.11	0	0.53
410	0.38	0.01	1.8
420	1.19	0.04	5.71
430	2.33	0.1	11.37
440	3.46	0.23	17.34
450	3.72	0.42	19.62
460	2.24	0.67	18.61
470	2.12	0.99	13.99
480	1.05	1.53	8.92
490	0.33	2.14	4.79
500	0.05	3.34	2.82
510	0.1	5.13	1.61
520	0.3	7.04	0.78
530	1.69	8.78	0.43
540	2.87	9.43	0.2
550	4.27	9.8	0.09
560	5.63	9.42	0.04
570	6.95	8.68	0.02
580	8.31	7.89	0.02
590	8.61	6.35	0.01
600	9.05	5.37	0.01
610	8.51	4.27	0
620	7.09	3.16	0
630	5.06	2.06	0
640	3.55	1.39	0
650	2.12	0.81	0
660	1.25	0.46	0
670	0.68	0.25	0
680	0.35	0.13	0
690	0.15	0.05	0
700	0.08	0.03	0
710	0.04	0.02	0

Литература.

1. Оптическая биомедицинская диагностика. Под ред. проф. В. В. Тучина М.: Физматлит. 2007. Т.1. С. 560. Т.2. С. 368
 2. В.В. Тучин, Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях// М.: ФИЗМАТЛИТ. 2010. 488С.
 3. В.В. Тучин, Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике, 2-е издание. Перевод с английского. М.: Физматлит. 2013. 811С.
 4. Описание к микроскопу ПОЛАМ Р – 11
 5. А.Б. Шашлов, Р.М. Уарова, А.В. Чуркин ОСНОВЫ СВЕТОТЕХНИКИ: Учебник для вузов / М.: Изд-во МГУП. 2002. 280 с. (<http://www.hi-edu.ru/e-books/xbook322/01/about.htm>)
 6. Описание программного обеспечение производителя плат видеозахвата <http://www.videoscan.ru/>
- Дополнительная литература.
7. М.М. Гуревич, Цвет и его измерение. Ленинград: Из – во АН СССР. 1950. С. 26
 8. А.С. Сухариер, Жидкокристаллические индикаторы // М.: Радио и связь. 1991. 256 С.
 9. Р. Аззам, Н. Башара Эллипсометрия и поляризованный свет // М.: Мир. 1981.584 С.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

Конструкция простейшего цифрового микроскопа

Теоретическая часть

Высокий уровень автоматизации различных сфер человеческой деятельности требует от компьютерных систем не только быстро и с заданной точностью выполнять вычисления, но и эффективно анализировать визуальную информацию и на этой основе решать сложные задачи управления, контроля и диагностики различных систем. Системы для решения подобных задач основаны в первую очередь на видеокамере и устройстве обработки изображения. Такие системы предназначены для использования на производстве, в медицине, в обороне и должны отличаться высокой производительностью, надежностью и гибкостью. Всем этим требованиям удовлетворяют системы, построенные на базе персональных компьютеров со стандартными шинами PCI и PCIE. Подобные системы имеют три основные составляющие: видеокамеру; плату захвата изображения; программное обеспечение.

Первым устройством в списке системы обработки изображения стоит видеокамера, поэтому в первую очередь уделим внимание характеристикам видеокамеры. Основными характеристиками камер, влияющими на ее качество и стоимость, являются:

- цветность;
- минимальная освещенность;
- разрешающая способность;
- характеристики матрицы;
- производитель камеры.

Цветность. Камеры бывают цветные и монохромные. Монохромные имеют более высокую светочувствительность, чем цветные. Кроме этого монохромная камера имеет стоимость до 5 раз меньше цветной. Более того все цветные камеры при наступлении темноты переключаются в черно-белый режим. Поэтому если Вы планируете использовать камеры в условиях слабого освещения, то рекомендуется использовать монохромные камеры.

Минимальная освещенность. Минимальная освещенность - возможность камеры качественно различать картинку перед собой в темное время суток. Измеряется данный параметр в люксах (Лк). Естественно чем ниже данное значение, тем при более низкой освещенности способна видеть камера, тем лучше. Средним значением на сегодняшний день является освещенность 0,1 Лк.

Разрешающая способность. Разрешающая способность камеры – количественное измерение четкости изображения. Измеряется в телевизионных линиях (ТВЛ). Чем больше телевизионных линий может показать камера, тем четче будет изображение у Вас на мониторе. Средний показатель по рынку – 420 ТВЛ. Отличный – 640.

Характеристики матрицы. Матрица камеры – элемент, воспринимающий изображение и преобразующий его в электрический сигнал. Это ключевой элемент камеры. скажем несколько слов о наиболее важных характеристиках. На рис. ЛЗ.1 показаны три характеристики, которые обычно указывает производитель камеры для «матрицы» или «сенсора»: размер матрицы; тип сенсора; фирма производитель.

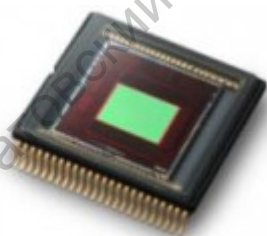


Рис. ЛЗ.1 Типичный светочувствительный элемент и его основные характеристики.

Размер матрицы. На рис. ЛЗ.2 схематично показана сама матрица. Пиксель – мельчайший элемент матрицы, воспринимающий свет. Чем больше этих элементов и чем они больше, тем лучше. Чем больше пикселей – тем четче картинка. Чем больше пиксель – тем лучше цветопередача, красочней изображение. Количество пикселей можно условно определить исходя из разрешающей способности камеры. То есть чем

больше ТВЛ заявлено, тем больше пикселей в камере. Размер пикселей определяется исходя из размера матрицы. Размер матрицы указывается в частях дюйма. Например «1/3”» означает, что размер матрицы – треть дюйма. Чем меньше число в знаменателе (в данном случае 3), тем матрица больше – соответственно лучше. То есть условно 1/3” матрица лучше, чем 1/4”. Но дороже.

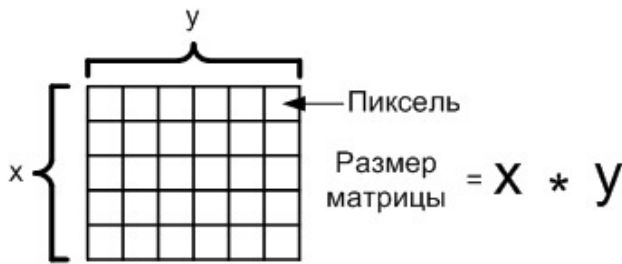


Рис. Л3.2 Схематичное изображение матрицы камеры.

Тип сенсора. На сегодняшний день наиболее распространенными являются два типа сенсоров CMOS(КМОП) и CCD. CMOS - более новая технология. Матрицы CMOS потребляет меньше энергии, стоят дешевле, чем CCD. Но по качеству изображения CMOS немного уступает CCD.

CMOS (*complementary metal-oxide-semiconductor*) **КМОП** (комплементарная структура металл-оксид-полупроводник) — технология построения электронных схем. В более общем случае — КМДП (с структурой металл-диэлектрик-полупроводник). В технологии КМОП используются полевые транзисторы с изолированным затвором с каналами разной проводимости. Отличительной особенностью схем КМОП по сравнению с биполярными технологиями является очень малое энергопотребление в статическом режиме (в большинстве случаев можно считать, что энергия потребляется только во время переключения состояний). Отличительной особенностью структуры КМОП по сравнению с другими МОП-структурами (N-МОП, P-МОП) является наличие как *n*-; так и *p*-канальных полевых транзисторов; как следствие, КМОП- схемы обладают более высокой скоростью действия и меньшим энергопотреблением, однако при этом характеризуются более сложным технологическим процессом изготовления и меньшей плотностью упаковки.

