

Повышение точности реконструкции и глубинной чувствительности в мезоскопической флуоресцентной молекулярной томографии

© А.Б. Коновалов¹, В.В. Власов¹, С.И. Самарин¹, И.Д. Соловьев², Д.К. Тучина^{3,4}, А.П. Савицкий², В.В. Тучин^{3,4,5}

¹ Российский федеральный ядерный центр — ВНИИ технической физики им. академика Е.И. Забабахина, Снежинск, Россия

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр „Фундаментальные основы биотехнологии РАН“, Москва, Россия

³ Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

⁴ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

⁵ Институт проблем точной механики и управления, Саратовский научный центр РАН, Саратов, Россия

e-mail: a_konov@mail.vega-int.ru

Поступила в редакцию 04.02.2025 г.

В окончательной редакции 14.02.2025 г.

Принята к публикации 07.04.2025 г.

Методом мезоскопической флуоресцентной молекулярной томографии (ФМТ) экспериментально реконструирован фантом с флуорофором, образующим периодические пространственные структуры. Показано, что использование геометрии обратного рассеяния с высокой плотностью расположения источников и детекторов способствует повышению точности реконструкции структур и позволяет разрешать структуры диаметром 0.55 mm на глубинах до 5 mm включительно. Также проведена серия расчетов функций чувствительности по модернизированной программе TurbidMC, реализующей метод Монте-Карло, с целью исследования глубинной чувствительности предложенного метода мезоскопической ФМТ. Результаты расчетов демонстрируют потенциальную возможность повышения глубинной чувствительности посредством оптического просветления поверхностного слоя объекта.

Ключевые слова: флуоресцентная молекулярная томография, мезоскопический режим, функция чувствительности, фантом с флуорофором, периодические пространственные структуры, точность реконструкции, глубинная чувствительность.

DOI: 10.61011/OS.2025.05.60787.23-25

Введение

В последние годы флуоресцентная молекулярная томография (ФМТ) получила достаточно широкое распространение как метод молекулярного имиджинга, применяемый для решения задач экспериментальной онкологии [1,2]. Как известно, „камнем преткновения“ в диффузионном имиджинге является невысокое пространственное разрешение. Одним из способов улучшения разрешения является переход от макроскопического режима регистрации данных к мезоскопическому режиму [3,4], при котором источники и детекторы располагаются на малых расстояниях друг от друга (до 10 mm) и восстанавливаются области интереса сравнительно небольшого размера (порядка $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$). Подобный переход позволил исследователям, наконец, добиться желаемого субмиллиметрового разрешения для ФМТ-изображений [5,6]). Однако переход к мезоскопическому режиму неминуемо связан с усилением анизотропии рассеяния света и ухудшением глубинной чувствительности

метода ФМТ. Поэтому актуальным является вопрос, какие же глубины доступны для воспроизведения флуоресцентных структур методом мезоскопической ФМТ.

В последние несколько лет авторами настоящей работы разработан и частично исследован оригинальный метод времяразрешенной ФМТ, основанный на асимптотическом приближении функции источника флуоресценции [7–11]. Особенностью предложенного метода ФМТ является то, что потенциально он способен реконструировать пространственные распределения не только коэффициента поглощения флуорофора (или концентрации флуорофора), но и распределения времени жизни флуоресценции. Этот параметр особенно ценится исследователями в области экспериментальной онкологии и флуоресцентного имиджинга, поскольку устойчив к изменениям интенсивности флуоресценции при измерениях на живых объектах, является высокочувствительным к изменениям молекулярного окружения флуоресцентных биосенсоров и позволяет получить важную информацию о процессах, происходящих в опухолевых

тканях на молекулярном уровне [12–14]. В [8] изложены теоретические основы предложенного метода мезоскопической ФМТ. В работах [7,8] с помощью численных экспериментов исследован случай макроскопической ФМТ. В [10] описана программа TurbidMC, реализующая метод Монте-Карло, которая используется для моделирования флуоресцентных сигналов и расчетов функций чувствительности для мезоскопической ФМТ. Некоторые предварительные итоги этих исследований проанализированы в работе [11]. В работе [9] описан первый физический эксперимент по реконструкции фантома с флуорофором. При этом впервые использовался мезоскопический режим регистрации данных. Удалось корректно восстановить распределения коэффициента поглощения флуорофора и времени жизни флуоресценции. Однако флуорофор располагался на глубине до 4 mm и представлял собой цилиндр сравнительно большого диаметра (3 mm), что не позволило сделать сколь-нибудь определенные выводы ни о пространственном разрешении метода, ни о его глубинной чувствительности. Таким образом, актуальным является вопрос, способен ли наш метод воспроизводить флуоресцентные структуры субмиллиметрового размера на глубинах более 4 mm. Для ответа на этот вопрос поставлен эксперимент по реконструкции фантома с флуорофором, образующим периодические пространственные структуры. В настоящей работе приводится описание эксперимента и представляются его результаты. Поскольку они оказались хуже, чем можно было ожидать, потребовалось провести ряд дополнительных расчетов с целью оценки потенциальной возможности улучшения точности реконструкции и глубинной чувствительности метода мезоскопической ФМТ. Результаты и анализ этих расчетов также приводятся в настоящей статье.

Постановка задачи реконструкции

Вариант метода мезоскопической ФМТ, который использовался в работе [9], предполагал двухшаговый подход к решению задачи реконструкции. На первом шаге восстанавливается так называемая функция распределения параметров флуоресценции, содержащая как распределение коэффициента поглощения флуорофора, так и распределение времени жизни флуоресценции. На втором шаге выполняется разделение этих распределений посредством решения переопределенной системы уравнений. Поскольку этап разделения вносит дополнительные погрешности в результаты реконструкции, и, учитывая сложность поставленной в настоящей работе задачи, было решено на данном этапе исследований ограничиться реконструкцией только распределения коэффициента поглощения флуорофора. При этом время жизни флуоресценции полагалось априорно заданной константой. Таким образом, метод мезоскопической ФМТ, использованный в настоящей работе, состоит в

следующем. Задача реконструкции сводится к обращению линейного интегрального уравнения Фредгольма первого рода:

$$p(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t) = k \int_V W(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \mathbf{r}, t) \mu_{af}(\mathbf{r}) d^3r, \quad (1)$$

относительно неизвестного распределения коэффициента поглощения флуорофора $\mu_{af}(\mathbf{r})$. В формуле (1) $p(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t)$ — времяразрешенный сигнал флуоресценции (флуоресцентная временная функция рассеяния точки, ФВФРТ), возбуждаемой мгновенным источником в точке $\mathbf{r}_s$ в момент времени $t_s = 0$ и регистрируемой в точке $\mathbf{r}_d$ в момент времени t , k — безразмерный коэффициент пропорциональности, $W(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \mathbf{r}, t)$ — функция чувствительности, рассчитываемая по программе TurbidMC [10] и представляющая собой 3D-распределение весовых коэффициентов для данной связи источник–детектор (ИД-связи). Для коэффициента k в нашем случае справедливо соотношение

$$k = \frac{4Dc\gamma}{\tau v^2 + 4Dc}, \quad (2)$$

где D и c — коэффициент диффузии фотонов и скорость света в среде на длине волны возбуждающего излучения, γ — квантовый выход флуоресценции, τ — априорное значение времени жизни флуоресценции, v — средняя скорость движения центра масс мгновенного распределения фотонов вдоль их средней траектории [8,15].

