

# بهبود توان تفکیک تصاویر چندبینایی توموگرافی فلورسنت مولکولی با استفاده از الگوریتم unmixing خطی

پروین میرزا قوامی<sup>۱</sup>  
مرجانة حجازی<sup>۲</sup> و<sup>۳</sup>  
بهادر مکی آبادی<sup>۳</sup>  
محسن ابراهیمی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> دانشیار، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
<sup>۳</sup> استادیار، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
<sup>۴</sup> کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در پزشکی، بیمارستان امام خمینی (ره)، تهران، ایران

## خلاصه

**مقدمه:** یکی از انواع تصویربرداری‌های مولکولی، روش برش‌نگاری فلورسنت مولکولی است که در آن، نمونه در زوایای مختلف تحت تابش پرتوی لیزر قرار می‌گیرد و پس از تحریک، مبادرت به تابش پرتوی فلورسنت می‌نماید. در این شیوه تصویربرداری نوری مکان تجمع ماده فلورسنت در بافت با توجه به شدت فلورسنت رسیده به سطح نمونه تعیین می‌شود. بررسی چندین فرآیند زیستی نیازی ضروری در کاربردهای پزشکی و بیولوژیکی است. برای انجام این قبیل بررسی‌ها برای نشاندار کردن اجزای مورد نظر از مواد فلورسنت مختلف استفاده می‌شود و تصویربرداری به‌روش چندبینایی انجام می‌شود. اما، به دلیل هم‌پوشانی بیناب تابشی مواد فلورسنت، تفکیک اجزای نشاندار شده از هم میسر نیست. برای ایجاد بهبود در تفکیک اجزا از الگوریتم‌های ریاضی موسوم به unmixing خطی استفاده می‌شود. بنابراین هدف این مقاله پیاده‌سازی یک الگوریتم unmixing مبتنی بر روش فاکتورگیری ماتریسی غیرمنفی (NMF) در تصاویر برش‌نگاری فلورسنت است.

**روش بررسی:** این مطالعه به‌طور مجزا در دو بخش شبیه‌سازی و آزمایشگاهی اجرا شد. در هر دو بخش، شدت فلورسنت رسیده به سطح نمونه حاوی دو ماده فلورسنت مختلف در پروجکشن‌های متعدد در چند طول موج به‌دست آمد سپس الگوریتم unmixing بر روی تصاویر پروجکشن اعمال شد. برای تعیین صحت عملکرد الگوریتم، تصاویر پروجکشن از هر یک از دو ماده فلورسنت ایجاد شد و به‌عنوان داده مرجع برای مقایسه با تصاویر حاصل از اعمال الگوریتم در نظر گرفته شد. ارزیابی کمی با محاسبه ضریب همبستگی و جذر میانگین مربع اختلاف (RMSE) انجام شد سپس داده‌های حاصل اعمال الگوریتم مورد بازسازی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** نتایج به‌دست‌آمده نشان دادند تصاویر حاصل از اعمال الگوریتم با تصاویر مرجع مربوطه بیش از ۹۷ درصد همبستگی داشتند. بین جذر میانگین مربع اختلاف تصاویر حاصل از اعمال الگوریتم با تصاویر مرجع مرتبط و غیرمرتبط تفاوت معنی‌دار مشاهده شد ( $P.value < 0.001$ ) که نشان‌دهنده صحت عملکرد الگوریتم بود.

**بحث و نتیجه‌گیری:** در این مقاله الگوریتم unmixing مبتنی بر روش NMF برای جداسازی سهم نسبی دو فلوروفور در تصاویر پروجکشن نوشته شد. صحت این الگوریتم با آزمون همبستگی و  $t\_test$  بررسی و تأیید شد. نتایج بازسازی با استفاده از داده‌های حاصل از الگوریتم نشان می‌دهد با این روش می‌توان توزیع هریک از فلوروفورها را به‌طور جداگانه به‌دست آورد.

**واژه‌های کلیدی:** unmixing خطی، روش فاکتورگیری ماتریسی غیرمنفی، تصویربرداری چندبینایی، روش برش‌نگاری فلورسنت

نویسنده مسئول: مرجانه حجازی، تلفن: ۰۹۱۲۴۸۴۱۳۳۹  
پست الکترونیک: mhjazi@sina.tums.ac.ir

## مقدمه

تصویربرداری از گره‌های لنفوی در حین جراحی، تشخیص بیماری‌های پوستی، بررسی عملکرد داخلی ارگان‌هایی مانند بافت پستان و مغز و شناخت توالی ژنی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱].

برش‌نگاری فلورسنت مولکولی به‌عنوان یک روش غیر تهاجمی برای مشاهده فرآیندها در اندازه سلولی و زیرسلولی به‌کار می‌رود. این روش به‌طور گسترده‌ای در تصویربرداری از حیوانات کوچک،