CCD – *матрица* (Charge-Coupled Device) **ПЗС-матрица** (прибор с зарядовой связью) — специализированная аналоговая интегральная микросхема, состоящая из светочувствительных фотодиодов, выполненная на основе кремния, использующая технологию ПЗС — приборов с зарядовой связью. ПЗС-матрица состоит из поликремния, отделённого от кремниевой подложки, у которой при подаче напряжения через поликремневые затворы изменяются электрические потенциалы вблизи электродов. До экспонирования светом обычно подачей определённой комбинации напряжений на электроды происходит сброс всех ранее образовавшихся зарядов и приведение всех элементов в идентичное состояние. Далее комбинация напряжений на электродах создаёт потенциальную яму, в которой могут накапливаться электроны, образовавшиеся в данном пикселе матрицы в результате воздействия света при экспонировании. Чем интенсивнее световой поток во время экспозиции, тем больше накапливается электронов в потенциальной яме, соответственно тем выше итоговый заряд данного пикселя. После экспонирования последовательные изменения напряжения на электродах формируют в каждом пикселе и рядом с ним распределение потенциалов, которое приводит к перетеканию заряда в заданном направлении, к выходным элементам матрицы.

Фирма производитель. Рынок производства матриц практически пополам поделили две фирмы. Фирма SHARP и фирма SONY. Матрицы фирмы SONY традиционно считаются наиболее качественными. Насколько это утверждение справедливо - сказать сложно. По факту матрицы SONY стоят дороже и используются чаще в камерах высшего ценового диапазона. Матрицы SHARP дешевле и чаще встречаются в недорогих камерах.

Вторым по списку элементом системы обработки информации является плата захвата изображения. Цифровая обработка изображений решается с помощью соответствующих устройств – плат видеозахвата и специализированного программного обеспечения. Для создания таких систем существует широкий выбор плат, которые могут использоваться как для подключения нескольких видеокамер, так и одной. По способу обработки сигналов платы видеозахвата делятся на аналоговые и цифровые. Для несложных задач универсальным и экономически оправданным решением является применение аналоговых плат, поскольку к ним достаточно просто подключить

широко распространенные на сегодня камеры со стандартными аналоговыми интерфейсами. Вместе с этим следует указать несколько недостатков аналоговых плат видеозахвата:

- использование чересстрочной развертки приводит к искажениям в виде гребенки, которые возникают на итоговом изображении;
- характеристики аналоговых камер привязаны к существующим стандартам PAL, NTSC, SECAM, что приводит к ограничению разрешающей способности и частоте кадров;
- преобразования цифра – аналог – цифра снижают четкость изображения, так как любое конвертирование невозможно без искажений;
- аналоговый сигнал по сравнению с цифровым менее помехоустойчив.

Использование цифровых видеосистем имеет неоспоримые преимущества:

- 1) прогрессивная (построчная) развертка;
- 2) отсутствие искажений на изображениях движущихся объектов;
- 3) возможность получать кадры с высокими разрешением и частотой.

Остановимся на третьем элементе системы обработки изображения – программном обеспечении. Для конфигурирования систем, начальной оценки возможностей и проверки функционирования плат видеозахвата компанией ADLINK в помощь разработчикам поставляется специализированное программное обеспечение: ViewCreatorPro™, CamCreator®, Angelo-LVIEW.

Программное обеспечение ViewCreatorPro™ предназначено для цифровых плат, а CamCreator® - для аналоговых. С их помощью можно быстро и легко произвести начальную настройку плат, также сконфигурировать и протестировать всю систему в целом. Обе утилиты совместимы с 32/64-разрядными версиями ОС Windows XP/7.

Визуально – графические задачи позволяет решить программное обеспечение Angelo-LVIEW. Этот пакет программ поддерживает аналоговые платы видеозахвата и предназначен для работы с программным пакетом LabVIEW®. Angelo-LVIEW содержит обширную библиотеку инструментов для создания визуальных приложений, которые обеспечивают разработчику возможность использования всех функций и преимуществ пакета LabVIEW®.

Основной рекомендацией, выполнение которой необходимо для создания систем обработки изображения, является обязательный учет совместимости платы видеозахвата с остальными компонентами компьютера, используемой операционной системы и специализированным программным обеспечением.

В настоящей лабораторной работе студентам предлагается самостоятельно собрать систему получения видеоизображений на основе монохромной камеры с простейшей платой видеозахвата, работающей под управлением ОС FreeDOS.

Экспериментальная часть

Описание экспериментальной установки.

На рис. Л3.3 представлена схема экспериментальной установки, включающая микроскоп, оснащенный цифровой камерой, которая подключена к персональному компьютеру (Рис. Л3.3). Основными элементами установки являются:

- микроскоп с цифровой камерой;
- персональный компьютер.

Персональный компьютер выполнен на базе процессора Intel Pentium II 500 МГц.

Микроскоп снабжен микрообъективом с 8-кратным увеличением, на окулярной части которого закреплена цифровая видеокамера EDC-1000 Electrim Corporation.

С помощью цифровой камеры, установленной на тринокуляр, регистрируются видеоизображения исследуемых образцов через определённые промежутки времени по мере уменьшения светорассеяния биоткани. Изображения, полученные с помощью цифровой камеры, переносятся на персональный компьютер, на котором в последствие они обрабатываются с помощью соответствующего программного обеспечения.

Для функционирования системы необходима операционная система FreeDOS или Windows. Процедура формирования и захвата видеоизображений поддерживаются специализированным программным обеспечением, поставляемым фирмой Electrim Corporation в комплекте с видеокамерой. Формируемые при этом микро видеоизображения исследуемых образцов сохраняются в bitmap- формате

(256 градаций серого цвета, размер изображения 242×192 пикселей). Для последующего анализа полученных изображений используется программа, разработанная с использованием пакета Mathcad 8.00 MathSoft, Inc., реализующая следующие функции:

- 1) вычитание фонового изображения, получаемого при выключении осветителя, с целью исключения влияния темнового сигнала ПЗС – камеры и фоновых засветок на результаты измерения оптических характеристик объекта;
- 2) выделение единичной строки в заданной области поля изображения;
- 3) усреднение яркости изображения по заданному числу строк;
- 4) определение яркости изображения на выделенных оператором участках строки, соответствующих измеряемой (Y_{\min}) и «опорной» (Y_{\max}) зонам видеоизображений. С целью минимизации случайной составляющей погрешности измерения производится усреднение значений яркости в пределах окна шириной 10 пикселей.

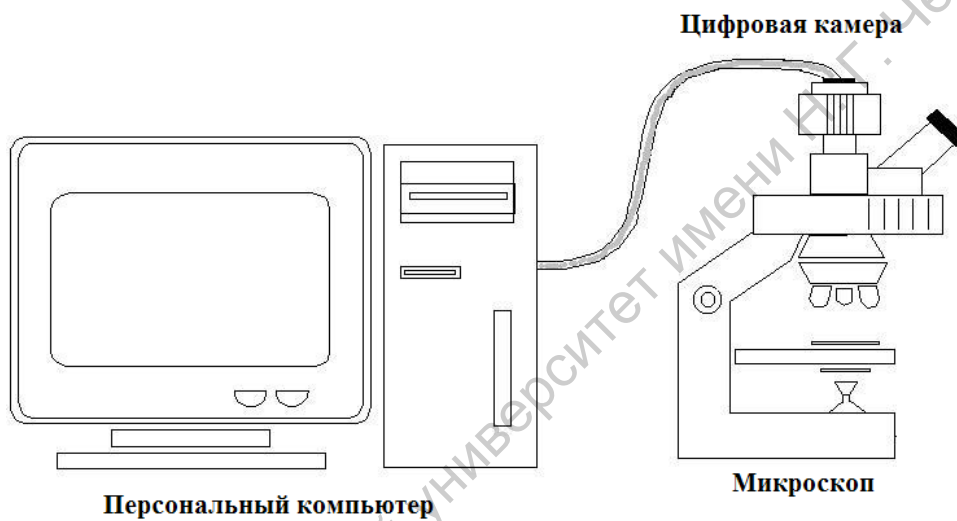


Рис. Л3.3 Схема экспериментальной установки.