Далее выполняется дискретизация уравнения (1) так, как это описано, например, в работе [8], и обратная задача сводится к решению системы линейных алгебраических уравнений

$$\mathbf{W}\boldsymbol{\mu} = \mathbf{p}, \quad (3)$$

где $\mathbf{W} \equiv \{W_{i,j}\}_{1,1}^{IJ}$ — матрица чувствительности, в которую записываются дискретные транспонированные функции чувствительности, рассчитанные для всех I ИД-связей, участвующих в реконструкции; $\boldsymbol{\mu} \equiv \{\mu_j\}_1^J$ — вектор, описывающий искомое распределение $\mu_{af}(\mathbf{r})$; $\mathbf{p} \equiv \{p_i\}_1^I$ — вектор измерительных данных, в который записываются результаты обработки измеренных в эксперименте флуоресцентных временных откликов (ФВО).

Поскольку система (3) получается, как правило, сильно недоопределенной, то для ее решения используют оптимизационные алгоритмы с регуляризацией, например, алгоритмы, основанные на теории опознавания со сжатием [16]. В настоящей работе для решения (3) выбран алгоритм ART-FIST (algebraic reconstruction technique with fast iterative shrinkage thresholding), сочетающий алгебраическую реконструкцию Гордона [17] и быструю мягкую пороговую фильтрацию Бека и Тебоулла [18]. Алгоритм подробно описан в работе [8] и хорошо зарекомендовал себя при реконструкции разреженных флуоресцентных томограмм.

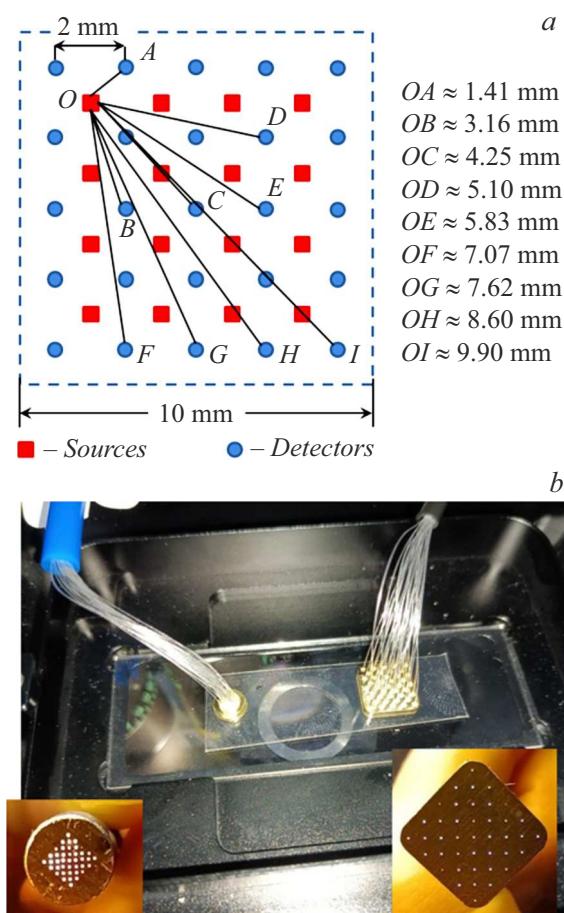


Рис. 1. Геометрия регистрации данных и значения всех различных расстояний между источниками и детекторами (а), фотография зонда (слева — сторона установки, справа — сторона фантома) (b).

1. Эксперимент и предобработка данных

Эксперимент по сканированию фантома с флуорофором проводился в ФИЦ „Фундаментальные основы биотехнологии РАН“ (Москва, Россия). В эксперименте использовалась геометрия обратного рассеяния со схемой расположения точек ввода возбуждающего излучения (источников) и точек вывода флуоресценции (детекторов), как показано на рис. 1, а. Справа на рисунке указаны значения всех различных расстояний между источниками и детекторами, для которых рассчитывались функции чувствительности. Согласно данной схеме, был разработан зонд, содержащий 41 волокно с диаметром сердцевины $100\text{ }\mu\text{m}$ ОКМ-UV-100/110/150-170 NA 0.22 (НТЦ волоконно-оптических устройств, Россия), фиксированное в двух держателях. Фотография зонда представлена на рис. 1, b.

Флуоресцентная томографическая установка выполнена с использованием оптомеханических блоков ThorLabs (США), лазера LDH D-TA-560B PicoQuant (Германия),

оптического волоконного световода с коллиматором типа KineFLEX QiOptiq (Великобритания), гальваносканера GVSM002 Thorlabs (США), сканирующей линзы SL50-CLS ThorLabs, тубусной линзы TTL200-A ThorLabs, дихроичного зеркала Di03-R488/561-t1-25 $\times$ 36 Semrock (США), фильтров эмиссии HQ585/40 и ZET561NF (Chroma, США), объектива $2\times/0.10$ NA PlanApo (Nikon, Япония), матрицы лавинных фотодиодов SPC3 (Micro Photon Devices, Италия) и объектива $4\times/0.1$ NA Plan Achromat (Nikon, Китай). Можно заметить, что системы детектирования типа SPC3 все чаще используются в флуоресцентном имиджинге и спектроскопии времени жизни [19]. Схема экспериментальной установки ФМТ показана на рис. 2, а, а на рис. 2, b представлена ее фотография.

Для заведения возбуждающего излучения в волоконные световоды и регистрации флуоресцентного сигнала ответную часть оптического зонда помещали в фокальную плоскость фантома, фиксируя зонд в 3-позиционной микрометрической подвижке с поворотным держателем. Центры сердцевины каждого из оптических световодов совмещались с точками ввода и вывода света в соответствии со схемой рис. 1, а.

В качестве материала фантома выбран силикон Sylgard 184 (Dow Corning, США) с массовой долей

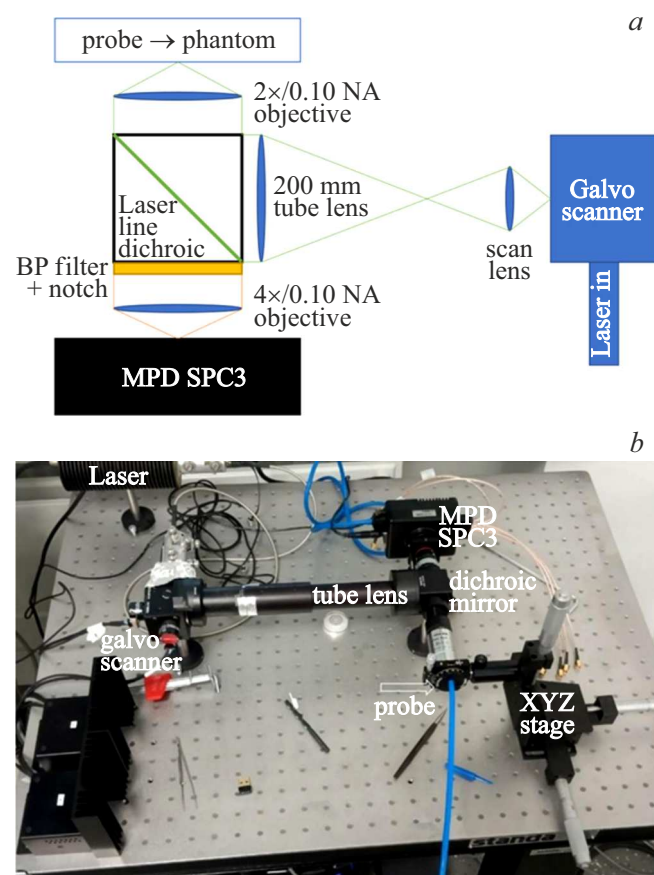


Рис. 2. Схема экспериментальной установки (а) и ее общая фотография (b).