در برش‌نگاری فلورسنت مولکولی (FMT)، بافت توسط نانوذرات فلورسنت نشاندار می‌شود. سپس نمونه تحت آزمایش توسط لیزر درخشان می‌شود، فلورسنت تحریک و شروع به تابش می‌کند. شدت پرتوی فلورسنت رسیده به سطح بافت با چرخش ۳۶۰ درجه آشکارساز حول محور مرکزی نمونه ثبت می‌گردد. با استفاده از این روش تصویربرداری می‌توان اطلاعاتی در مورد نحوه توزیع مواد فلورسنت در نمونه به دست آورد. البته نتایج بازسازی در این تصویربرداری به دلیل میزان بالای پراکندگی نور در بافت و محیط‌های دارای توان تفکیک مکانی محدود است [۳ و ۲]. اما در بسیاری از کاربردهای بیولوژیکی و پزشکی لازم است چندین هدف به‌طور همزمان بررسی شوند که به‌عنوان نمونه می‌توان به مطالعه ایمونولوژیکی جمعیت‌های مختلف سلول‌های T و انتقال ژن به بافت معیوب در درمان سرطان اشاره کرد [۴ و ۵]. در این موارد چندین ماده فلورسنت به‌طور همزمان جهت نشاندار کردن بافت و رده‌های سلولی به‌کار می‌روند و تصویربرداری به‌روش چندبینایی انجام می‌شود تا مشاهده جزئیات با جداسازی سیگنال تابشی فلوروفور مورد نظر با استفاده از فیلترهای مناسب میسر گردد [۶]. اما به‌دلیل هم‌پوشانی بیناب تابشی مواد فلورسنت، تفکیک اجزای نشان‌دار شده تنها با استفاده فیلترهای تداخلی از هم میسر نیست. روش معمول برای تفکیک فلوروفورها در میکروسکوپ فلورسانس الگوریتم *unmixing* خطی براساس اطلاعات طیفی است [۷ و ۸]. در این روش شدت ثبت‌شده در هر پیکسل به‌صورت ترکیب خطی بیناب تابشی مواد فلورسنت موجود در نمونه در نظر گرفته می‌شود سپس سهم هر ماده فلورسنت با معکوس‌سازی ماتریس بینایی به‌دست می‌آید. در سال ۲۰۰۹، خانم *Simatiraki* و همکاران از این روش *unmixing* خطی برای جداسازی فلوروفورها در تصویربرداری توموگرافی فلورسنت با مد عبوری استفاده کردند [۹] اما روش‌های تصویربرداری فلورسنت 3D با اعمال روش *unmixing* با استفاده از طیف‌های فلورسنت به نتایج صحیحی منجر نمی‌شود زیرا به‌دلیل وابستگی ضریب جذب محیط به طول موج، طیف هر یک از مواد فلورسنت تضعیفی متفاوت از دیگر فلورسنت‌ها متحمل خواهد شد که این تفاوت در میزان تضعیف به طول موج تابشی فلورسنت و میزان هم‌پوشانی طیف تابشی آن ماده با طیف جذبی محیط انتشار برمی‌گردد [۹].

همچنین در تصویربرداری‌های *in vivo* استفاده روش جداسازی براساس اطلاعات طیفی مرجع با خطا مواجه است زیرا شکل طیفی مواد فلورسنت تحت تأثیر خصوصیات شیمیایی محیط تغییر می‌کند [۱۰]. برای رفع این مشکل در سال ۲۰۱۱،

زاخاراکیس و همکاران با استفاده از یک اسپکترومتر، بیناب تابشی مواد فلورسنت را همزمان با انجام تصویربرداری ثبت کردند و با استفاده از بیناب‌های تابشی ثبت‌شده از مواد فلورسنت در داخل نمونه، روش *unmixing* در تصویربرداری فلورسنت توموگرافی را در مد بازتابشی برای جداسازی توزیع دو فلوروفور متفاوت واقع در عمق ۳ میلی‌متر به‌کار بردند [۱۱]. عدم مزیت این روش را می‌توان در نیاز به امکانات سخت‌افزاری بیشتر دانست. از این‌رو استفاده از روش‌های جداسازی منابع کور در تصویربرداری‌های فلورسنت مطرح می‌شود. روش‌های مختلفی برای حل مسئله *unmixing* مبتنی بر جداسازی منابع کور وجود دارد که در هر یک از آن‌ها قیده‌های خاصی برای تخمین اجزا در نظر گرفته می‌شود و به‌عنوان مثال‌هایی از این قیدها می‌توان به مستقل بودن، تعامد، تنک بودن و غیرمنفی بودن اشاره کرد که از میان آن‌ها غیرمنفی بودن از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا داده‌های فیزیکی در صورت مثبت بودن دارای مفهوم هستند. روش فاکتورگیری ماتریس (NMF) یکی از روش‌های جداسازی منابع کور است که در آن قید غیرمنفی بودن در نظر گرفته می‌شود. روش فاکتورگیری ماتریسی (NMF) برای جداسازی سیگنال‌های فلورسنت در تصاویر میکروسکوپی فلورسانس به‌کار برده شده است [۱۰ و ۱۲]. در این زمینه در سال ۲۰۱۰، خانم *Montcuquet* و همکاران در تصویربرداری در مد بازتابشی برای جداسازی بیناب‌ها و حذف تابش اتوفلورسانس از الگوریتم (NMF) به‌عنوان یک روش جداسازی منابع کور استفاده کردند [۱۳]. در سال ۲۰۱۳، آقای پو و همکاران از روش تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) به‌عنوان یکی از روش‌های مبتنی بر جداسازی منابع کور برای تفکیک دو غلظت مختلف ICG در تصاویر توموگرافی فلورسنت استفاده کردند. در این روش ابتدا بازسازی تصاویر در طول موج‌های مختلف انجام شد سپس با اعمال PCA بر روی تصاویر بازسازی‌شده توزیع مربوط به هر یک از غلظت‌ها به‌صورت جداگانه به‌دست آمد [۱۴]. در این روش به‌دلیل انجام شدن بازسازی در طول موج‌های مختلف حجم محاسبات بسیار بالاست. فرض اساسی در این روش تعامد و غیر همبسته بودن سیگنال‌ها می‌باشد. درحالی‌که فرض اساسی در روش (NMF) غیرمنفی بودن مقادیر می‌باشد که مطابقت بیشتری با شرایط واقعی دارد. مطالعات نشان می‌دهد انجام *unmixing* به‌روش فاکتورگیری ماتریسی غیرمنفی تاکنون در تصویربرداری برش‌نگاری فلورسنت ملکولی چندبینایی برای جداسازی توزیع فلوروفورهای مختلف به‌کار نرفته است. هدف ما در این مطالعه تفکیک توزیع ۳ بعدی دو فلوروفور مختلف با اعمال روش (NMF)