Средняя яркость выделенного оператором участка строки вычисляется путем подсчета количества пикселей (элементов изображения), имеющих заданный уровень интенсивности. Таким образом, среднее по площади образца значение яркости определяется

$$Y = \sum_{j=0}^{255} \frac{J \cdot n_j}{n} \quad (\text{Л3.1})$$

где n_j – число пикселей с определённым значением яркости J , n – общее число пикселей изображения. Величина J принимает значения от 0 (минимальная яркость) до 255 (максимальная яркость). Уровень интенсивности пикселей, соответствующего нулевому коэффициенту пропускания, определяется по изображению, полученному при отсутствии освещения образца. Уровень интенсивности пикселей, соответствующего 100-процентному пропусканию, определяется по изображению, полученному при освещении предметного столика в отсутствие образца. Уровень освещенности предметного столика устанавливается таким образом, чтобы цифровая камера не входила в режим насыщения, то есть интенсивность пикселей, соответствующих 100-процентному пропусканию принимает значение меньше, чем 255 (реально меньше 220).

По полученным значениям Y_{\min} и Y_{\max} вычисляется значение пропускания объекта

$$T = \frac{Y_{\min} - Y_b}{Y_{\max} - Y_b}, \quad (\text{Л3.2})$$

где Y_b - значение яркости изображения фона.

Для калибровки установки при измерении оптического пропускания образцов биотканей использовались стандартные нейтральные фильтры серии НС: НС – 1, НС – 2, НС – 3, НС – 6, НС – 8, НС – 9. Калибровка установки осуществлялась для трех значений длины волны осветителя, определяемых используемым интерференционным фильтром 600 нм, 700 нм, 800 нм. На рис. ЛЗ.2 приведена калибровочная зависимость для длины волны 600 нм. Анализ полученных зависимостей показал, что с достаточной степенью точности они могут быть аппроксимированы линейными зависимостями вида $y = A + Bx$, где x – пропускание фильтра, используемого для калибровки, y – относительное значение яркости видеоизображения, полученное после исключения фоновой составляющей и нормированное на максимальное значение, получаемое в отсутствие фильтра. Значения коэффициентов калибровочной зависимости, определенные для трех используемых в работе длин волн, приведены в таблице ЛЗ.1.

Экспериментальная установка имеет следующую погрешность измерений:

- абсолютная погрешность в измерении оптического пропускания биоткани составляет 2.9%
- диапазон изменений измеряемого коэффициента оптического пропускания образца составляет от 5% до 95 %
- наиболее благоприятный диапазон значений измеряемого коэффициента оптического пропускания образца находится в пределах от 10 до 90 %.

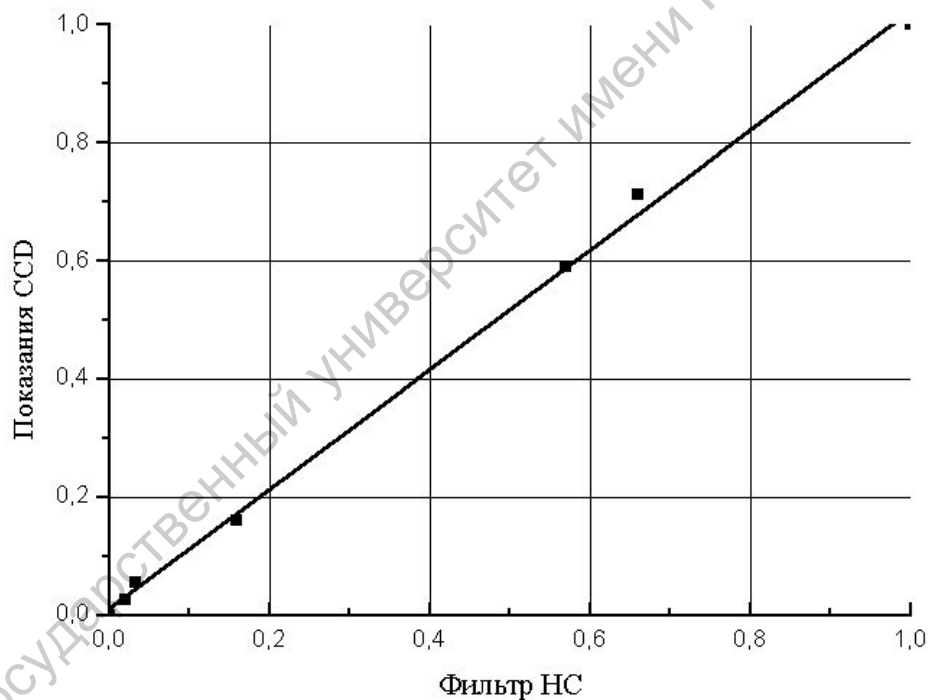


Рис. ЛЗ.2 Калибровочная зависимость экспериментальной установки на длине волны света 600 нм.

Таблица ЛЗ.1

Параметры калибровочной прямой.

Значение параметра	Длина волны 600 нм	Длина волны 700 нм	Длина волны 800 нм
A	0.01 ± 0.005	0.018 ± 0.007	-0.009 ± 0.003
B	1.01 ± 0.01	1.05 ± 0.02	1.02 ± 0.01

Относительная погрешность измерения величины коэффициента оптического пропускания и составляет: не более 50% при уровне пропускания менее 10%; не более 20% при уровне пропускания менее 50%; не более 10% при уровне пропускания более 60%.

Задание

1. Установить плату видеозахвата на персональный компьютер. Для этой цели снять с системного блока крышку, закрывающую материнскую плату. На материнской плате найти слот ISA – стандарта и установить в него плату видеозахвата для камеры EDC – 1000. Закрывать крышку системного блока и подключить к нему клавиатуру, монитор и манипулятор типа «мышь».
2. Установить на персональный компьютер ОС *FreeDOS*. Для этой цели следует выполнить следующую последовательность действий.
 - i. Включить компьютер. В момент загрузки нажимаете клавишу «*del*» для перехода в меню *BIOS*. В открывшемся меню необходимо выбрать путь, откуда будет происходить установка операционной системы *FreeDOS*. Для этого ищем строчку «*First boot device*» и в выпадающем меню выбираем необходимый путь. В нашем случае необходимо выбрать загрузку с CD-диска («*Boot from CD*»). Клавишей «*ESC*» выходим из меню *BIOS*, при этом сохраняем изменения.
 - ii. Вставляем CD-диск с операционной системой и перезагружаем компьютер. При новой загрузке автоматически запускается система установки *FreeDOS*. Необходимо в открывшемся меню выбрать «*Boot FreeDOS from CD*», в результате откроется окно установки. В этом окне для перехода в меню подготовки установки необходимо выбрать «*Prepare hard disk for FreeDOS*». В открывшемся меню необходимо установить параметры установки. Выбираем меню опций. Для этого в окне выбираем «*Options*». В меню опций выбираем «*New partition*», далее выбираем «*Primary partition*», это позволит разделить свободную область жесткого диска на разделы. В выпадающем меню выбираем размер размеченной области. (В нашем случае под эту область отводим весь размер жесткого диска). После выполнения этих процедур открывается диалоговое окно, в котором на вопрос: «*Do you want to initialize the whole Partition Area?*» выбираем «*Yes*». После этого попадаем в окно, в котором отображаются все размеченные области. (В нашем случае это единственная область). Выбираем эту область и нажимаем F3 для выхода. После этого в диалоговом окне на вопрос: «*Do you want to write the Partition Table of hard disc 1?*» выбираем «*Yes*». Далее начинается процесс установки. В окне на вопрос о форматировании жесткого диска выбираем «*Yes*». После завершения процесса форматирования выбираем следующие операции: «*Continue FreeDOS Installation*» и «*Start installation of FreeDOS*», и в открывшемся окне называем путь установки. Подтверждаем этот выбор и в следующем окне для начала установки нажимаем «*Done*». В выпадающем окне подтверждаем процесс установки, после завершения которой нажимаем любую клавишу. После чего нажимаем «*Y*» для перезагрузки системы.
 - iii. Далее в меню *BIOS* устанавливаем загрузку с жесткого диска («*Boot from hard disc*»). В загрузившемся окне выбираем «*Load FreeDOS with EMM386, no EMS (most UMBs), max RAM free*» для запуска операционной системы *FreeDOS* после чего можно начинать работу.
 - iv. Для удобства работы необходимо установить файловый менеджер *Volkov Commander*. Для чего вставляем диск с программой в ПК. В терминале *DOS* для перехода к диску с *Volkov Commander* пишем *cd A:*. Командой *md c:\nc* создаем на диске каталог с именем *nc*. И командой *copy A:*. * C:\nc* копируем содержимое диска с программой Norton Commander в соответствующий каталог на диске *c*. Командой *cd C:\nc* перейдем в каталог *nc* на диске *c*. Далее командой *vc.com* запустим *Volkov Commander*.
3. Установить утилиты для работы с камерой и получить изображение объекта на монитор компьютера. Для этого необходимо выполнить следующие действия.
 - a. Вставим диск с драйверами для работы с камерой «*Electronic Imaging EDC-1000*» в дисковод. Работая в программе *Volkov Commander*, перейдем на диск *C* и создадим каталог «*for cam*». Для этого необходимо нажать клавишу *F7* в рабочем окне и ввести соответствующее имя. Далее в меню выбора диска в *Norton Commander* выберем диск *A*, и клавишей *F5* скопируем содержимое диска *A* в каталог «*for cam*» на диске *C*.
 - b. Снова перейдем на диск *C* в каталог «*for cam*». Необходимо среди всех файлов, содержащихся в каталогах найти файл, запускающий камеру. Этот запускающий файл