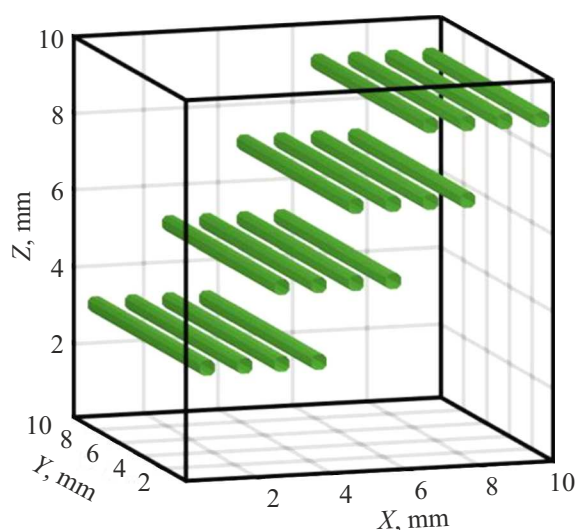


Рис. 3. Область реконструкции фантома размером $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$, содержащая периодические пространственные структуры.

TiO_2 0.13%. В целях адекватного расчета функций чувствительности в Саратовском национальном исследовательском государственном университете им. Н.Г. Чернышевского (Саратов, Россия) были выполнены измерения оптических параметров образца фантома: коэффициента поглощения, коэффициента рассеяния, транспортного коэффициента рассеяния, фактора анизотропии рассеяния и показателя преломления. Сначала в спектральном диапазоне 500–700 nm с шириной шага 2 nm на спектрофотометре Lambda 950 (Perkin Elmer, США) регистрировались спектры диффузного отражения и полного пропускания образца. Затем проводилась регистрация спектра коллимированного пропускания образца с использованием волоконно-оптического спектрометра USB4000-Vis-NIR (Ocean Optics, США) в том же спектральном диапазоне. Спектры диффузного отражения, коллимированного и полного пропускания образца фантома, использовались для расчета спектральных зависимостей коэффициента поглощения, фактора анизотропии рассеяния и транспортного коэффициента рассеяния с помощью инверсного метода добавления-удвоения [20]. Показатель преломления образца фантома измерялся на многоволновом рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (Atago, Япония) на длине волны 589 nm. Коэффициент рассеяния μ_s образца определялся с использованием [21] выражения

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g), \quad (4)$$

где μ'_s — транспортный коэффициент рассеяния, g — фактор анизотропии рассеяния.

В фантоме были сформированы отверстия диаметром 0.55 mm для заполнения раствором с флуорофором таким образом, чтобы флуорофор образовывал периодические пространственные структуры на глубинах 3, 5, 7 и 9 mm. Область реконструкции размером

Значения оптических параметров фантома и параметров флуоресценции

Параметр	Значение
Коэффициент поглощения фантома, mm^{-1}	0.09
Коэффициент рассеяния фантома, mm^{-1}	1.82
Фактор анизотропии рассеяния фантома	0.45
Показатель преломления фантома	1.43
Коэффициент поглощения флуорофора, mm^{-1}	0.17
Коэффициент рассеяния флуорофора, mm^{-1}	0
Квантовый выход флуоресценции	0.48
Время жизни флуоресценции, ps	2200

$10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$ с периодическими пространственными структурами показана на рис. 3. В качестве флуорофора был выбран флуоресцентный белок TagRFP с концентрацией, соответствующей коэффициенту поглощения 0.17 mm^{-1} (длина волны 561 nm). Параметры флуоресценции данного флуорофора приведены на сайте [22]. Поскольку длины волн возбуждения (561 nm) и эмиссии (585 nm) весьма близки, а для расчетов функций чувствительности достаточно получить грубые оценки параметров (с погрешностью приблизительно 15%), то для обеих длин волн были использованы одинаковые значения оптических параметров фантома и параметров флуоресценции, которые приведены в таблице.

Предобработка измеренных ФВО была выполнена с использованием пакета MATLAB по алгоритму, описанному в [9], и состояла в компенсации шума каждого ФВО и его деконволюции с инструментальным откликом, также измеренным в эксперименте, с целью оценки ФВФРТ. Для компенсации шума был использован фильтр Савицкого–Голая [23], реализованный в MATLAB оператором `sgolayfilt(·)`. Деконволюция сглаженных ВФО с инструментальным откликом выполнялась с помощью ускоренного алгоритма Люси–Ричардсона [24], хорошо зарекомендовавшего себя при обработке как одномерных сигналов, так и изображений. Этот алгоритм реализован в пакете MATLAB оператором `deconvlucy(·)`. Далее для каждой i -й полученной ФВФРТ вычислялись величины

$$p_i = \int_0^{t_d} \text{ФВФРТ}_i(t) dt, \quad (5)$$

где t_d — время „отсечки“ импульса по переднему фронту (время задержки детектора). Именно величины (5) записывались в вектор измерительных данных $\mathbf{p}$.

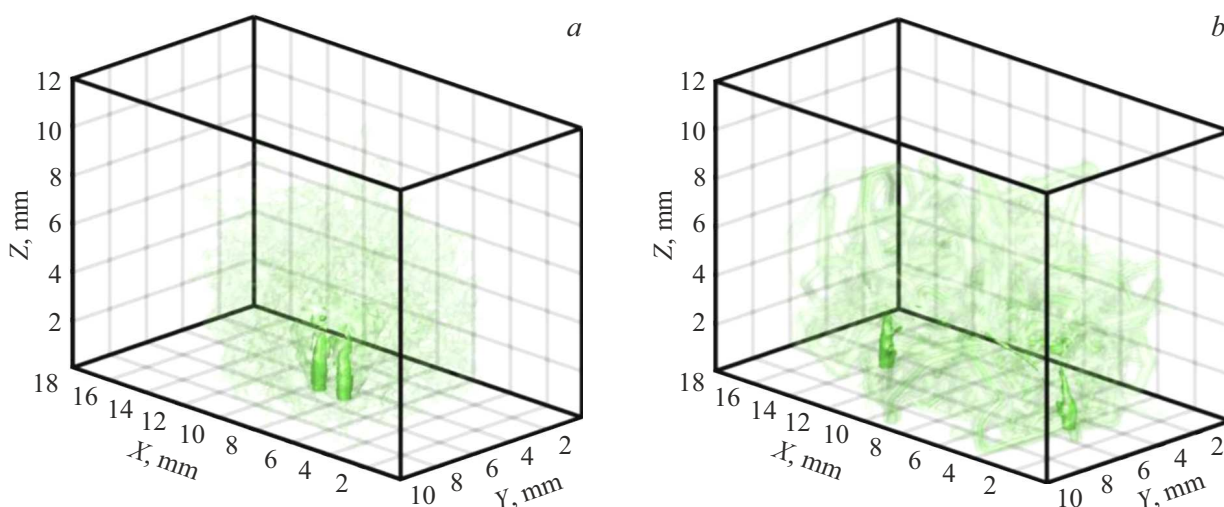


Рис. 4. 3D-изображения функций чувствительности, рассчитанных для двух расстояний между источником и детектором: 1.41 (a), 9.9 mm (b).

Расчет и анализ функций чувствительности

С целью расчета десяти функций чувствительности для расстояний, указанных на рис. 1, *a*, был численно задан фантом с неким структурным наполнением флуорофором, отличным от реального фантома. Так же как и у реального фантома (рис. 3), численный фантом имел периодические структуры на тех же глубинах 3, 5, 7 и 9 mm. Но эти структуры были образованы не цилиндрами, а параллелепипедами с квадратным сечением размером $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$. Кроме того, ряд на каждой глубине состоял не из четырех, а из пяти структур. Это было сделано умышленно, чтобы искусственно задать некую „погрешность“ при использовании априорного знания. Таким образом, использовалась априорная информация только о глубинах расположения структур, но не о точной их форме и месте локализации. Расчеты функций чувствительности выполнялись не для куба $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$ (выбранный размер области реконструкции), а для параллелепипеда $18 \times 10 \times 12 \text{ mm}^3$. При этом источник и детектор располагались на равном удалении от центра грани $z = 0$ параллелепипеда. Это было сделано для того, чтобы получить наиболее полное представление о характере распределений не только для коротких, но и для длинных ИД-связей.