برروی تصاویر پروجکشن چندبیمایی است.

### روش بررسی

این مطالعه به طور مجزا در دو بخش شبیه سازی و آزمایشگاهی اجرا گردید. در هر دو بخش، شدت فلورسنت رسیده به سطح نمونه حاوی دو ماده فلورسنت مختلف در پروجکشن های متعدد در گستره های طول موجی مختلف به دست آمد و سپس تصاویر چندبیمایی به دست آمده به عنوان ورودی الگوریتم مذکور قرار گرفتند.

### روش شبیه سازی

برای شبیه سازی تصاویر پروجکشن باید شدت رسیده به سطح محاسبه شود که انجام این محاسبه با حل مدل فوروارد محقق می شود. در تصویربرداری فلورسنت، مدل فوروارد شامل حل دو معادله مشتق جزئی است که یک معادله چگونگی انتشار پرتوی لیزر در طول موج تحریک  $\lambda_{exc}$  و معادله دیگر چگونگی انتشار پرتو از هر پروب فلورسنت در طول موج تابش  $\lambda_m$  را توصیف می نماید [۱۵].

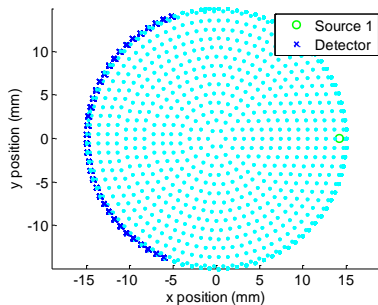
$$\nabla \cdot D_x(r) \nabla \Phi_x(r) - \mu_{ax}(r) \Phi_x(r) = -Q_0(r) \quad (1)$$

$$\nabla \cdot D_m(r) \nabla \Phi_m(r) - \mu_{am}(r) \Phi_m(r) = -\Phi_x(r) \eta \mu_{af}(r) \quad (2)$$

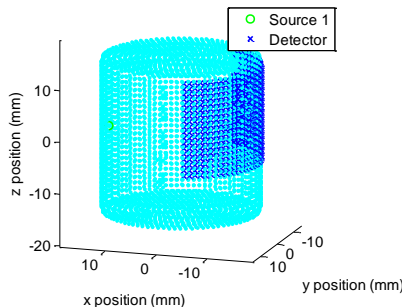
این دو معادله از طریق  $\Phi_x(r) \eta \mu_{af}(r)$  که تبدیل پرتوی لیزر به پرتوی فلورسنت را نشان می دهد، بهم کوپل شده اند. در معادلات فوق  $D_{x,m}$  ضریب دیفیوژن،  $\mu_{x,m}$  ضریب جذب محیط،  $\eta$  بازده کوانتومی،  $\mu_{af}$  ضریب جذب فلورسانس و  $\Phi_{x,m}$  شدت پرتوی رسیده به سطح در طول موج تحریکی و تابشی می باشد. در حل دو معادله شرط مرزی را بین در نظر گرفته می شود [۱۵].

برای انجام مدل فوروارد ابتدا فانتوم با ایجاد یک مش استوانه ای مدل سازی شد. مش مورد نظر به صورت استوانه ای و با تعیین شعاع (R) ۱۵ میلی متر و ارتفاع (h) ۴۰ میلی متر و تعیین فواصل بین گره ها ۱/۰۵ میلی متر ایجاد شد. برای مدل سازی مواد فلورسنت، دو ناحیه با خصوصیات اپتیکی متفاوت از زمینه در داخل مش در نظر گرفته شد. این نواحی به صورت کره هایی با شعاع ۲ میلی متر ایجاد شدند. تعیین ویژگی اپتیکی این نواحی باتوجه به دو ماده فلورسنت alexa 635 و alexa 680 انجام شد. شبیه سازی تصاویر پروجکشن چندبیمایی مستلزم اجرای مدل فوروارد در طول موج های مختلف است. از این رو تمام پارامترهای

