

УДК 577.3:539.24

UDC 577.3:539.24

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
БИОСПЕКЛОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ
МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ В ТКАНЯХ
С РАЗЛИЧНЫМИ БИОФИЗИЧЕСКИМИ
ХАРАКТЕРИСТИКАМИ**

**PROSPECTS FOR THE USE
OF BIOSPEKLES TO ASSESS
MICROCIRCULATION IN THE TISSUES
WITH DIFFERENT BIOPHYSICAL
CHARACTERISTICS**

С. К. Дик,
кандидат физико-математических наук,
Первый проректор БГУИР;

S. Dick,
Candidate of Physics and Mathematics,
First Vice Chancellor BSUIR;

И. И. Хлудеев,
кандидат биологических наук, доцент
кафедры инженерной психологии
и эргономики БГУИР;

I. Khludeev,
Candidate of Biology, Associate
professor of the Department of engineering
psychology and ergonomics BSUIR;

Д. А. Завацкий,
аспирант кафедры электронной
техники и технологии БГУИР;

D. Zavatsky,
Postgraduate Student of the Department of
Electronic Engineering and Technology BSUIR;

Г. Г. Чистякова,
кандидат медицинских наук, доцент
кафедры общей стоматологии БГМУ;

G. Chistyakova,
Candidate of Medicine, Associate professor
of the Department of general dentistry BSMU;

Н. И. Счастливая,
научный сотрудник Института
физиологии НАН Беларуси

N. Schastnaya,
Researcher, Institute of Physiology,
National Academy of Sciences of Belarus.

Поступила в редакцию 21.01.17.

Received on 21.01.17.

В данной работе представлены результаты проведенных экспериментов по определению возможности мониторинга микроциркуляции крови различных тканей человека посредством регистрации и анализа динамической спекл-картины. Приведены результаты анализа гемодинамики, полученные для кожи человека и лабораторной крысы в нормальном и патологическом состояниях. Проведена оценка скорости тока жидкости внутри зубного фантома. Обсуждаются проблемы и перспективы мониторинга микрогемодинамики кожного покрова и пульпы зуба методом анализа контраста лазерных спеклов.

Ключевые слова: спекл-картина, анализ контраста лазерных спеклов, микроциркуляция.

The paper presents the results of experiments conducted to determine the possibility of monitoring microvascular blood flow of different human tissues by recording and analyzing dynamic speckle pattern. The results of the hemodynamic analysis of human skin and laboratory rats in normal and pathological states are represented. The paper also provides an assessment of fluid flow rate within the dental phantom. The problems and prospects of monitoring microvascular blood flow of skin and pulp of the tooth by Laser Speckle Contrast Analysis are discussed.

Keywords: speckle pattern; Laser Speckle Contrast Analysis; microcirculation.

Введение. Важную физиологическую роль в обеспечении процессов оксигенации и обмена веществ в тканях играет микроциркуляция, характер которой определяется преимущественно параметрами кровотока в капиллярах, артериолах и венах [1]. Скорость кожного кровотока меняется под действием различных внешних факторов (термическое воздействие, использование фармакологических препаратов), а также при ряде патологий, например при диабетической микроангиопатии, пост-

травматическом нарушении кровоснабжения, онкологических заболеваниях и др. [2]. Мониторинг состояния микрогемодинамики позволяет оценить степень тяжести патологического состояния и эффективность лечения.

Развитие патологического процесса при болезнях пародонта также сопровождается выраженным нарушением микроциркуляции. При прогрессировании заболевания важными патогенетическими факторами являются повышение посткапиллярного сопро-

тивления, снижение числа функционирующих капилляров, нарушение трофики периодонта [3]. Поскольку микроциркуляторное русло пульпы зуба является центром действия патогенных факторов при развитии воспалительных болезней периодонта, состояние микрососудов может быть индикатором микрогемодинамики до появления клинических симптомов воспаления.