Расчеты выполнялись с использованием программы TurbidMC на многопроцессорном вычислительном комплексе Российского федерального ядерного центра — ВНИИ технической физики им. Е.И. Забабахина (Снежинск, Россия). В каждом расчете рассматривалось от 10^9 до 10^{10} историй, каждая из которых начиналась вводом в численно заданный фантом фотона возбуждения и продолжалась моделированием его траектории, а также траекторий порожденных им флуоресцентных

фотонов. Все траектории моделировались до тех пор, пока вес фотона не уменьшится до заданной величины (в нашем случае 10^{-12}). Время одного расчета данной серии составило 10–15 h.

В качестве примеров результаты расчетов функций чувствительности для самой короткой (1.41 mm) и самой длинной (9.9 mm) ИД-связей приведены на рис. 4 в виде 3D-распределений весовых коэффициентов. Визуальный анализ 3D-изображений рис. 4 свидетельствует, что полученные распределения имеют обширные разреженные зоны и весьма далеки от гладких функций. Это наводит на мысль о необходимости улучшения статистической точности вычислений. Чтобы предварительно оценить потенциальную возможность воспроизведения различных слоев периодических пространственных структур фантома при реконструкции с использованием рассчитанных функций чувствительности, была выполнена следующая последовательность действий. Во-первых, каждой ИД-связи рис. 1, *a* была поставлена в соответствие своя функция чувствительности. Причем это было сделано, разумеется, уже для куба размером $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$. Во-вторых, были просуммированы все функции чувствительности и получена 3D-картина распределения суммы по пространству области реконструкции (рис. 5, *a*), а также визуализированы сечения этого распределения на глубинах залегания периодических структур (рис. 5, *b–e*). Из рис. 5 видно, что в случае глубин 3 и 5 mm (рис. 5, *b, c*) имеет место хорошее заполнение пространства, на глубине 7 mm (рис. 5, *d*) оно хуже, на глубине 9 mm (рис. 5, *e*) распределение превращается в разреженное. Таким образом, еще до реконструкции стало ясно, что с воспроизведением структур на глубинах 7 и 9 mm могут возникнуть серьезные проблемы.

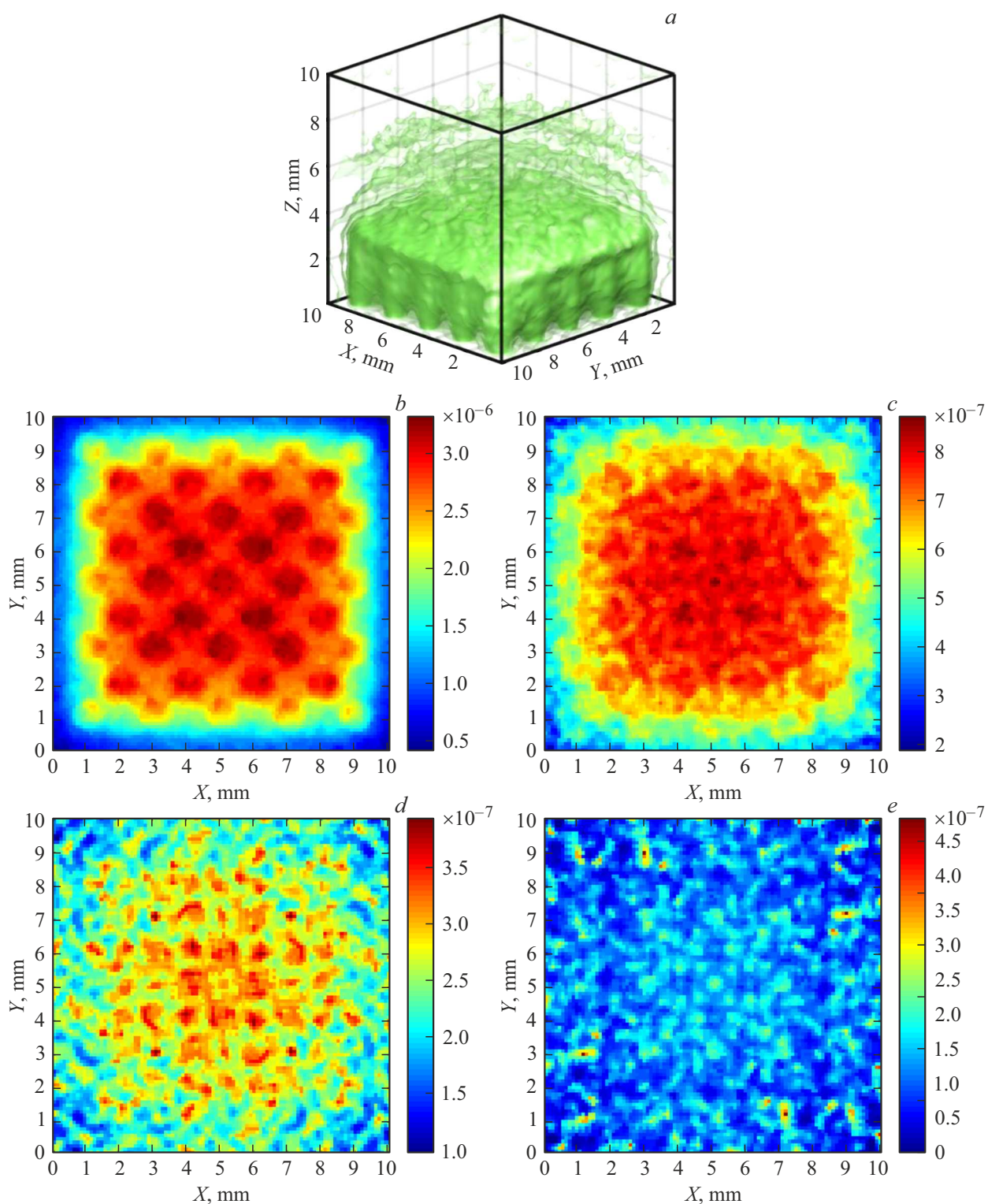


Рис. 5. 3D-распределение суммы функций чувствительности (a) и его сечения на глубине 3 (b), 5 (c), 7 (d), 9 mm (e).

Результаты реконструкции

Восстанавливалась область реконструкции размером $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$, размер вокселя был выбран равным 0.1 mm. Таким образом, число вокселей и соответ-

ственно столбцов матрицы чувствительности W было равно $J = 1000000$. Число ИД-связей и строк матрицы равнялось $I = 16 \times 25 = 400$. Как уже было сказано выше, для реконструкции использовался алгоритм ART-FIST, подробно описанный в работе [8]. Параметры