اپتیکی به کاررفته در معادلات باید در طول موج های مورد نظر به دست آورده شود. مقادیر ضرایب جذب و پراکندگی کاهش یافته در طول موج تحریک و طول موج های تابشی مورد نظر برای مدل استوانه ای باتوجه به نتایج به دست آمده از تحقیقات سرای و همکاران در زمینه اندازه گیری کلینیکی ضرایب جذب و پراکندگی بافت تعیین گردید [۱۶]. مواد فلورسنت با غلظت  $1 \mu M$  و طول موج لیزر ۶۰۰ نانومتر در نظر گرفته شدند. به این ترتیب مقدار ضریب خاموشی  $\epsilon$  فلوروفورها باتوجه به منحنی ضریب خاموشی فلوروفور و طول موج لیزر تعیین گردید. ضریب جذب فلورسانس هر یک از فلوروفورها از رابطه  $C(r) = 2.303 \epsilon(C(r), \lambda_e) \mu(C(r), \lambda_e)_{af}$  به دست آمد. بازده کوانتومی نیز در طول موج های تابشی ۶۷۰ نانومتر و ۷۱۰ نانومتر برای هر یک از فلوروفورها با توجه طیفی آنها به دست آمد. سامانه تصویربرداری به کاررفته در این مطالعه قابلیت چرخش حول نمونه را دارد و منبع لیزر می تواند نمونه را در زوایای مختلف تحت تابش قرار دهد. به همین دلیل در مدل سازی مکان منبع لیزر در ۱۲ موقعیت با فواصل زاویه ای ۳۰ درجه در نظر گرفته شد. باتوجه به اینکه در سامانه تصویربرداری دوربین همواره مقابل لیزر قرار گرفته است، آرایه ای از آشکارسازها در یک میدان دید ۱۴۰ درجه ای در مقابل هر منبع لیزر ایجاد شد. موقعیت نسبی لیزر و آشکارسازها در یکی از زوایا در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱: نمای ۲د بعدی از موقعیت نسبی لیزر و آشکارساز در یک پروجکشن

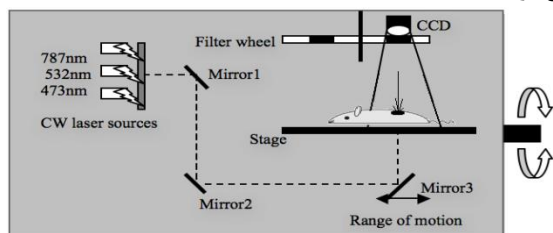


شکل ۲: نمای ۳ بعدی از موقعیت نسبی لیزر و آشکارساز در یک پروجکشن

در مرحله هر تکرار الگوریتم، مسئله حداقل مربعات برای به دست آوردن یکی از ماتریس‌ها (S یا A) با ثابت نگه داشتن ماتریس دیگر حل می‌شود. الگوریتم‌های NMF مبتنی بر دو روش ALS و Multiplicative Update در محیط MATLAB نوشته و اجرا شدند. پس از اجرای الگوریتم، برای به دست آوردن توزیع ۳ بُعدی هر کدام از مواد فلورسنت، تصاویر پروجکشن unmixed مربوط به ماده مورد نظر باید به صورت ورودی برنامه بازسازی نرم افزار NIRFAST تبدیل شود. برای انجام این تبدیل برنامه‌ای در محیط MATLAB نوشته شد. بازسازی از طریق یک پروسه تکرارشونده اجرا می‌شود که در هر تکرار در ضمن تغییر ویژگی اپتیکی هر وکسل، مدل فلورسنت محاسبه شده ( $\Phi^C$ ) و با داده‌های اندازه‌گیری شده ( $\Phi^M$ ) که همان داده‌های ورودی برنامه هستند، مقایسه می‌شود. بهینه کردن مقادیر ویژگی اپتیکی با به حداقل رساندن اختلاف بین مدل فلورسنت به دست آمده و داده‌های اصلی انجام می‌شود.

### روش آزمایشگاهی

در این قسمت ابتدا فانтом معادل بافت ساخته شد [۱۹]. در این فانтом دو ماده فلورسنت در فاصله ۱۴ میلی‌متر از هم قرار داده شد و سپس در داخل نگهدارنده مورد نظر قرار گرفت سپس دو لوله موئین حاوی فلورسین و رد امین در فاصله ۱۴ میلی‌متر از هم در داخل فانтом قرار داده شد و تصویربرداری با استفاده از فیلترهای میان‌گذر با پیک عبوری ۵۶۰ نانومتر، ۵۹۰ نانومتر و ۶۵۰ نانومتر در زوایای مختلف پروجکشن با گام‌های ۳۰ درجه انجام گرفت. تصویر شماتیک سامانه تصویربرداری در شکل ۳ مشاهده می‌شود.



شکل ۳: تصویر شماتیک از سیستم تصویربرداری توموگرافی فلورسنت مولکولی

الگوریتم‌های unmixing بر روی تصاویر چندبینایی اعمال شد. این مرحله برای هر زاویه پروجکشن به طور مستقل و جداگانه انجام شد. پس از اجرای الگوریتم‌های جداسازی بر روی تصاویر ثبت شده توسط دوربین CCD، تصویر مربوط به شدت هر ماده فلورسنت به صورت جداگانه به دست می‌آید. برای به دست آوردن

پس از مدل سازی نمونه، سامانه تصویربرداری و ایجاد فایل‌های مربوطه، مدل فلورسنت با حل معادله دیفیوژن توسط برنامه NIRFAST به روش المان محدود اجرا شد و با استفاده داده‌های فلورسنت مربوط به هر موقعیت زاویه‌ای لیزر، تصاویر پروجکشن به دست آمدند.