В настоящее время используются различные оптические методы, позволяющие провести оценку состояния биологических тканей с различной пространственной и временной разрешающей способностью на различной глубине. Однако большинство современных оптических методов (дерматоскопия, оптическая топометрия, оптическая когерентная томография) нацелены на анализ морфологических характеристик тканей и основаны на анализе характеристик распространения света в биологических тканях, оптически неоднородных. Поэтому существенную роль играют процессы светорассеяния, которые зависят от таких характеристик, как размеры и форма структурных элементов, их ориентация, оптические постоянные и другие параметры. Для получения полезной информации и интерпретации результатов измерений по светорассеянию необходимо иметь адекватную оптическую модель исследуемой биоткани, точная теория построения которой до настоящего времени не разработана. Все это существенно усложняет техническую реализацию ныне используемых оптических методов, затрудняет их унификацию и повышает стоимость [2; 4; 5]. В связи с этим актуальной является задача разработки методов и технических средств, реализующих возможность проведения экспресс-диагностики и контроля эффективности лечения ряда заболеваний, сопровождающихся системными нарушениями микроциркуляции. Одним из перспективных направлений является развитие методов, основанных на анализе биоспеклов, получаемых при взаимодействии лазерного излучения с тканями живого организма.

В данной работе с помощью сконструированной нами портативной установки проведена оценка возможности использования модифицированного метода анализа контраста лазерных спеклов [6] для измерения параметров микроциркуляции в различных биотканях.

Материалы и методика исследования.

В основе использованного метода лежит ре-

гистрация и анализ спекл-картины, образованной в результате интерференции рассеянного на объекте лазерного излучения. При освещении диффузного тела высококогерентным светом, генерируемым лазером, наблюдается множество ярких хаотически расположенных точек, светлых и темных пятен – спеклов, а полученную картину принято называть спекл-картиной. Она образуется в результате интерференции множества когерентных лучей с различающимися фазами, возникающими, например, вследствие рассеяния на шероховатой поверхности, неровности которой сопоставимы с длиной волны лазера. Так как микроскопическая структура поверхностей объектов сложна и индивидуальна, образуется неровный и сложный волновой фронт, покидающий объект. Поэтому для описания свойств спекл-картины необходимо применять статистические методы, а наиболее важной характеристикой считается плотность распределения интенсивности света I [7]. При рассеянии лазерного пучка в условиях неподвижности компонентов системы «излучатель – рассеиватель – экран» спеклы остаются неизменными в плоскости экрана (статическая картина). В случае смещения рассеивающей поверхности относительно лазерного пучка в поперечном направлении образуется новая спекл-картина. Если смещение невелико по сравнению с диаметром пучка, то корреляция первоначальной спекл-картины и новообразованной будет сохранена (поскольку они сформировались в схожих условиях) и наблюдается лишь частичная декорреляция спеклов. При непрерывном движении шероховатой поверхности спекл-картины сменяются одна за другой, а очертания световых пятен постоянно видоизменяются. Таким образом, рассматриваемая спекл-структура очень чувствительна к изменению положения объекта, на котором происходит рассеивание лазерного излучения: спекл-структура смещается вслед за малейшими движениями объекта (корреляция сохраняется), а при значительных движениях происходит декорреляция и спекл-структура изменяется полностью [8]. Скорость изменения спекл-картины определяется скоростью движения рассеивающего объекта и источника света относительно друг друга.

При исследовании биологических тканей формирование спекл-картины определяется размерами и формой основных структурных элементов, а также их оптическими свой-

ствами. Стационарные компоненты биологических тканей не влияют на динамику спекл-картины, поскольку последняя определяется скоростью изменения положения подвижных компонентов тканей. В роли таких компонентов могут выступать клетки крови и белковые макромолекулы плазмы крови и лимфы [9].

В экспериментах использовали полупроводниковый лазер с длиной волны 660 нм и мощностью 130 мВт, световой пучок которого был расфокусирован и освещал поле площадью около 5 см². Регистрацию осуществляли с помощью специализированной монохромной CCD камеры, управляемой персональным компьютером. Полученные видеофайлы обрабатывали и анализировали посредством компьютерной программы, основанной на модифицированном методе анализа контраста лазерных спеклов. Данный метод впервые был предложен Ферчером [10] в 1980 г. Позднее Брайерс, используя монохромную CCD матрицу и плату АЦП для подключения к компьютеру, реализовал цифровой вариант метода, получивший название Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA) [6]. Созданная нами система обеспечивает захват камерой, управляемой компьютером, цифрового изображения, при анализе которого затем осуществляется расчет значений локального контраста для блока из N×N пикселей. Контраст C в точке с координатами i, j рассчитывается по следующей формуле:

$$C_{i,j} = \frac{\sqrt{\left(\frac{1}{(n+1)^2} \cdot \sum_{x=i-\frac{n}{2}}^{i+\frac{n}{2}} \sum_{y=j-\frac{n}{2}}^{j+\frac{n}{2}} I_{x,y}^2 - \left(\frac{1}{(n+1)^2} \cdot \sum_{x'=i-\frac{n}{2}}^{i+\frac{n}{2}} \sum_{y'=j-\frac{n}{2}}^{j+\frac{n}{2}} I_{x',y'} \right)^2 \right)}{\frac{1}{(n+1)^2} \cdot \sum_{x=i-\frac{n}{2}}^{i+\frac{n}{2}} \sum_{y=j-\frac{n}{2}}^{j+\frac{n}{2}} I_{x,y}}, \quad (1)$$

где $I_{x,y}$ – значение яркости пикселя с координатами x, y;

$n + 1$ – размер окна, для которого осуществляется расчет контраста.

Таким образом, результирующая карта контрастности формируется на основе исходных значений яркости пикселей определенной области. Для получения воспроизводимых и достоверных результатов был проведен поиск оптимальных параметров съемки. Предварительные эксперименты показали, что этим требованиям отвечают частота кадров, равная 120 Гц, и значения выдержки в диапазоне от 1 мс до 50 мс, которые подбираются в зависимости от характеристик исследуемых объектов и условий съемки.

Оценка скорости тока жидкости внутри зубного фантома. Оценка параметров микроциркуляции в зубах представляет собой малоизученную область исследований в стоматологии. Твердая часть зуба состоит из двух основных компонентов – эмали и дентина. Эмаль – сравнительно прозрачная ткань, поэтому оптические свойства зуба (поглощение, рассеяние, цвет) определяются преимущественно дентином. Дентин построен из основного вещества, пронизанного канальцами, которые берут начало в пульпе, около внутренней поверхности дентина, и, веерообразно расходясь, заканчиваются на его наружной поверхности. Внутренний слой стенки дентиновых канальцев содержит минерализованные волокна. Диаметр дентиновых канальцев составляет 1–5 мкм, плотность их распределения колеблется в диапазоне 3–7,5×10⁶ см⁻². Основными рассеивателями света в дентине являются кристаллы гидроксиапатита диаметром 2,0–3,5 нм и длиной до 100 нм. Таким образом, строение зуба представляет собой набор пучков согласованных природных световодов. При падении света на поверхность эмали происходит его рассеяние на неоднородностях и частичный захват оптическими волноводами, роль которых выполняют эмалевые призмы и области дентина между канальцами. Волноводы обеспечивают эффективный транспорт световой энергии от поверхности эмали к пульпе и оптическую связь каждой точки поверхности эмали с вполне определенной точкой полости зуба.

В модельных экспериментах в качестве объекта исследования использовали фантом человеческого зуба. Для его изготовления в удаленном моляре человека делали сквозное тонкое отверстие по направлению от корня к коронке. Через полученный канал протягивали капиллярную трубку, в которой для имитации микроциркуляции в зубе организовывали поток жидкости – разбавленного раствора молочного казеина, мицеллы которого имеют размер от 50 до 300 нм. Фантом располагали на оптической оси между источником и приемником лазерного излучения. Оценивали влияние скорости потока жидкости в фантоме на величину контраста. Для каждой скорости регистрацию проводили при установках выдержки камеры 50 мс и 10 мс.

Проинтегрированные для интересующей области размером 100×100 точек значения карты контрастности спекл-поля для всех типов условий отображены на рисунке 1.