находится в папке с именем *xvgacam* и называется *xvgacam.exe*. Запускаем этот файл, в результате открывается программа для работы с камерой и включается сама камера. Изображение на экране монитора сохраняем с помощью соответствующего пункта меню.

4. Юстировка камеры и обработка изображений осуществляется по заданию преподавателя.

Литература.

1. Головастов А. Машинное зрение и цифровая обработка изображений // СТА-ПРЕСС. 2010. № 4. с. 8 – 18.
2. <http://www.helpset.ru/%D0%B2%D1%81%D0%B5-%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D0%BD%D0%B4%D1%8B-ms-dos/comment-page-1/>
3. Manual EDC-1000 computer camera software V3.3
4. <http://habrahabr.ru/post/143169/>
5. http://www.security-bridge.com/biblioteka/knigi_po_bezopasnosti/televidenie/
6. <http://www.electronics.ru/journal/article/1276>

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

Определение цветовых координат объекта

Теоретическая часть

Одной из важных составных частей физики живых систем является медицинская оптика. Этот раздел физики изучает оптические явления, которые происходят в живых системах под действием света. Одним из основных явлений – это световые процессы, связанные со зрением и психофизиологическими характеристиками глаза, то есть с его усредненной зрительной реакцией. В первую очередь стоит отметить способность человеческого глаза реагировать не только на интенсивность светового излучения, и различать одинаковые по интенсивности, но различные по длинам волн световые импульсы. Эта способность человеческого глаза называется цветным зрением.

Цветное зрение обеспечивается колбочками в сетчатке, а чувствительность к малым уровням света – палочками. При низких уровнях света цветное зрение утрачивается. Пороговая реакция на зрительный раздражитель зависит от фоновой освещенности. Минимальное различимое раздражение соответствует примерно 60 квантам сине-зеленого света. Палочки в сетчатке дают сумеречное зрение. Оно наступает после темновой адаптации глаза и различает максимум до освещенности 3×10^{-5} кд/м². Для полной темновой адаптации глаза требуется примерно 45 мин. Максимум спектральной чувствительности человеческого глаза при сумеречном зрении приходится на 500 нм. Напомним, что Кандэла (от лат. *candela* — свеча) — единица силы света, одна из семи основных единиц Международной системы единиц (СИ). Определена как сила света в заданном направлении источника, испускающего монохроматическое излучение частотой $540 \cdot 10^{12}$ Гц, энергетическая сила света которого в этом направлении составляет 1/683 Вт/ср. Принята в качестве единицы СИ в 1979 г. XVI Генеральной конференцией по мерам и весам.

«Световое» зрение обеспечивается колбочками. Оно имеет место после адаптации глаза к фоновой яркости минимум в 3 кд/м², для чего требуется около 2 мин. Максимум спектральной чувствительности человеческого глаза при «световом» зрении приходится на 550 нм.

Между адаптированным к свету и адаптированным к темноте состояниями чувствительность глаза непрерывно меняется и при уменьшении яркости чувствительность сдвигается в синюю область спектра. Этот эффект известен под названием мезопикового состояния.

Восприятие цвета человеческим глазом можно описать специфическими характеристиками, которые могут быть экспериментально определены и теоретически рассчитаны. Эти характеристики называются цветовыми координатами, а теория, позволяющая их определять - теорией цвета или цветовой теорией. Ниже мы приведем основные положения цветовой теории, следуя книге [1].

Действие на органы зрения излучений, длины волн которых находятся в диапазоне 380-780 нм, приводит к возникновению не только ощущения светлоты, но и более сложных ощущений - цветовых. Кривая чувствительности «среднего» человеческого глаза существенно отлична от 0 в диапазоне длин волн от 400 до 700 нм, поэтому, когда говорят о цветовых ощущениях, обычно рассматривают диапазон 400-700 нм.

Цветовые ощущения различаются количественно и качественно. Количественно - это светлота, качественно - цветность. Восприятие светлоты и цветности зависит от физических свойств излучения. С изменением мощности излучения (или яркости) изменяется светлота, с изменением длины волны - цветность. Совместное действие светлоты и цветности можно видеть на следующем примере. Если поместить окрашенную поверхность частично на прямой солнечный свет, а частично - в тень, то светлота меняется, а цветность нет. Совокупность светлоты и цветности обозначается термином "цвет". Сразу уточним, что мы будем рассматривать только ощущение цвета от воздействия светового излучения на зрительные органы человека. Ниже будет показано, что ощущение цвета можно выразить трехмерной величиной. Эта величина также носит название "цвет". Необходимо различать два близких понятия: окраска предмета и его цвет. На бытовом уровне эти понятия обычно не различаются. Окраска характеризует спектральные свойства поверхности предмета отражать то или иное излучение в направлении глаза (или измерительного прибора). Цвет данного предмета - это то, как реализуется эта отражательная способность с учетом условий его освещения и рассматривания может быть функцией глаза. Например, белый снег. Спектральная кривая его отражения практически не зависит от длины

волны и поэтому он кажется белым. При ясной погоде и багровым закате снег кажется красным, так как источник излучения имеет красный оттенок.

Цвет - это сложное психофизическое явление, поэтому наука о цвете включает в себя физические, физиологические и психологические аспекты. Физика цвета рассматривает оптические явления, возникающие при рассмотрении предметов в отраженном или проходящем свете, а также аппаратуру и методы получения и измерения соответствующих спектров. Физиология цвета изучает действие излучений на глаз, причины возникновения светового и цветового ощущений, работу зрительного аппарата. Психология цвета изучает влияние психологических факторов на ощущения, вызванные излучением с определенными физическими характеристиками. Базой для изучения цвета, а также контрольным инструментом при его воспроизведении служит метрология цвета, которая устанавливает способы численного выражения и измерения цвета, его классификацию, величины и методы установления Допусков на воспроизведение цвета. Цвет, или, точнее, ощущение цвета, вызывают световые излучения различного спектрального состава, попавшие в наш глаз при рассмотрении светящейся или окрашенной поверхности предмета. Это одно из определений понятия "цвет". Из этого определения видно, что характер цветового ощущения связан со спектральным составом действующего на глаз света и со свойствами зрительного аппарата человека, с его восприятием. А значит цвет можно оценить и измерить. В колориметрии (науке об измерении цвета) излучение, попавшее в глаз и вызвавшее цветовые ощущения, называется цветовым стимулом.