برای بازسازی توزیع هر پروب فلورسنت به طور تفکیک شده، الگوریتم‌های unmixing بر روی تصاویر پروجکشن چندبینایی اعمال شد. این مرحله برای هر زاویه پروجکشن به طور مستقل انجام شد. برای تبدیل تصاویر پروجکشن چندبینایی به ورودی این الگوریتم‌ها، تصویر پروجکشن به دست آمده در هر طول موج به صورت یک بردار ستونی  $m_{\lambda i}$  درمی‌آید و در یک ستون از ماتریس M قرار می‌گیرد، این ماتریس به عنوان ورودی الگوریتم NMF قرار گرفت. به طور کلی در الگوریتم NMF ماتریس غیرمنفی M در تکرارهای به روز شونده به دو ماتریس غیرمنفی A و S تجزیه می‌شود:

$$M \approx AS \quad (3)$$

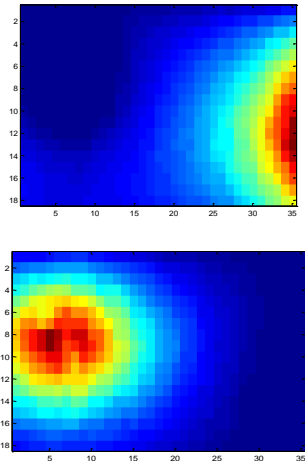
که در معادله فوق، ماتریس پایه A با ابعاد  $r \times m$  و S ماتریس ضرایب ترکیب با ابعاد  $r \times n$  است. در آغاز الگوریتم، مقادیر رندوم برای ماتریس‌های S و A در نظر گرفته می‌شود. مقدار r باتوجه به تعداد فلوروفورها برابر ۲ در نظر گرفته شد. در این الگوریتم برای تخمین دو ماتریس در نظر گرفتن یک معیار شباهت برای سنجش اختلاف بین ماتریس اولیه M و ماتریس تقریبی  $M^*$  که پس از انجام تجزیه از حاصل ضرب ماتریس A و S به دست می‌آید، ضروری است. پرکاربردترین معیار شباهت فاصله اقلیدسی است که برای سنجش دقت از آن استفاده شد. الگوریتم NMF بر اساس روش‌های مختلفی وجود دارد که در این مطالعه از دوروش استفاده شده است.

در روش Multiplicative Update ابتدا هر دو ماتریس (S و A) به ورودی‌های رندوم ایجاد می‌شوند و سپس در هر بار اجرای حلقه تکرار الگوریتم با روابط ضرب شونده ارائه شده توسط لی و سونگ به روزرسانی می‌شوند [۱۷].

در روش NMF مبتنی بر حداقل مربعات متناوب (NMF\_ALS) هر تکرار شامل دو مرحله است که در هر مرحله یک مسئله حداقل مربعات وجود دارد [۱۸].

$$S \leftarrow \arg \min \|M - AS\|_F^2 \quad S \geq 0 \quad (4)$$

$$A \leftarrow \arg \min \|M - AS\|_F^2 \quad A \geq 0$$

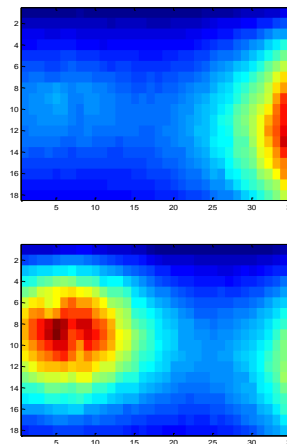


شکل ۵: تصاویر unmixed حاصل از اعمال الگوریتم NMF\_ALS در زاویه صفر درجه

توزیع ۳ بعدی هرکدام از مواد فلورسنت، تصاویر پروجکشن unmixed مربوط به ماده مورد نظر باید به صورت ورودی برنامه بازسازی نرم افزار NIRFAST تبدیل شود. به این منظور ابتدا یک مدل استوانه‌ای مش بندی شده با همان ابعاد نمونه مورد تصویربرداری ایجاد شد. از آنجایی که CCD مجموعه‌ای از فوتودتکتورها است، موقعیت‌های مشخصی روی سطح CCD به عنوان مکان آشکارسازها انتخاب شدند و با توجه به تصویر پرتوی لیزر در صفحه CCD مکان لیزر در سمت مقابل روی سطح مش در نظر گرفته شد. مقادیر به دست آمده پس از unmixing بر روی صفحه آشکارساز ایجاد شده تصویر گشت. این مراحل برای تمام زوایای تصویربرداری اجرا شد که برای اجرا برنامه‌ای در محیط MATLAB نوشته شد. در پایان، تصاویر جداسازی شده با استفاده از برنامه NIRFAST مورد بازسازی قرار گرفتند.

### یافته‌ها

مدل فوروارد برای اندازه‌گیری شار فوتونی رسیده به سطح در طول موج‌های مورد نظر انجام شد و سپس داده‌های به دست آمده با توجه به ابعاد صفحه آشکارساز تعریف شده روی سطح مش به تصاویر پروجکشن تبدیل شدند. در شکل ۴ تصاویر پروجکشن در ۲ طول موج ذکر شده در زاویه صفر درجه نشان داده شده است:



شکل ۴: تصاویر پروجکشن شبیه‌سازی شده در زاویه صفر درجه در طول موج ۶۷۰ و ۷۱۰ نانومتر