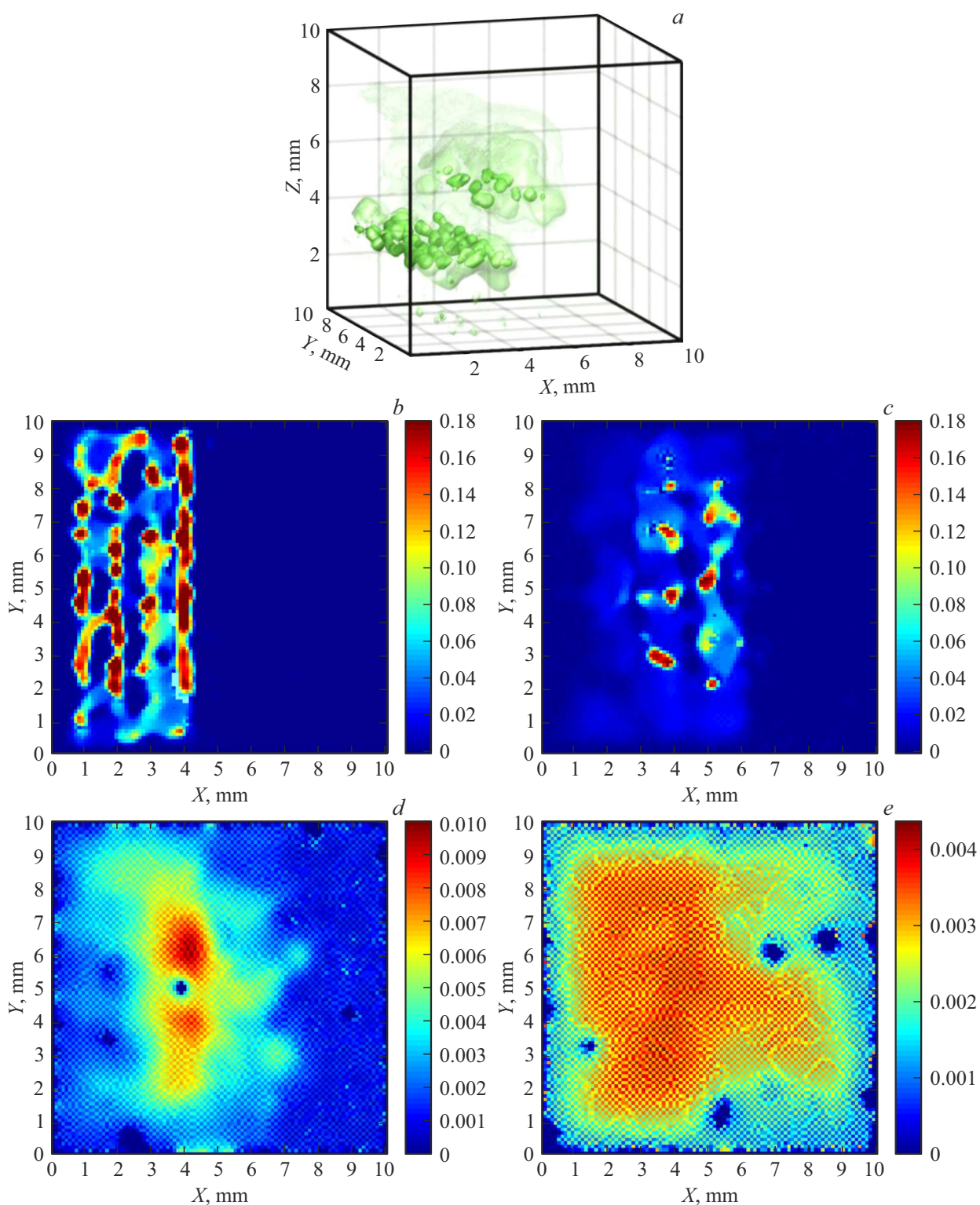


Рис. 6. Результаты реконструкции периодических пространственных структур: 3D-изображение (*a*) и его 2D-сечения на глубинах залегания структур 3 (*b*), 5 (*c*), 7 (*d*), 9 mm (*e*).

алгоритма также выбирались в соответствии с тем, как это было предложено в той же работе. Результаты реконструкции приведены на рис. 6. На рис. 6, *a* дано 3D-изображение. Рисунки 6, *b–e* демонстрируют 2D-

сечения 3D-изображения на глубинах залегания периодических структур 3, 5, 7 и 9 mm. Здесь и далее палитры изображений проградированы в обратных миллиметрах. Видно, что структуры на глубине 3 mm воспро-

изводятся с искажением (рис. 6, *b*). На глубине 5 mm видны лишь фрагменты структур (рис. 6, *c*). Глубины 7 и 9 mm вообще оказались недоступны для воспроизведения (рис. 6, *d, e*). Для 2D-изображений рис. 6, *b, c* рассчитаны такие количественные характеристики качества изображения, как коэффициент корреляции [25] и показатель отклонения [26]. Получены значения 0.7965 и 0.6207 для изображения рис. 6, *b* и 0.6051 и 0.8695 для изображения рис. 6, *c* соответственно. Эти значения также говорят о неудовлетворительном качестве восстановленных томограмм. Таким образом, актуальными стали следующие вопросы. Можно ли улучшить качество воспроизведения структур на глубинах 3 и 5 mm? Есть ли возможность сделать глубины 7 и 9 mm доступными для воспроизведения?

О возможности улучшения точности реконструкции

Первое, что было сделано для ответа на вопросы, это проведена проверка корректности предобработки измеренных ФВО и формирования вектора измерительных данных *p*. Для этого был поставлен численный эксперимент, в точности повторяющий физический эксперимент. Был численно задан фантом рис. 3 и по программе TurbidMC смоделированы ФВФРТ для геометрии рис. 1, *a*. Результаты реконструкции получились очень близкими к тем, что представлены на рис. 6. Таким образом, дело оказалось не в корректности предобработки данных эксперимента, а в чем-то другом.

Далее были выдвинуты две гипотезы. Первая — недостаточная плотность расположения источников и приемников (действительно, число связей $16 \times 25 = 400$ получилось сравнительно небольшим). Вторая — неудовлетворительная статистическая точность расчета функций чувствительности. Для проверки первой гипотезы был поставлен еще один численный эксперимент, в котором число источников и детекторов было увеличено в 4 раза. Это было сделано следующим образом. Геометрическая система рис. 1, *a* смещалась в своей плоскости сначала на 1 mm по горизонтали, затем на 1 mm по вертикали и, наконец, на $\sqrt{2}/2$ mm по диагонали. Таким образом, были образованы еще три геометрические системы (или подсистемы), которые объединялись с исходной в новую геометрию. В новой геометрии источников и детекторов получалось в 4 раза больше, т. е. 64 и 100 соответственно. Что касается ИД-связей, то были использованы только связи внутри каждой из подсистем, связи источников и детекторов между разными подсистемами не задействовались при реконструкции. Это позволило избежать дополнительных трудоемких расчетов функций чувствительности. В результате в новой геометрии ИД-связей также получалось в 4 раза больше, чем в геометрии рис. 1, *a*.

Результаты реконструкции по данным, смоделированным для новой геометрии, представлены на рис. 7 в

том же формате, что и на рис. 6. Из визуального анализа рис. 7 следует, что удалось существенно улучшить качество воспроизведения периодических структур на глубинах 3 и 5 mm (рис. 7, *b, c* соответственно). Видно, что цилиндры структур хорошо разрешаются друг относительно друга. О полученном выигрыше в точности реконструкции также свидетельствуют и значения коэффициента корреляции и показателя отклонения, рассчитанные для изображений рис. 7, *b, c*: 0.9117 и 0.2114 для изображения рис. 7, *b* и 0.8643 и 0.3338 для изображения рис. 7, *c*. А вот структуры на глубинах 7 и 9 mm по-прежнему воспроизвести не получилось (рис. 7, *d, e*). Таким образом, удалось показать, что применение „геометрии высокой плотности“ позволяет существенно улучшить точность реконструкции структур на глубинах 3 и 5 mm, но все же не позволяет улучшить глубинную чувствительность предложенного метода мезоскопической ФМТ.

Что касается гипотезы о неудовлетворительной статистической точности расчета функций чувствительности, то результаты, представленные на рис. 4–6, однозначно говорят о необходимости ее повышения. Тут можно было пойти несколькими путями. Выраженный интерес у нас вызвал метод Гарднера [27], согласно которому выполняется не только прямой расчет функции чувствительности, но также и сопряженный. В сопряженном расчете детектор помещается на место источника, а источник — на место детектора. Затем выполняется суперпозиция двух расчетов — прямого и сопряженного. Примеры расчетов, представленные в работе [27], показывают, что возможно получить почти гладкую функцию чувствительности.