Есть две принципиально различные системы оценки и представления цвета. Первая - колориметрическая система. В ее основе лежат основные излучения, смешивая которые, воспроизводят все многообразие цветов. Некоторые колориметрические системы имеют международную стандартизацию. Вторая - система спецификации цветов, где цвет имеет материальный носитель в виде окрашенных образцов, расположенных в определенном порядке. Системы спецификации стандартизируются национальными службами стандартизации. В последнее время системы спецификации имеют стандартное измерение цветов в международных колориметрических системах.

В основе обеих систем лежит такое фундаментальное понятие, как цветовое пространство.

Основы научного представления о цвете были заложены Ньютоном. Он предложил систематизировать цвета при помощи белого света, разложенного призмой в спектр. Этот спектр Ньютон расположил по кругу и указал на существование семи основных цветов спектра (КОЖЗГСФ - первые буквы названий цветов излучения). Впоследствии между фиолетовым и красным монохроматическими излучениями были помещены бихроматические пурпурные цвета. Все природные цвета располагаются внутри круга с белой точкой в центре, цвета плавно переходят один в другой. Насыщенность увеличивается от центра круга к периферии. В настоящее время устоявшимся является трехмерное представление о цветовом пространстве и его строении. Ниже рассмотрим основные принципы строения цветового пространства.

В колориметрии цвет оценивается по координатам цвета. Эти координаты получают с учетом цветовой температуры источника света, его цветовых стимулов, или, говоря иначе, в соответствии с математической моделью нашего зрения. На основании законов сложения цветов (законов Грассмана), устанавливающих трехмерность цвета и непрерывность его изменения в спектре, любой цвет можно представить точкой в трехмерном пространстве. В этом пространстве каждому цвету будет соответствовать определенная точка, а каждой точке такого пространства - определенный цвет. Таким образом, цветовое пространство можно считать формой геометрического представления различных цветов. Для упорядочения цветов и выполнения над ними различных математических действий в цветовом пространстве вводят систему цветковых координат. Таких систем в цветовом пространстве может быть великое множество. Как правило, началом координат служит точка, соответствующая черному цвету. В этой точке вообще отсутствует свет. Система цветковых координат полностью определяется заданием координатных осей и выбранным на них масштабом. В любой выбранной системе цветковых координат каждый цвет выражается через основные цвета этой системы. Главным ограничением при выборе

основных цветов является обязательная линейная независимость цветов. Это значит, что ни один из основных не может быть получен смешением двух других и сумма основных в равных количествах должна давать ахроматический цвет. Поэтому выбор основных цветов, направление осей и масштаб на осях произволен и зависит от поставленной цели.

Необходимо заметить, что при выборе осей новой системы цветов и произвольном их расположении цветовое пространство может измениться по сравнению с первоначальным. Это означает, что могут измениться положения точек, представляющих различные цвета, но соотношения между цветами при этом меняться не должны. Цвет можно представить в цветовом пространстве не только точкой, но и цветовым вектором. Его начало будет совпадать с началом координат, а конец - с точкой данного цвета. В этом случае координаты цвета будут являться координатами цветового вектора. В настоящее время при двух подходах к систематизации и оценке цвета общим является трехмерное представление о цветовом пространстве и его строении. Ниже рассмотрим основные принципы построения тела цветового охвата основных систем спецификации. Основой большинства систем спецификации является цветовой круг. Порядок расположения цветов в круге в основном определяется спектром. Основные цвета системы и размер сектора, который каждый цвет занимает в системе, свои. Индивидуальны также количества ступеней светлоты, насыщенности и форма строения цветового тела.

В системах спецификации используют материальный носитель цвета - окраску предмета. В этом случае имеют значение условия наблюдения и спектральная чувствительность глаза наблюдателя. Есть некоторые ограничения при использовании систем спецификации. Во-первых, не стандартизирован источник света, поэтому возможны неточности из-за метамерности цветов при воспроизведении цвета иными, чем в оригинале, пигментами. Во-вторых, пользователь должен обладать стандартным цветовым зрением и иметь опыт работы по оценке цвета. Необходимо также помнить об адаптации зрения, на которую отрицательно влияют усталость, возбуждение, резкий переход от одного уровня освещенности к другому, резкое изменение цветовой температуры и некоторые другие факторы. Правда, возможность измерения эталона и оцениваемого образца на спектроколориметре в стандартной колориметрической системе позволяет избежать перечисленных недостатков.

Здесь будут рассмотрены только принципы построения колориметрических систем. Один из способов определения цвета основан на измерении его по принципу синтеза. В приборах - колориметрах, где реализован этот принцип, с помощью трех основных синтезируется цвет, тождественный измеряемому. Две грани призмы образуют фотометрическое поле. На одну половину поля направляют измеряемое излучение Ц, а на другую - излучение основных цветов R (red) - К, G (green) - З, B (blue) - С. Регулируя количество основных цветов, цвета обеих половин поля можно уравнивать. Зная характеристики светопоглощающих устройств (диафрагмы, клинья), можно найти количества основных, а по ним - координаты измеряемого цвета. Определив цветовые координаты, легко воспроизвести сам цвет.

Иногда вместо цветовых координат определяют психофизические характеристики цвета: доминирующую длину волны, чистоту цвета и яркость. Их определение основано на том, что спектр содержит все цвета, кроме пурпурных. Поэтому к любому световому пучку можно подобрать спектральный цвет, тождественный измеряемому по цветовому тону. В данном случае эталоном служит монохроматическое излучение М, выделенное из спектра. Так как измеряемый и монохроматический пучки могут различаться по насыщенности, то на грань призмы вместе с монохроматическим направляется еще и белое излучение Б. Зная длину волны монохроматического излучения М, его количество и количество белого, необходимых для получения цвета, тождественного Ц, находят психофизические характеристики измеряемого цвета. Длина волны монохроматического излучения, тождественная измеряемому цвету, называется доминирующей длиной волны ($\lambda_{\text{дом}}$). Она характеризует цветовой тон цвета Ц. Насыщенность цвета Ц характеризуется колориметрической чистотой цвета p . Она определяет долю того монохроматического излучения, которое обеспечивает в смеси с белым зрительное тождество с рассматриваемым излучением (цветом), вычисляется по формуле

$$p = \frac{B_{\lambda}}{B_{\lambda} + B_0}, \quad (Л4.1)$$

где B_{λ} - яркость монохроматического излучения; B_0 - яркость белого излучения.

И наконец, светлота в колориметрии определяется через яркость B , которая является количественной характеристикой цвета. Она зависит от количества излучения, необходимого для получения на эталонной грани призмы монохроматического излучения, не отличимого от цвета Ц по светлоте.

До начала 30-х годов XX века все, кто занимался воспроизведением цвета, выбирали основные цвета по своему усмотрению. При этом чаще всего выбор был обусловлен удобствами проведения эксперимента. Поэтому все численные значения относились лишь к конкретному измерению, что в значительной степени затрудняло использование полученных результатов. Однако развитие науки, техники и совершенствование технологических процессов требовали создания такой системы измерения цветов, которая позволила бы проводить их объективную оценку. Для этого необходимо было создание соответствующих систем измерения цвета. Одним из главных требований метрологии (и метрологии цвета, в частности) является то, что результаты измерений должны быть однозначными и воспроизводимыми. Под однозначностью понимают способность одной и той же величины всегда давать одинаковые значения, под воспроизводимостью - сопоставимость полученных результатов измерений. Для удовлетворения этих условий необходимо, чтобы измерения проводились в одних и тех же условиях, принятых за норму. Совокупность нормированных условий измерений цвета составляет колориметрическую систему. В колориметрии нормируют те условия, которые непосредственно влияют на результат: цветность основных цветов, количества основных цветов, уровень яркости, размеры фотометрического поля.