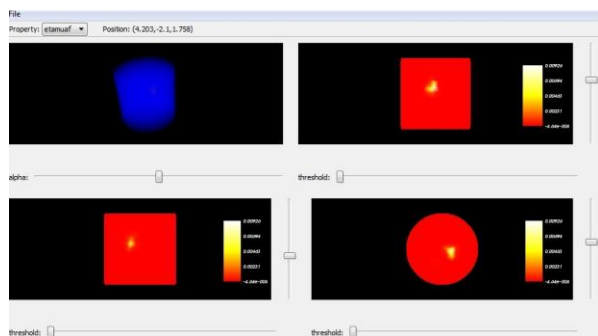
پس از شبیه‌سازی تصاویر چندبیمایی، الگوریتم‌های جداسازی ذکر شده بر روی آن‌ها اعمال شد. برای بررسی صحت عملکرد الگوریتم‌ها ابتدا تصاویر پروجکشن در حالتی که فقط یکی از منابع فلورسنت در داخل مش واقع است، شبیه‌سازی شد. به عنوان داده مرجع برای مقایسه با تصاویر حاصل از اعمال الگوریتم در نظر گرفته شد. به این ترتیب با در اختیار داشتن تصویر هریک از منابع فلورسنت به صورت جداگانه، معیاری برای انجام بررسی به دست آمد. بررسی عملکرد هر الگوریتم برای هر منبع فلورسنت با مقایسه تصویر اصلی آن و تصاویر حاصل از اعمال آن الگوریتم انجام شد. برای هریک از منابع، بررسی با محاسبه جذر میانگین مربع اختلاف، نسبت بیشینه سیگنال به نویز و ضریب همبستگی بین تصویر اصلی و تصویر حاصل از الگوریتم جداسازی مرتبط به آن منبع  $(R_1, PSNR_1, RMSE_1)$  و مقایسه با همین پارامترها بین تصویر اصلی و تصویر غیرمرتبط حاصل از الگوریتم جداسازی  $(R_2, PSNR_2, RMSE_2)$  انجام شد. برای انجام ارزیابی، هر الگوریتم ۸ بار اجرا شد و به دلیل قابل اغماض بودن مقادیر انحراف معیار، فقط مقادیر میانگین مربوط به زاویه صفر درجه در جداول زیر آورده شده است.

جدول ۱: نتایج مقایسه کمی الگوریتم‌ها در جداسازی منبع فلورسنت

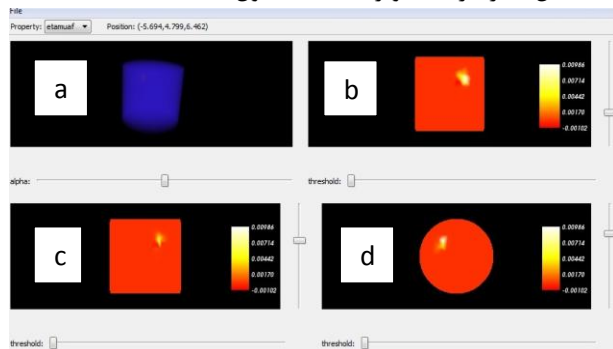
اول در زاویه صفر درجه

الگوریتم	$RMSE_1$	$RMSE_2$	$PSNR_1$	$PSNR_2$	$R_1$	$R_2$
NMF(Multiplicative)	۰/۰۸۹	۰/۲۱۰	۶۹/۰۹	۶۱/۶۷	۰/۸۷	۰/۲۵
NMF_ALS	۰/۰۵۳	۰/۲۹۱	۷۳/۶۰	۵۸/۵۳	۰/۹۸	۰/۰۵

تصاویر حاصل از اعمال الگوریتم جداسازی در این زاویه در شکل ۵ نشان داده شده است:

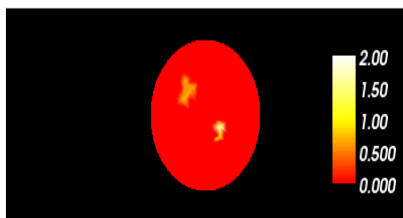


شکل ۶: بازسازی تصاویر unmixed اول

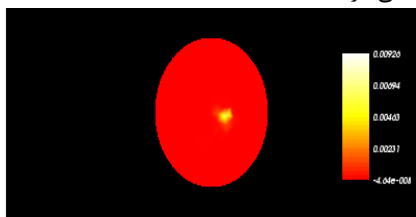


شکل ۷: بازسازی تصاویر unmixed دوم، در قسمت a نتیجه بازسازی به صورت حجمی و در قسمت های b و c و d به ترتیب سطح مقطع های این حجم در راستای X و Y و Z مشاهده می شود.

مقایسه مکان منابع فلورسنت در مدل استوانه ای و مکان آن ها در نتایج حاصل از بازسازی هریک از داده های unmixed در یک سطح مقطع یکسان دقت بالای روش جداسازی NMF\_ALS را برای تصاویر توموگرافی فلورسنت نشان می دهد.



شکل ۸: سطح مقطعی از مدل استوانه ای شامل دو منبع فلورسنت در  $Z=3/8$  میلی متر



شکل ۹: سطح مقطع تصویر بازسازی شده از داده های unmixed اول در  $Z=3/8$  میلی متر

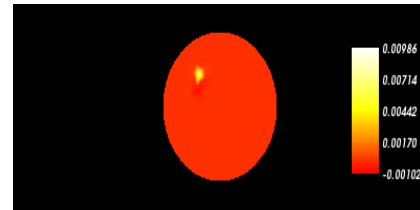
در زاویه صفر درجه با توجه به مقادیر  $R_1$  برای هر ۲ الگوریتم تصویر منبع فلورسنت اول همبستگی بالایی با تصویر اول حاصل از اعمال الگوریتم ها وجود دارد و میزان اختلاف با تصویر اول حاصل از الگوریتم ها (با توجه به مقادیر  $PSNR_1$  و  $RMSE_1$ ) در مقایسه با میزان اختلاف با تصویر دوم حاصل از الگوریتم (با توجه به مقادیر  $PSNR_2$  و  $RMSE_2$ ) به طور معنی داری کمتر است. این مقادیر نشان می دهند منبع فلورسنت اول فقط در تصویر اول حاصل از الگوریتم وجود دارد و جداسازی انجام شده است. با مقایسه این مقادیر در ۲ الگوریتم عملکرد بهتر الگوریتم های NMF\_ALS مشهود است.