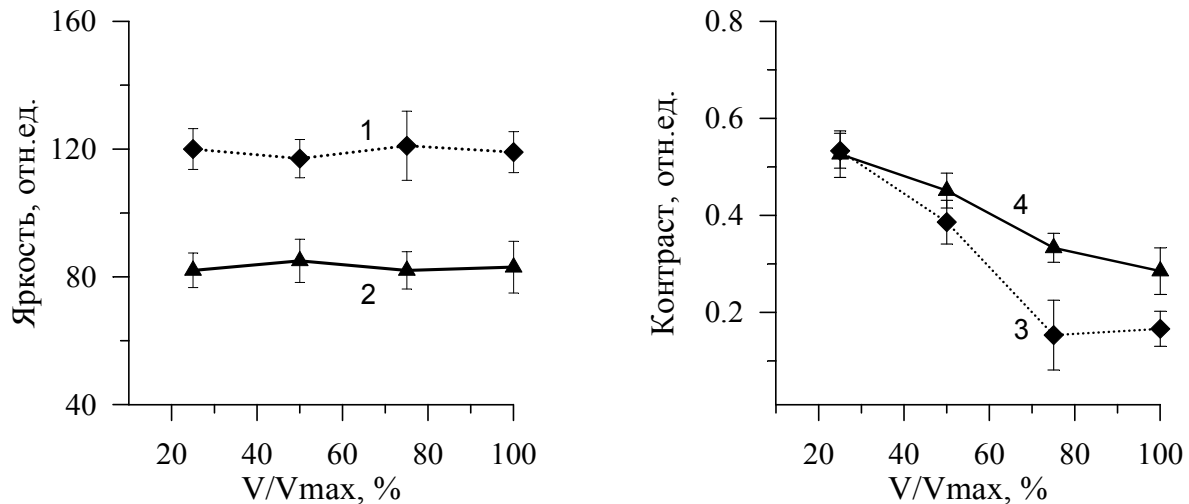


Рисунок 1 – Влияние относительной скорости тока жидкости в фантоме зуба на величину средних значений контраста (3, 4) и яркости (1, 2) спекл-картины: 1, 3 – выдержка камеры 50 мс, 2, 4 – выдержка 10 мс

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что средние значения яркости спеклов не зависят от скорости потока жидкости, но определяются условиями съемки, например величиной выдержки (экспозиции). При увеличении выдержки наблюдалось возрастание величины яркости спеклов. Измеряемые средние значения контраста зависят от скорости движения жидкости в капилляре. Увеличение скорости тока жидкости сопровождается существенным снижением контраста. Длительность экспозиции влияет на точность измерений контраста. При малых значениях экспозиции зависимость среднего значения контраста от скорости потока жидкости имеет вид, близкий к линейному. Увеличение выдержки ведет к более резкому и непропорциональному изменению величины контраста при существенном росте разброса измеряемой величины.

Оценка кожной микроциркуляции *in vivo*. В качестве объекта исследований был

выбран участок кожи размером 20×20 мм на внутренней стороне запястья человека, наблюдение за которым проводили параллельно с использованием нашей установки и цифровой фотокамеры. После регистрации параметров исходного состояния поверхности кожи половина исследуемого участка подвергалась механическому раздражению (растирание изогнутой иглой для препарирования, 30–60 с). В результате в месте воздействия наблюдалась легкая гиперемия, связанная с усилением микроциркуляции в обработанном участке кожи. Через определенное время после воздействия проводили повторную съемку исследуемых участков кожи. В качестве иллюстрации на рисунке 2 приведены результаты одного из экспериментов, показывающие, что усиление кровотока в раздраженных участках кожи сопровождается значительными изменениями параметров спекл-картины.