Принцип построения колориметрических систем основывается на одном из законов Грассмана, согласно которому любой цвет может быть выражен тремя другими, если они линейно независимы. Этому требованию отвечают излучения синего, зеленого и красного цветов, называемые триадой. Учитывая еще ряд требований, выбор основных ограничили определенными интервалами спектра и длин волн. С уровнем яркости и размером фотометрического поля связана контрастная чувствительность глаза. Два объекта разного цвета, различимые при одной яркости, могут оказаться неразличимыми при другой, когда чувствительность глаза понижена. Поэтому уровни колориметрических измерений нормируют таким образом, чтобы уровень яркости был оптимальным по отношению к чувствительности человеческого глаза.

Выбор основных цветов, ограниченный лишь условием линейной независимости между ними, позволяет иметь неограниченно большое количество колориметрических систем.

Одной из таких систем является основная физиологическая система КЗС. В этой системе координаты цвета К, З и С - уровни возбуждения трех приемников глаза в единичных значениях КЗС - компонентов цвета. Особенность физиологической системы заключается в том, что в отличие от всех других систем (в том числе и тех, которые будут рассматриваться дальше) в ней любой цвет не только выражается суммой трех основных, но и определяется уровнем и соотношением реакций трех цветоощущающих рецепторов глаза. В связи с этим особая важность данной системы там, где есть необходимость анализа реакций цветоощущающих рецепторов, цветовой адаптации и т.д. Основная трудность построения данной системы заключается в невозможности точного измерения спектральной чувствительности каждого из трех цветоощущающих рецепторов.

Первая колориметрическая система RGB (КЗС) была предложена и принята в 1931 г. международной комиссией по освещению (МКО), в литературе часто вместо МКО используется аббревиатура CIE от французского Commission Internationale de l'Eclairage). Выбор основных цветов этой системы осуществлялся исходя из следующих требований.

1. Выбранные основные цвета должны легко воспроизводиться.
2. Каждый из выбранных основных цветов должен возбуждать по возможности лишь одну группу цветоощущающих рецепторов.

Учитывая год разработки первой колориметрической системы, следует отметить, что в то время наиболее воспроизводимыми считались излучения газосветных ламп, из которых с помощью светофильтров легко выделялось монохроматическое излучение. В связи с этим СИЕ в качестве основных были выбраны излучения:

красное ($\lambda_R = 700$ нм), выделяемое красным светофильтром из лампы накаливания;

зеленое ($\lambda_G = 546,1$ нм) линия е в спектре ртутной лампы;

синее ($\lambda_B = 435,8$ нм) линия g в спектре ртутной лампы.

Цвета этих излучений получили соответственно названия R (red), G (green), B (blue), а колориметрическая система - CIERGB. Количественные характеристики основных цветов CIERGB выражают как световыми, так и энергетическими величинами. Для колориметрических измерений удобнее выбирать единицы световых величин таким образом, чтобы одинаковые количества основных давали белый цвет. Это один из основных принципов синтеза в колориметрии. Экспериментально было установлено, что это возможно при соотношении яркостей соответствующих цветов R:G:B = 1:4,59:0,06. Эти качества основных получили название яркостных коэффициентов: $L_R = 1; L_G = 4.59; L_B = 0.06$. Для перехода к энергетическим величинам за единицы количеств основных RGB принимают не яркостные коэффициенты, а яркостные единицы: B_R, B_G, B_B . Эти величины больше яркостных коэффициентов в 680 раз:

$$B_R = 680 \cdot L_R = 680 \text{кд} / \text{м}^2; B_G = 680 \cdot L_G = 3121 \text{кд} / \text{м}^2; B_B = 680 \cdot L_B = 41 \text{кд} / \text{м}^2. \quad (\text{Л4.2})$$

Учитывая, что яркости пропорциональны световым потокам, можно считать, что при соотношении световых потоков будет также получен белый цвет. Зная связь между световым потоком и потоком излучения можно выразить основные R, G, B в энергетических единицах – ваттах: R = 24,39 Вт, G = 4,66 Вт и B = 3,38 Вт.

Обычное написание в общем виде цветового уравнения в CIERGB

$$C = RR + GG + BB \quad (\text{Л4.3})$$

Для перехода к уравнению цветности находят модуль цвета m - сумму координат цвета ($m = R + G + B$) и затем каждый из членов уравнения (Л4.3) делят на модуль:

$$C = \frac{R}{m} \mathbf{R} + \frac{G}{m} \mathbf{G} + \frac{B}{m} \mathbf{B}, \quad (\text{Л4.4})$$

$$r = R/m, g = G/m, b = B/m$$

где r, g, b - координаты цветности.

Яркость цвета определяется суммой яркостей основных его составляющих. Определение психофизических характеристик доминирующей длины волны и чистоты цвета в CIERGB проводят по диаграмме цветности rg , полученной при помощи кривых сложения. Кривые сложения, и представляют собой распределение по спектру цветовых координат монохроматических излучений мощностью 1 Вт. Поэтому значения ординат кривых сложения называют удельными, т.е. отнесенными к единице мощности.

В CIERGB ординаты кривых сложения (удельные координаты) были установлены опытным путем. Экспериментально нахождение удельных координат осуществлялось путем подбора смеси излучений основных RGB к спектральным излучениям произвольной мощности и последующего деления их координат на мощность.

Следует сделать два замечания относительно системы CIERGB.

1. Рассматриваемая выше система CIERGB является колориметрической системой. Однако во встречающейся в настоящее время терминологии под "системой RGB" иногда понимают систему описания цветов, которая не является стандартной колориметрической системой. Наиболее часто это встречается в допечатных процессах при обработке цветной изобразительной информации. Цвета, так называемой в этом случае, "системы RGB" зависят от конкретного устройства, например монитора или сканера. Их нельзя охарактеризовать постоянной, конкретной длиной волны. Например, известно, что цвет в интервале длин волн от 620 нм до 700 нм является красным, и любое излучение произвольной мощности в этом интервале можно назвать "R". То же самое относится к "G" и "B". Различные мониторы один и тот же цвет могут воспроизводить по-

разному, так как каждый из них имеет свои персональные характеристики (цветовую температуру, люминофоры и т.д.). Но и эти характеристики не постоянны и могут меняться со временем, а также от устройства к устройству. Поэтому аппаратно-зависимые цвета "системы RGB" не имеют никакого отношения к принятой в 1931 г. колориметрической системе RGB.

2. Колориметрическая система RGB в настоящее время практически не применяется. Ее следует рассматривать как вспомогательную, позволяющую лучше понять общие принципы метрологии цвета на основе реальных основных цветов. Поэтому ей и уделено внимание в данном пособии.

Следует отметить, что для большинства разработанных в дальнейшем колориметрических систем основой служила именно CIERGB. Поэтому те недостатки, которые были заложены в основе этой колориметрической системы, в дальнейшем передавались и другим системам.

Одновременно с колориметрической системой RGB была принята еще одна. В качестве основных в ней были выбраны цвета более насыщенные, чем спектральные. В связи с тем, что таких цветов в природе нет, их обозначили символами XYZ, а сама колориметрическая система получила название CIEXYZ. К разработке этой колориметрической системы побудил ряд причин, связанных с некоторыми неудобствами при работе с системой CIERGB. Одним из недостатков системы CIERGB является наличие отрицательных координат для целого ряда реальных цветов, что затрудняет расчет цветовых характеристик по спектральным кривым. Другой существенный недостаток системы CIERGB - необходимость определения всех трех составляющих цвета для определения количественной характеристики цвета - яркости. В связи с этим в основу построения колориметрической системы XYZ были положены следующие положения:

- 1) все реальные цвета должны иметь только положительные координаты;
- 2) яркость должна определяться одной координатой цвета;
- 3) координаты белого цвета равноэнергетического источника должны иметь координаты 0,33; 0,33.