جدول ۲: نتایج مقایسه کمی الگوریتم ها در جداسازی منبع فلورسنت دوم در زاویه صفر درجه

الگوریتم	$RMSE_1$	$RMSE_2$	$PSNR_1$	$PSNR_2$	$R_1$	$R_2$
NMF(Multiplicative)	۰/۳۰۷	۰/۲۳۱	۵۸/۳۶	۶۰/۸۳	۰/۱۴	۰/۴۰
NMF_ALS	۰/۴۱۰	۰/۰۲۶	۵۵/۸۵	۷۹/۶۲	۰/۳۰	۰/۹۹

در زاویه صفر درجه با توجه به مقادیر  $R_2$  برای هر ۲ الگوریتم تصویر منبع فلورسنت دوم همبستگی بالایی با تصویر دوم حاصل از اعمال الگوریتم ها وجود دارد و میزان اختلاف با تصویر دوم حاصل از الگوریتم ها (با توجه به مقادیر  $PSNR_2$  و  $RMSE_2$ ) در مقایسه با میزان اختلاف با تصویر اول حاصل از الگوریتم (با توجه به مقادیر  $PSNR_1$  و  $RMSE_1$ ) کمتر است. این مقادیر نشان می دهند منبع فلورسنت دوم فقط در تصویر دوم حاصل از الگوریتم وجود دارد و جداسازی انجام شده است. با مقایسه این مقادیر در ۲ الگوریتم عملکرد بهتر الگوریتم های NMF\_ALS مشهود است. پس از انجام جداسازی بر اساس الگوریتم NMF\_ALS برای تمام زوایای پروجکشن، برنامه بازسازی نرم افزار NIRFAST بر روی هر دودسته تصاویر حاصل از اجرای الگوریتم (تصاویر unmixed اول و تصاویر unmixed دوم) به طور جداگانه اجرا شد. نتایج بازسازی در شکل ۵ و ۶ مشاهده می شود:

به‌عنوان مثال اگر در ماتریس‌های آغازین عناصری با مقادیر صفر وجود داشته باشد، این عناصر تا پایان صفر باقی خواهند ماند و این قفل‌شدگی روی عناصر صفر یکی از دلایل ایجاد مشکل است. در مقایسه با این الگوریتم، الگوریتم مبتنی بر حداقل مربعات متناوب از انعطاف‌پذیری بالاتری برخوردار است که در آن امکان تغییر مسیر در فرآیند تکرار وجود دارد [۱۸]. از دیگر مزیت‌های روش حداقل مربعات متناوب می‌توان به سرعت بالاتر اجرای آن اشاره کرد. لازم‌به‌ذکر است روش تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) که اخیراً برای مورد به‌کار برده شده است [۱۴] را در این مطالعه نیز مورد ارزیابی قرار دادیم، اما با توجه به اینکه در مطالعه ما اعمال الگوریتم‌های جداسازی پیش از انجام بازسازی انجام می‌گرفت، این روش همانند روش‌های (NMF) بر روی تصاویر پروجکشن اجرا شد و به‌طور مشابه مورد ارزیابی قرار گرفت. اما طبق نتایج به‌دست‌آمده با توجه به مقادیر PSNR و ضریب همبستگی با تصاویر مرجع اصلی، روش (NMF\_ALS) در مقایسه با روش (PCA) عملکرد بهتری داشت. به‌طوری‌که میزان ضریب همبستگی بین تصاویر unmixed با تصاویر مرجع مربوطه ۸۸ درصد و ۹۳ درصد به‌دست آمد که در مقایسه با همین پارامترها در روش (NMF\_ALS) کمتر بود (۹۸ درصد و ۹۹ درصد). اختلاف بین  $PSNR_1$  و  $PSNR_2$  در روش (PCA) نیز به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای (در حدود ۱۵ دسی‌بل) نسبت به روش (NMF\_ALS) کمتر بود. از این رو می‌توان الگوریتم مبتنی بر حداقل مربعات متناوب (NMF\_ALS) را روش مناسب‌تری برای جداسازی منابع فلورسنت در تصاویر پروجکشن دانست. نتایج حاصل از بازسازی در مقاله مذکور با نتایج حاصل از بازسازی در این مطالعه به‌طور شهودی قابل مقایسه است. همچنین به‌عنوان یک مزیت این روش می‌توان به این نکته اشاره کرد که با به‌کاربردن الگوریتم جداسازی پیش از انجام بازسازی، نیازی به اجرای بازسازی تصویر که پروسه‌ای زمان‌بر است، در طول موج‌های مختلف نمی‌باشد. نتایج بازسازی با استفاده از داده‌های حاصل از این الگوریتم نشان دادند با انجام بازسازی روی تصاویر جداسازی‌شده حاصل از اعمال این الگوریتم، می‌توان موقعیت و توزیع هر یک از فلوروفورها را به‌طور جداگانه به‌دست آورد.