На настоящем этапе исследований было решено пойти другим путем и модернизировать программу TurbidMC посредством введения искусственного процесса δ -рассеяния. Процесс δ -рассеяния характеризуется введением коэффициента μ_δ для этого „фиктивного“ взаимодействия, величина которого обусловлена вероятностью образования флуоресцентного кванта в теле флуорофора. Длина пробега l выбирается из распределения

$$p(l) = \mu_t \exp(-\mu_t l) \quad (6)$$

с коэффициентом ослабления $\mu_t = \mu_a + \mu_s + \mu_\delta$, где μ_a и μ_s — коэффициенты поглощения и рассеяния соответственно. Вес фотона после взаимодействия в среде рассчитывается по формуле

$$\omega_{k+1} = \omega_k \frac{\mu_s + \mu_\delta}{\mu_t}. \quad (7)$$

Если взаимодействие произошло во флуорофоре, то флуоресцентному фотону приписывается вес

$$\omega_{k+1}^{flu} = \omega_k \frac{\mu_a}{\mu_t}. \quad (8)$$

При этом процесс рассеяния делится на два: нормальное рассеяние и δ рассеяние, которые выбираются случайно

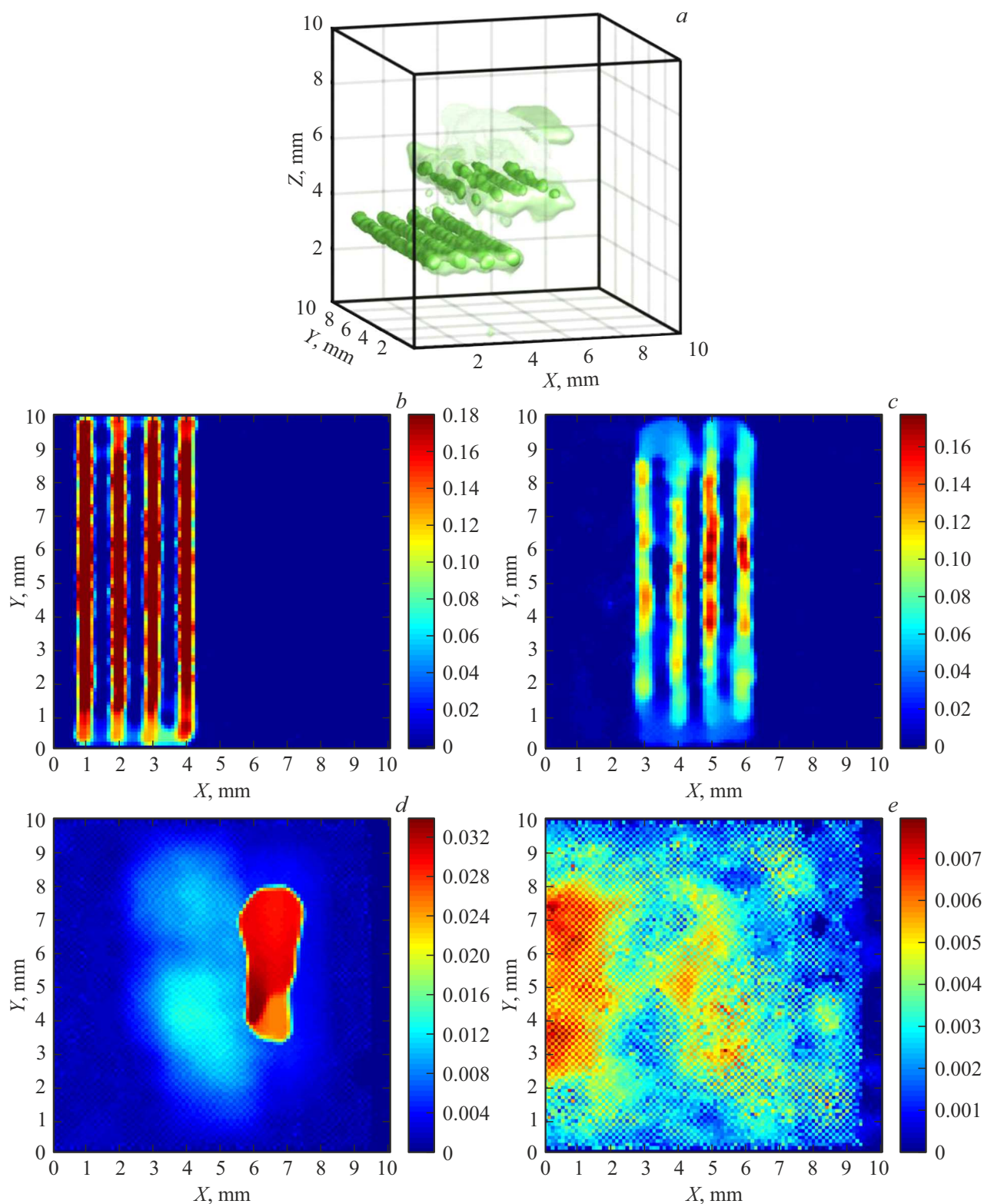


Рис. 7. Результаты реконструкции для случая геометрии высокой плотности: 3D-изображение (a) и его 2D-сечения на глубинах залегания структур 3 (b), 5 (c), 7 (d), 9 mm (e).

согласно вероятностям $\mu_s/(\mu_s + \mu_\delta)$ и $\mu_\delta/(\mu_s + \mu_\delta)$ соответственно. Выбор значения μ_δ не влияет на значения рассчитываемых величин, но влияет на дисперсию оце-

ниваемых величин, а следовательно, на статистическую погрешность оцениваемой величины. Выбор μ_δ зависит от конкретных условий задачи и связан с характерным

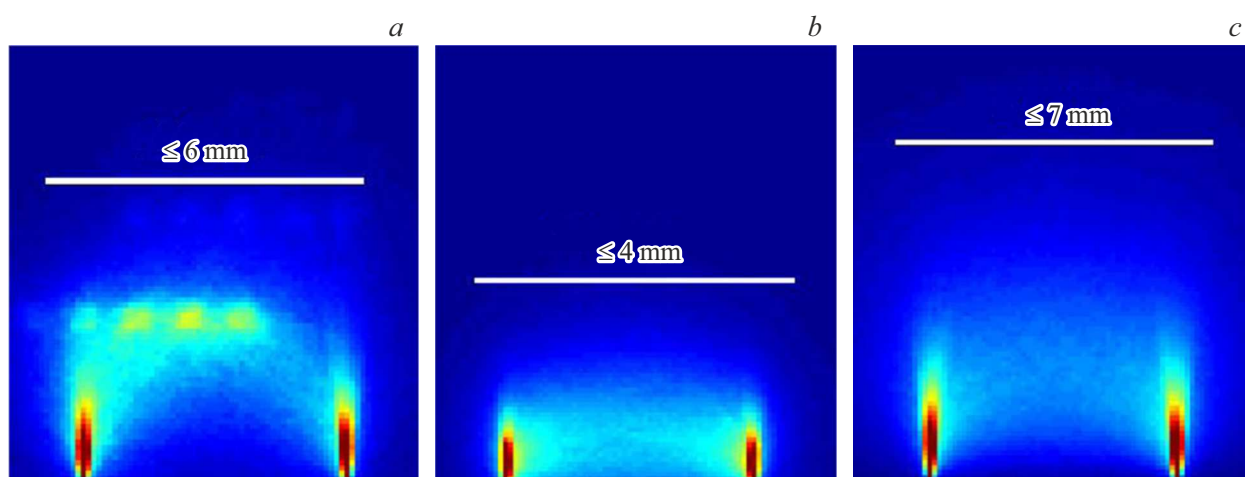


Рис. 8. Результаты расчетов функций чувствительности: с априорным знанием глубин залегания флуорофора (а), объект без флуорофора (b), объект — флуорофор с коэффициентом рассеяния, уменьшенным в 2 раза (с).

размером включений флуорофора d соотношением

$$\mu_\delta \approx \frac{1}{d} - (\mu_a + \mu_s). \quad (9)$$

Подобная модернизация программы TurbidMC позволила улучшить статистическую точность расчетов функций чувствительности. Некоторые результаты расчетов по модернизированной программе приводятся в следующем разделе.