Путем математических преобразований с учетом вышеуказанных требований удалось осуществить переход от реальных цветов CIERGB к нереальным (сверхнасыщенным) CIEXYZ. В соответствии со вторым условием построения колориметрической системы XYZ цвета X и Z имеют яркостные коэффициенты, равные нулю ($L_x = L_z = 0$) принимают равным единице ($L_y = 1$). В этом случае формула для расчета яркости B значительно упрощается:

$$B_{ц} = 680 \cdot Y, \quad (J14.4)$$

где Y - координата цвета.

Яркостной коэффициент цвета в этом случае определяется координатой цветности (y):

$$L_y = y. \quad (J14.5)$$

В общем виде уравнение цвета в CIEXYZ записывается следующим образом:

$$Ц = X\mathbf{X} + Y\mathbf{Y} + Z\mathbf{Z}.$$

Переход к уравнению цветности в CIEXYZ осуществляется через m так же, как и в системе CIERGB:

$$Ц = \frac{X}{m}\mathbf{X} + \frac{Y}{m}\mathbf{Y} + \frac{Z}{m}\mathbf{Z}.$$

В настоящее время стандартная колориметрическая система XYZ является рабочей. Именно в ней проводят непосредственно колориметрические измерения по определению цветовых характеристик (яркости, доминирующей длины волны и чистоты цвета). Для определения качественных характеристик цветности используют диаграмму x, y , полученную расчетным путем с использованием кривых сложения $\bar{x}(\lambda), \bar{y}(\lambda), \bar{z}(\lambda)$. Ординаты кривых сложения $\bar{x}(\lambda), \bar{y}(\lambda), \bar{z}(\lambda)$ определяются следующим образом:

$$\bar{x}(\lambda) = X_\lambda / \Phi_{0\lambda}, \bar{y}(\lambda) = Y_\lambda / \Phi_{0\lambda}, \bar{z}(\lambda) = Z_\lambda / \Phi_{0\lambda}, \quad (J14.6)$$

где $X_\lambda, Y_\lambda, Z_\lambda$ - основные цвета в системе XYZ; $\Phi_{0\lambda}$ - спектральная мощность источника излучения.

Основной особенностью кривых сложения в колориметрической системе XYZ является то, что кривая $\bar{y}(\lambda)$ совпадает по форме и положению с кривой относительной световой

эффективности. Кроме того, кривая $\bar{x}(\lambda)$ имеет два резко выраженных максимума с $\lambda = 440$ нм и $\lambda = 600$ нм и минимум в области 505 нм. Такая форма кривой $\bar{x}(\lambda)$ объясняется условиями преобразования CIERGB в CIEXYZ. Площади, ограниченные каждой кривой и осью координат, одинаковы.

С учетом различных требований, выдвигаемых практикой цветовоспроизведения, было создано несколько колориметрических систем. В каждой из них основные цвета выбирались на определенных условиях. Как правило, переход от одной системы цветных координат к другой осуществлялся с помощью пересчета. Так осуществлялся и пересчет от реальных цветов системы CIERGB к нереальным CIEXYZ. Так как опытным путем координаты нереальных (более насыщенных, чем спектральные) цветов определить нельзя, то метод пересчета является, по существу, единственным. Из закона Грассмана следует, что между координатами любых цветов, выраженных в разных системах, должна существовать линейная зависимость. В связи с этим в основе преобразований колориметрических систем лежит решение линейных уравнений. Чтобы перейти от одной колориметрической системы к другой, необходимо измерить основные старой системы в координатах новой системы. В результате расчета были получены следующие формулы пересчета из CIERGB в CIEXYZ:

$$\begin{aligned} X &= 2,7689R + 1,7517G + 1,1302B; \\ Y &= 1,0000R + 4,59076G + 0,0601B; \\ Z &= 0,0565G + 5,5943B. \end{aligned} \quad (Л4.7)$$

Любое излучение характеризуется распределением по спектру. Поэтому, зная значение удельных координат, можно рассчитать координаты цветов излучений произвольной мощности. Расчет основан на использовании свойства аддитивности цветных координат. Учитывая диапазон измерений для излучения со сплошным спектром, можно записать:

$$X = \int_{400}^{700} \bar{x}(\lambda) \Phi_0(\lambda) d\lambda, Y = \int_{400}^{700} \bar{y}(\lambda) \Phi_0(\lambda) d\lambda, Z = \int_{400}^{700} \bar{z}(\lambda) \Phi_0(\lambda) d\lambda.$$

Если речь идет о несамосветящихся телах, т.е. таких, которые отражают свет или пропускают его, то под знак интеграла вводят или коэффициент отражения ρ , или коэффициент пропускания τ . Так можно сделать по той причине, что тела природы имеют непрерывные кривые распределения отражения или пропускания по спектру.

Тогда цветные координаты, например, светопропускающей среды будут иметь следующий вид:

$$X = \int_{400}^{700} \bar{x}(\lambda) \Phi_0(\lambda) \tau(\lambda) d\lambda, Y = \int_{400}^{700} \bar{y}(\lambda) \Phi_0(\lambda) \tau(\lambda) d\lambda, Z = \int_{400}^{700} \bar{z}(\lambda) \Phi_0(\lambda) \tau(\lambda) d\lambda. \quad (Л4.8)$$

Для светотражающей среды в формуле (Л4.8) функция пропускания $\tau(\lambda)$ заменяется функцией спектрального отражения $\rho(\lambda)$. В приведенном случае рассмотрен расчет координат цвета для системы CIEXYZ. Однако он может быть взят за основу и для других систем основных цветов.

Цвета несветящихся тел зависят от спектрального состава падающего на них света. Существует множество источников света как естественных, так и искусственных, при которых может наблюдаться тот или иной объект. Кроме того, каждый из этих источников, особенно естественных, может иметь различное распределение потока, в зависимости от конкретных условий. Так, спектральный состав солнечного света зависит от времени года, наличия облаков и других факторов, а спектр лампы накаливания - от режима питания и т.д. В связи с этим при рассмотрении одного и того же объекта (например, биоткани разных цветовых оттенков) при дневном свете и свете лампы накаливания можно обнаружить различия в цвете. Для того чтобы было возможно непосредственно сопоставлять между собой результаты различных цветных измерений, используют несколько стандартных источников. CIE дает следующие определения понятий "излучение" и "источник". Под термином "источник" понимается физический объект, дающий то или иное излучение (например, солнце и т.д.). Под термином "излучение" понимается

определенное спектральное распределение энергии, попадающей на объект. При этом заданное спектральное распределение не обязательно должно быть получено с помощью одного источника. В 1931 году CIE установила ряд стандартных излучений и источников. Их краткая характеристика дана ниже.

Стандартное излучение А характеризуется тем же распределением излучения в видимой части спектра, что и абсолютно черное тело при $T = 2856$ К. Это средняя цветовая температура лампы накаливания.

Стандартное излучение В воспроизводит распределение энергии в спектре прямого солнечного света с коррелированной цветовой температурой $T = 4874$ К.

Стандартное излучение С воспроизводит излучение дневного неба, затянутого облаками с коррелированной цветовой температурой $T = 6774$ К.

Как показали более поздние исследования, излучение дневного света не всегда точно воспроизводится излучениями В и С. Кроме того, появилась необходимость более полно учитывать ультрафиолетовый диапазон спектра дневного света, особенно при оценке характеристик цвета люминесцирующих объектов. В связи с этим CIE в 1963 г. определила спектральное распределение различных фаз дневного света в интервале 300-830 нм и рекомендовала несколько новых излучений D. Излучение D_{65} - с коррелированной цветовой температурой 6504^0 К. В настоящее время оно принято CIE в качестве стандартного излучения. Поскольку использование только излучения D_{65} не удовлетворяло необходимым требованиям, CIE были предложены излучения D_{50} , D_{55} и D_{75} . D_{50} и D_{55} , соответственно с коррелированной цветовой температурой 5000^0 К и 5500^0 К, предназначены для тех случаев, когда требуется фаза дневного света с желтоватым оттенком, а D_{75} - для фазы дневного света с более голубым оттенком. Исследования показали, что цветность излучения дневного света не совпадает с цветностью черного тела и характеризовать дневное излучение температурой черного тела можно лишь в определенном приближении. Поэтому цветовую температуру дневного излучения принято называть коррелированной цветовой температурой.