شک ۲: سطح مقطع تصویر بازسازی‌شده از داده‌های unmixed دوم در  $z=3/8$  میلی‌متر

## بحث و نتیجه‌گیری

در این مقاله الگوریتم‌های unmixing مبتنی بر روش NMF برای جداسازی سهم نسبی دو منبع فلورسنت در تصاویر پروجکشن جهت تفکیک توزیع سه‌بعدی آن‌ها نوشته شد. این روش علی‌رغم ارائه نتایج مطلوب در جداسازی فلوروفورها در تصاویر میکروسکوپی و بازتابی فلورسانس تاکنون در مورد تصاویر توموگرافی فلورسنت به‌کار گرفته نشده است. استفاده از روش‌های جداسازی بینایی در مورد تصاویر توموگرافی، امکان بررسی همزمان چندین هدف را مهیا می‌کند و استفاده از این روش‌ها می‌تواند مشکل توان تفکیک مکانی نامناسب در نتایج حاصل از بازسازی را برطرف نماید. صحت عملکرد هر دو الگوریتم NMF با آزمون همبستگی و  $t$ -test بررسی و تأیید شد. اما با مقایسه دو الگوریتم تصاویر جداسازی‌شده توسط الگوریتم مبتنی بر حداقل مربعات متناوب (NMF\_ALS) همبستگی بیشتری (بیش از ۹۶ درصد در تمام پروجکشن‌ها) با تصاویر مرجع دارند. در حالی که مقدار ضریب همبستگی برای الگوریتم مبتنی بر قوانین به‌روزرسانی ضرب‌شونده بین ۴۰ درصد تا ۸۸ درصد داشتند. همچنین با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده برای پارامترهای  $PSNR_1$  و  $PSNR_2$  و مقادیر P.value استفاده از الگوریتم مبتنی بر حداقل مربعات متناوب به‌طور قابل توجهی به نتایج بهتری در مقایسه با الگوریتم دیگر منجر شده است. این نتیجه می‌تواند به این علت باشد که در الگوریتم مبتنی بر قوانین به‌روزرسانی ضرب‌شونده اگر مقادیر تصادفی که در ابتدا در نظر گرفته شدند به‌طور مناسبی انتخاب نشده باشند، تا پایان تکرارهای الگوریتم، مقادیر ماتریس‌ها در یک مسیر نادرست، که ناشی از انتخاب نادرست مقادیر اولیه است، به‌روزرسانی می‌شوند.

## References

- Paulsen, K.D, Jiang H. Spatially varying optical property reconstruction using a finite element diffusion equation approximation. Medical Physics, 1995; 22: 691.
- Li, M, Zhang Y, Bai J. In vivo diffuse optical tomography and fluorescence

3. molecular tomography. *Journal of Healthcare Engineering*, 2010; 1(3): 477-507.
3. Zavattini G. A hyperspectral fluorescence system for  $\gamma$ D in vivo optical imaging. *Physics in medicine and biology*, 2006; 51(8): 2029.
4. Zacharakis G. Volumetric tomography of fluorescent proteins through small animals in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005; 1029510: 18252-7.
5. Germain R.N. Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise. *Nature Reviews Immunology*, 2006; 6(7): 497-507.
6. Pawley JB, Masters BR. Handbook of biological confocal microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 2008; 13(2): 9902.
7. Zimmermann T, Rietdorf J, Pepperkok R. Spectral imaging and its applications in live cell microscopy. *FEBS letters*, 2003; 546(1): 87-92.
8. Papadakis A. A novel spectral microscope system: application in quantitative pathology. *Biomedical Engineering, IEEE Transactionson*, 2003; 50(2): 207-17.
9. Simantiraki M. Multispectral unmixing of fluorescence molecular tomography data. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2009; 2(4): 353-64.
10. Neher RA. Blind source separation techniques for the decomposition of multiply labeled fluorescence images. *Biophysical journal*, 2009; 96(9): 3791-800.
11. Zacharakis, G. Spectroscopic detection improves multi-color quantification in fluorescence tomography. *Biomedical optics express*, 2011; 2(3): 431-9.
12. Munoz-Barrutia A. Blind spectral unmixing of M-FISH images by non-negative matrix factorization. in *Engineering in Medicine and Biology Society, 2007. EMBS 2007. 29th Annual International Conference of the IEEE. 2007. IEEE.*
13. Montcuquet AS. Nonnegative matrix factorization: a blind spectra separation method for in vivo fluorescent optical imaging. *Journal of biomedical optics*, 2010; 15(5): 056009.
14. Pu H. Separating structures of different fluorophore concentrations by principal component analysis on multispectral excitation-resolved fluorescence tomography images. *Biomedical optics express*, 2013; 4(10): 1829-45.
15. Davis SC. Image-guided diffuse optical fluorescence tomography implemented with Laplacian-type regularization. *Opt. Express*, 2007; 15(7): 4066-82.
16. Cerussi AE. Sources of absorption and scattering contrast for near-infrared optical mammography. *Academic radiology*, 2001; 8(3): 211-8.
17. Seung D, Lee L. Algorithms for non-negative matrix factorization. *Advances in neural information processing systems*, 2001; 13: 556-62.
18. Berry MW. Algorithms and applications for approximate nonnegative matrix factorization. *Computational Statistics & Data Analysis*, 2007; 52(1): 155-73.
19. Hejazi M. Improving the accuracy of a solid spherical source. 2010.