Пути повышения глубинной чувствительности

В эксперименте рассчитывались функции чувствительности с учетом априорного знания о глубинах залегания периодических структур с флуорофором. В результате были получены не вполне удовлетворительные результаты. А что, если подходящим образом изменить условия расчета функций чувствительности? Один из вариантов является расчет для рассеивающего фантома без флуорофора — случай диффузионной оптической томографии на длине возбуждающего излучения. В работах [28,29] обосновано, что расчеты функций чувствительности для объекта с флуорофором и без него фактически идентичны, если коэффициенты поглощения объекта и флуорофора близки (в нашем случае это не совсем так, поскольку коэффициент поглощения флуорофора почти в два раза превышает коэффициент поглощения фантома (таблица)). Другой вариант изменения условий расчета — предположить, что флуорофор занимает всю область реконструкции. Правда, в этом случае придется искусственно задавать некоторое ненулевое рассеяние для флуорофора, иначе такой расчет теряет всякий смысл. Следует отметить, что подобный вариант еще никем не был обоснован, и пока представляется проблематичным адаптировать под него предложенный

метод мезоскопической ФМТ. Тем не менее для проверки гипотезы о вероятном повышении глубинной чувствительности были проведены три расчета с использованием модифицированной программы TurbidMC для представленных выше трех модельных рассеивающих сред. Критерием сравнения чувствительности для разных расчетов была выбрана глубина „проникновения“ функции чувствительности внутрь объекта.

На рис. 8 представлены три функции чувствительности (точнее их эффективные 2D-сечения плоскостью, проходящей через центры источника и детектора), рассчитанные по модернизированной программе. Расстояние между источником и детектором равно 5 mm, глубина объекта (высота изображений рисунка) равна 9 mm. На рис. 8,а представлен результат расчета с использованием априорной информации о глубинах залегания структур. Точно также считалось при проведении эксперимента. В отличие от рис. 4 на рис. 8,а проявляются сами структуры — они отчетливо видны на глубине 3 mm и чуть заметны на глубине 5 mm. Это означает, что действительно удалось улучшить статистическую точность вычислений за счет введения в программу фиктивного процесса δ -рассеяния. При этом глубина проникновения функции чувствительности внутрь объекта может быть оценена как ~ 6 mm. На рис. 8,б показан результат расчета для объекта без флуорофора. К сожалению, глубина проникновения составила ~ 4 mm. Поэтому такой способ расчета не может стать альтернативным варианту рис. 8,а. На рис. 8,с представлены результаты расчета для объекта, представляющего собой флуорофор с коэффициентом рассеяния в два раза меньшим, чем коэффициент рассеяния объектов в двух предыдущих расчетах. Для глубины проникновения получен наилучший результат ~ 7 mm. Таким образом, несмотря на то, что условия последнего из расчетов несколько искусственны и на данный момент не вполне обоснованы, имеет смысл подумать о возможности адап-

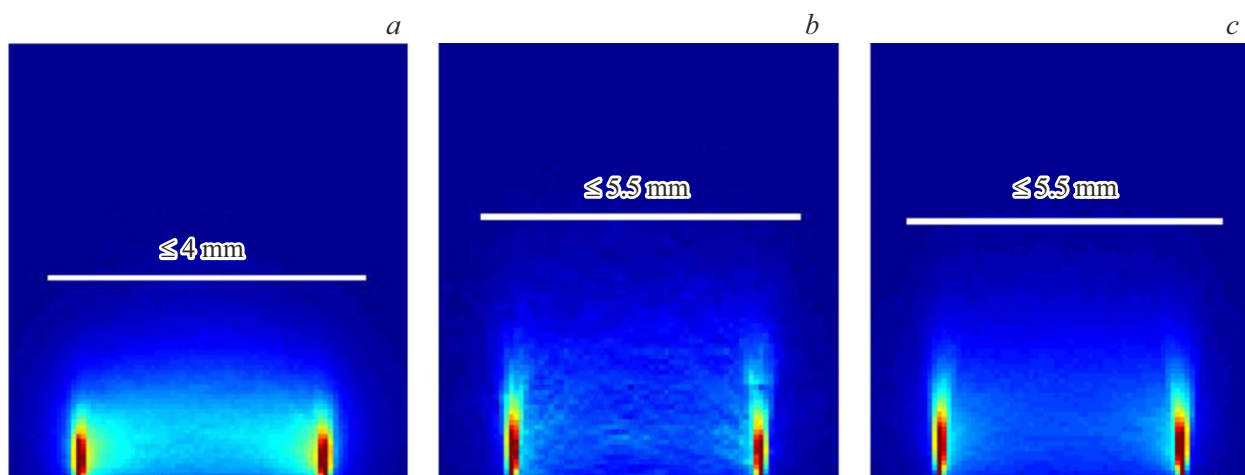


Рис. 9. Результаты расчетов функций чувствительности: объект без просветления (*a*), просветлен поверхностный слой толщиной 1 mm (*b*), просветлен весь объект (*c*).

тации метода мезоскопической ФМТ именно к такому расчету функции чувствительности.

Еще один вероятный путь повышения глубинной чувствительности — использовать оптическое просветление поверхностного слоя объекта. Для оценки влияния оптического просветления на глубинную чувствительность использовалась простейшая модель, согласно которой значение коэффициента рассеяния в слое от поверхности и до глубины 1 mm фантома было уменьшено в 2 раза. Доказано [30,31], что такая модификация оптических свойств биоткани практически достижима посредством использования просветляющих агентов. При этом время действия агента исчисляется десятками минут. Таким образом, были проведены еще два расчета функций чувствительности по модернизированной программе TurbidMC. Все расчеты выполнены для рассеивающего объекта без флуорофора. На рис. 9, *a* для удобства визуального сравнения повторена визуализация изображения рис. 8, *b*. На рис. 9, *b* показан результат расчета для объекта с просветленным поверхностным слоем глубиной 1 mm. Наконец, на рис. 9, *c* представлен результат расчета для полностью просветленного объекта (практически нереализуемый случай, специально введенный в рассмотрение для сравнительного анализа результатов). В двух последних расчетах были получены очень близкие функции чувствительности, глубина проникновения в объект составила ~ 5.5 mm в обоих случаях. Это очень интересный результат, который можно объяснить тем, что именно в поверхностном слое происходит перераспределение фотонов, несущих информацию об объекте [32], и который тем не менее требует подтверждения на эксперименте по реконструкции фантома с флуороформ. Конечно, только эксперимент даст ответ на вопрос — будут ли воспроизводиться структуры на глубине хотя бы 7 mm при условии оптического просветления поверхностного слоя. Но поскольку глубина 5.5 mm однозначно больше, чем 4 mm (рис. 9, *a,b*), то

уже сейчас можно смело утверждать, что оптическое просветление — надежный путь повышения глубинной чувствительности метода ФМТ.

Заключение

В настоящей работе выполнен эксперимент по реконструкции методом мезоскопической ФМТ фантома с флуороформом, образующим периодические пространственные структуры на различных глубинах. Представлены и обсуждены результаты эксперимента, а также результаты численного эксперимента для геометрии высокой плотности расположения источников и приемников. Показано, что использование геометрии высокой плотности является надежным методом повышения точности реконструкции. В этом случае удастся надежно разрешать структуры диаметром 0.55 mm на глубинах до 5 mm включительно. Таким образом, в последующих физических экспериментах целесообразно использовать только такую геометрию. Также в работе обсуждены пути повышения глубинной чувствительности метода мезоскопической ФМТ. Один путь — подбор оптимальных условий для расчета функций чувствительности. На настоящий момент этот путь только обозначен и требует проведения дополнительных исследований. Другой путь — оптическое просветление поверхностного слоя рассеивающего объекта. В настоящей работе этот путь обоснован расчетами функций чувствительности для объекта без флуорофора. Разумеется, следующий шаг — верификация такого пути экспериментом по реконструкции фантома с флуороформом, что является целью ближайших исследований. Также необходим дальнейший поиск путей повышения статистической точности расчетов функций чувствительности, что очень важно для получения качественных реконструкций флуоресцентных изображений.