Стандартные источники МКО (А, В, С, ..., D_{65}) воспроизводят соответствующее стандартное излучение путем выделения их из калиброванной лампы с помощью светофильтров. В нашей стране у источников В и С стандартизированы соответственно цветовые температуры 4800^0 К и 6500^0 К. Следует отметить, что эти источники применяются все реже и CIE уже не рекомендуются. Однако для характеристик прямого солнечного света и среднего дневного света их используют до сих пор. В настоящее время стандартными источниками, рекомендуемыми CIE, являются А с $T = 2856^0$ К и D_{65} с $T = 6504^0$ К. Помимо них CIE установлены источники D_{50} и D_{55} . Кроме стандартных источников в колориметрии используют еще равноэнергетический источник Е. Он характеризуется равномерным распределением энергии излучения по спектру. В таблице Л4.1 приведены координаты цветности некоторых рекомендованных CIE источников, используемых в колориметрии.

Таблица Л4.1

Координаты цветности и цветовая температура стандартных источников света.

Координаты цветности стандартных источников МКО			
Источник	Координата цветности x	Координата цветности y	Цветовая температура, К
А	0,4476	0,4074	2856
В	0,3484	0,3516	4874 (4800)
С	0,3101	0,3162	6774 (6500)
D_{55}	0,3324	0,3475	5503
D_{65}	0,3127	0,3290	6504
D_{75}	0,2990	0,3150	7504

Экспериментальная часть

Задание.

В таблице Л4.2 представлены спектры пропускания двух красителей (синего и красного), а в таблице Л4.3 показаны кривые сложения с учетом спектра излучения источника D_{65} .

1. Разработать алгоритм и программу на основе выражения Л4.8 для расчета цветовых координат красителей, спектры которых приведены в таблице.

Таблица Л4.2
Спектры пропускания красителей.

Длина волны, нм	Коэффициент пропускания для синего красителя	Коэффициент пропускания для красного красителя
390	0.65	7.6E-02
410	0.73	.04
430	0.77	2.1E-02
450	0.76	5.0E-02
470	0.71	.18
490	0.68	.27
510	0.60	.52
530	0.42	.80
550	0.23	.89
570	0.13	.99
590	5.8E-02	.99
610	0.038	.99
630	3.8E-02	.99
650	3.5E-02	.99
670	0.14	.99
690	0.59	.99
710	0.87	.99

Таблица Л4.3
Спектральные зависимости основных цветов в системе XYZ МКО 1931.

λ , нм	$\bar{x}(\lambda)$	$\bar{y}(\lambda)$	$\bar{z}(\lambda)$
390	0.01	0.00	0.10
400	0.11	0.00	0.53
410	0.38	0.01	1.80
420	1.19	0.04	5.71
430	2.33	0.10	11.37
440	3.46	0.23	17.34
450	3.72	0.42	19.62
460	2.24	0.67	18.61
470	2.12	0.99	13.99
480	1.05	1.53	8.92
490	0.33	2.14	4.79
500	0.05	3.34	2.82
510	0.10	5.13	1.61
520	0.30	7.04	0.78
530	1.69	8.78	0.43
540	2.87	9.43	0.20
550	4.27	9.80	0.09
560	5.63	9.42	0.04
570	6.95	8.68	0.02
580	8.31	7.89	0.02
590	8.61	6.35	0.01
600	9.05	5.37	0.01
610	8.51	4.27	0.00
620	7.09	3.16	0.00
630	5.06	2.06	0.00
640	3.55	1.39	0.00
650	2.12	0.81	0.00
660	1.25	0.46	0.00
670	0.68	0.25	0.00
680	0.35	0.13	0.00
690	0.15	0.05	0.00
700	0.08	0.03	0.00

2. Вычислить цветовые координаты представленных красителей и нанести их на цветовой треугольник XY (рис. Л4.1). Убедится, что рассчитанные цветовые координаты дает правильную оценку цвета красителей.

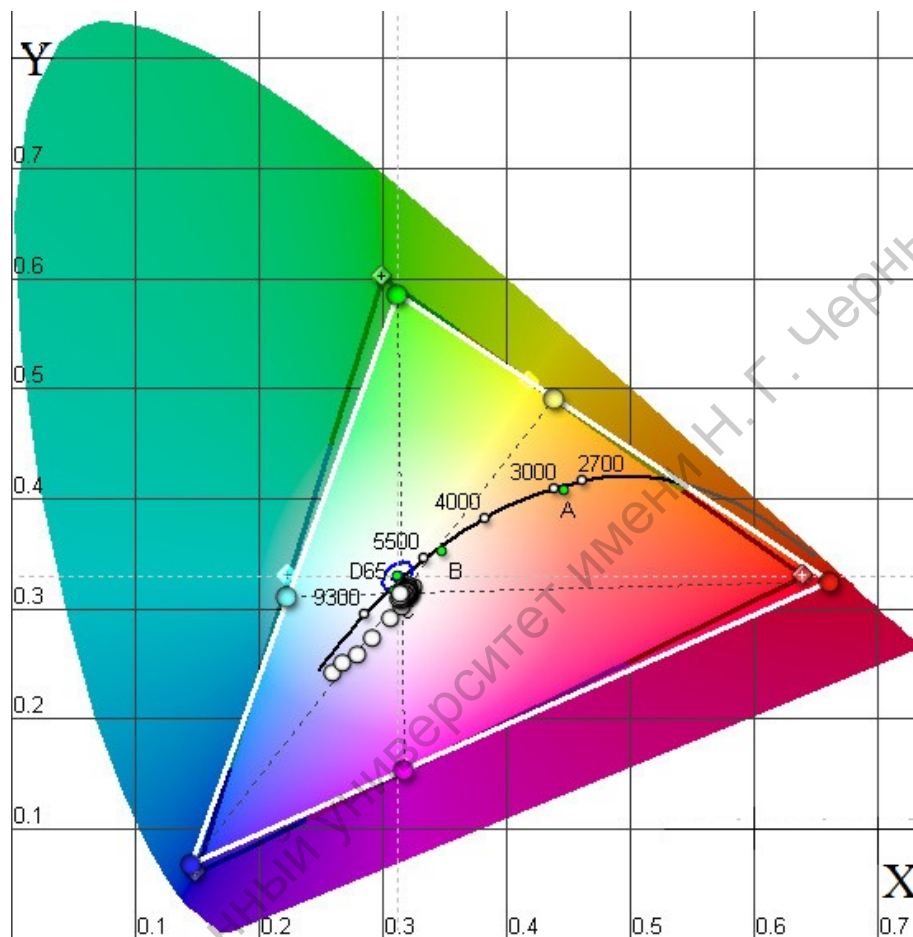


Рис. Л4.1 Цветовой треугольник.

Литература.

1. А.Б. Шашлов, Р.М. Уарова, А.В. Чуркин ОСНОВЫ СВЕТОТЕХНИКИ: Учебник для вузов / М.: Изд-во МГУП. 2002. 280 с. (<http://www.hi-edu.ru/e-books/xbook322/01/about.htm>)
2. Н.Н. Красильников Цифровая обработка 2D и 3D изображений / С.-Петербург: БХВ-Петербург. 2011. 608 с.

Дополнительная литература.

1. Дисплеи. / Под ред. Ж. Панкова, М.: Мир, 1982. 316 с.
2. М.М. Гуревич Цвет и его измерение. Ленинград: Из – во АН СССР. 1950. 268 с.