Финансирование работы

Работа проводилась при поддержке Министерства высшего образования и науки Российской Федерации, грант № 13.2251.21.0009 (Соглашение № 075-15-2021-942). Работа А.П. Савицкого выполнялась в рамках государственного задания ФИЦ биотехнологии РАН.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] C. Darne, Y. Lu, E.M. Seveck-Muraca. *Phys. Med. Biol.*, **59** (1), R1 (2014). DOI: 10.1088/0031-9155/59/1/R1
- [2] Y. An, K. Wang, J. Tian. *Visual Comput. Industry Biomed. Art.*, **1**, 1(2018). DOI: 10.1186/s42492-018-0001-6
- [3] A. Dunn, D. Boas. *Opt. Lett.*, **25** (24), 1777 (2000). DOI: 10.1364/OL.25.001777
- [4] E.M.C. Hillman, D.A. Boas, A.M. Dale, A.K. Dunn. *Opt. Lett.*, **29**(14), 1650 (2004). DOI: 10.1364/OL.29.001650
- [5] F. Yang, M.S. Ozturk, L. Zhao, W. Cong, G. Wang, X. Intes. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **62**(1), **248** (2015). DOI: 10.1109/TBME.2014.2347284
- [6] S. Gao, M. Li, J.T. Smith, X. Intes. *Biomed. Opt. Express.*, **13**(9), 4637 (2022). DOI: 10.1364/BOE.460216
- [7] A.B. Kononov, V.V. Vlasov. *Proc. SPIE*, **11457**, 1145703 (2020). DOI: 10.1117/12.2560139
- [8] A.B. Kononov, V.V. Vlasov, A.S. Uglov. *Int. J. Numer. Meth. Biomed. Eng.*, **37**(1), e3408 (2021). DOI: 10.1002/cnm.3408
- [9] A.B. Kononov, V.V. Vlasov, S.I. Samarin, I.D. Soloviev, A.P. Savitsky, V.V. Tuchin. *J. Biomed. Opt.*, **27**(12), 126001 (2022). DOI: 10.1117/1.JBO.27.12.126001
- [10] С.И. Самарин, А.Б. Коновалов, В.В. Власов, И.Д. Соловьев, А.П. Савицкий, В.В. Тучин. *Компьютерная оптика*, **47**(5), 673 (2023). DOI: 10.18287/2412-6179-СО-1295
- [11] А.Б. Коновалов, В.В. Власов, С.И. Самарин, А.С. Углов, И.Д. Соловьев, А.П. Савицкий, В.В. Тучин. В сб.: *Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT+ME'23* (Гурзуф, 2023). С. 161. DOI: 10.47501/978-5-6044060-3-8.161-169
- [12] T.S. Blacker, Z.F. Mann, J.E. Gale, M. Ziegler, A.J. Bain, G. Szabadkai, M.R. Duchon. *Nat. Commun.*, **5**, 3936 (2014). DOI: 10.1038/ncomms4936
- [13] M. Lukina, A. Orlova, M. Shirmanova, D. Shirokov, A. Pavlikov, A. Neubauer, H. Studier, W. Becker, E. Zagaynova, T. Yoshihara, S. Tobita, V. Shcheslavskiy. *Opt. Lett.*, **42**(4), 731 (2017). DOI: 10.1364/OL.42.000731
- [14] E.A. Shirshin, M.V. Shirmanova, A.V. Gayer, M.M. Lukina, E.E. Nikonova, B.P. Yakimov, G.S. Budylin, V.V. Dudenkova, N.I. Ignatova, D.V. Komarov, V.V. Yakovlev, W. Becker, E.V. Zagaynova, V.I. Shcheslavskiy, M.O. Scully. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **119**(9), e2118241119 (2022). DOI: 10.1073/pnas.2118241119
- [15] V.V. Lyubimov, A.G. Kalintsev, A.B. Kononov, O.V. Lyamtsev, O.V. Kravtsenyuk, A.G. Murzin, O.V. Golubkina, G.B. Mordvinov, L.N. Soms, L.M. Yavorskaya. *Phys. Med. Biol.*, **47**(12), 2109 (2002). DOI: 10.1088/0031-9155/47/12/308
- [16] A.B. Kononov. *Physica Medica*, **124**, 104491 (2024). DOI: 10.1016/j.cjmp.2024.104491
- [17] R. Gordon, R. Bender, G.T. Herman. *J. Theor. Biol.*, **29**(3), 471 (1970). DOI: 10.1016/0022-5193(70)90109-8
- [18] A. Beck, M. Teboulle. *SIAM J. Imaging Sci.*, **2**(1), 183 (2009). DOI: 10.1137/080716542
- [19] J.L. Lagarto, C. Gredi, F. Villa, S. Tisa, F. Zappa, V. Shcheslavskiy, F.S. Pavone, R. Cicchi. *Sensors*, **19**, 2678 (2019). DOI: 10.3390/s19122678
- [20] S.A. Prah, M.J.C. van Gemet, A.J. Welch. *Appl. Opt.*, **32**(4), 559 (1993). DOI: 10.1364/AO.32.000559
- [21] *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer*. Ed. by V.V. Tuchin, J. Popp, V. Zakharov (Springer, Cham, 2020). DOI: 10.1007/978-3-030-44594-2
- [22] The fluorescent protein TagRFP [Электронный ресурс]. URL: <https://www.fpbase.org/protein/tagrpf>
- [23] S.J. Orfanidis. *Introduction to Signal Processing* (Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1996).
- [24] D.S.C. Biggs, M. Andrews. *Appl. Opt.*, **36**(8), 1766 (1997). DOI: 10.1363/AO.36.001766
- [25] Z. Wang, A.C. Bovik, H.R. Sheikh, E.P. Simoncelli. *IEEE Trans. Image Process.*, **13**(4), 600 (2004). DOI: 10.1109/TIP.2003.819861
- [26] B. Moulden, F.A.A. Kingdom, L. Gatley. *Perception*, **19**(1), 79 (1990). DOI: 10.1068/p190079
- [27] A.R. Gardner, C.K. Hayakawa, V. Venugopalan. *J. Biomed. Opt.*, **19**(6), 065003 (2014). DOI: 10.1117/1.JBO.19.6.065003
- [28] J. Chen, V. Venugopal, X. Intes. *Biomed. Opt. Express.*, **2**(4), 871 (2011). DOI: 10.1364/BOE.2.000871
- [29] X. Jiang, Y. Deng, Z. Luo, K. Wang, L. Lian, X. Yang, I. Meglinski, Q. Luo. *Opt. Express*, **22**(26), 31948 (2014). DOI: 10.1364/OE.22.031948
- [30] *Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging*. Ed. by V.V. Tuchin, D. Zhu, E.A. Genina (Ration Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, Boca, 2022). DOI: 10.1201/9781003025252
- [31] D.K. Tuchina, I.G. Meerovich, O.A. Sindeeva, V.V. Zherdeva, A.P. Savitsky, A.A. Bogdanov Jr, V.V. Tuchin. *J. Biophotonics*, **13**(11), e201960249 (2020). DOI: 10.1002/jbio.201960249
- [32] X. Yang, T. Jiang, L. Liu, X. Zhao, X. Yu, M. Yang, G. Liu, Q. Luo. *J. Innov. Opt. Health Sci.*, **16**(1), 2330002 (2023). DOI: 10.1142/S1793545823300021