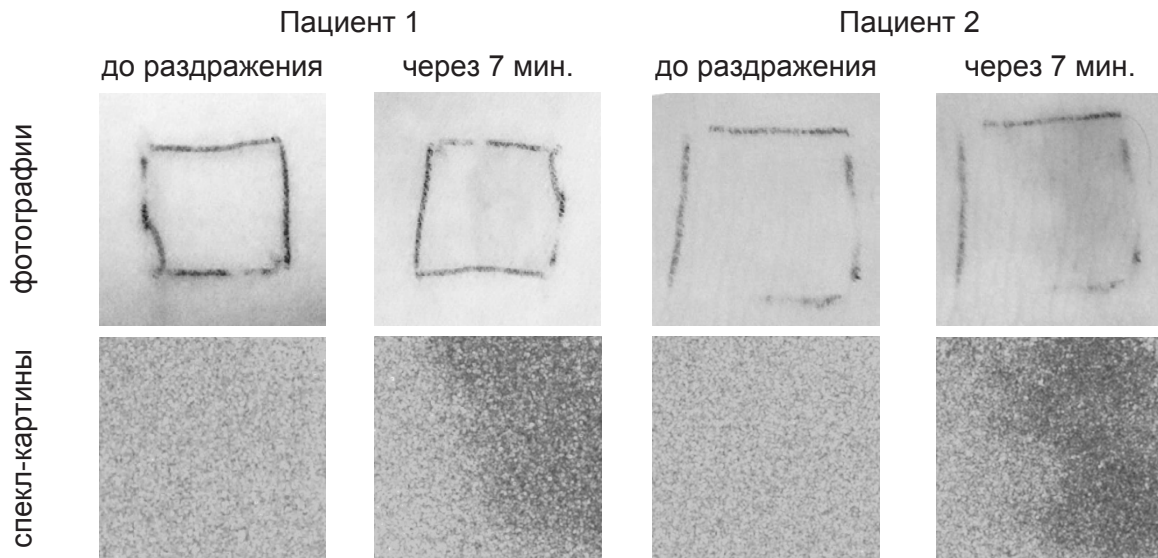


Рисунок 2 – Фотографии и соответствующие им спекл-картины участка поверхности кожи пациентов до и после механического раздражения кожи

Полученные результаты носят полуколичественный характер, однако четко прослеживается тенденция: при усилении кожной микроциркуляции в результате раздражения снижается величина контраста спекл-картины. Таким образом, разработанная методика позволяет использовать величину контраста как показатель интенсивности кровотока в биологических тканях.

Оценка состояния микроциркуляции в конечностях крысы при индуцированном артрите. В ряде экспериментов проводили оценку изменения микроциркуляции в конечностях крыс с индуцированным артритом. Правая тазовая конечность, которую

инфицировали путем внутримышечной инъекции суспензии зимозана (из расчета 20 мг/кг веса животного), служила объектом исследования, а левую (неинфицированную) тазовую конечность использовали в качестве контроля. Наблюдения проводили в течение 28 дней после инфицирования. Отечность в месте инъекции спадала после второго дня наблюдения.

На рисунке 3 представлены попарно снимки участков конечностей на различных этапах развития патологии. Полученные в результате математической обработки спеклов средние значения яркости и контраста приведены в виде графиков на рисунке 4.

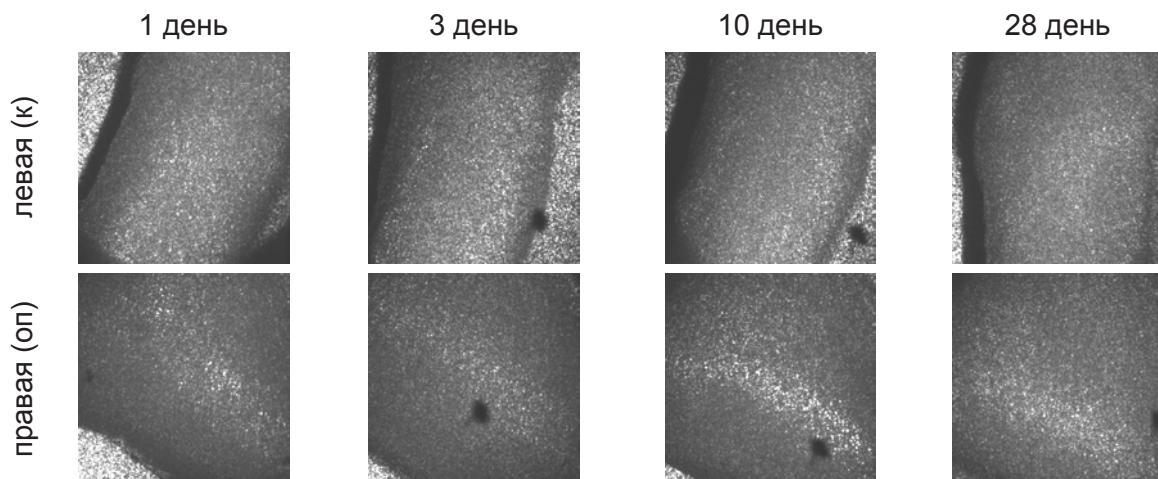


Рисунок 3 – Исходные кадры регистрируемой спекл-картины кожи конечностей крысы на различных стадиях протекания болезни

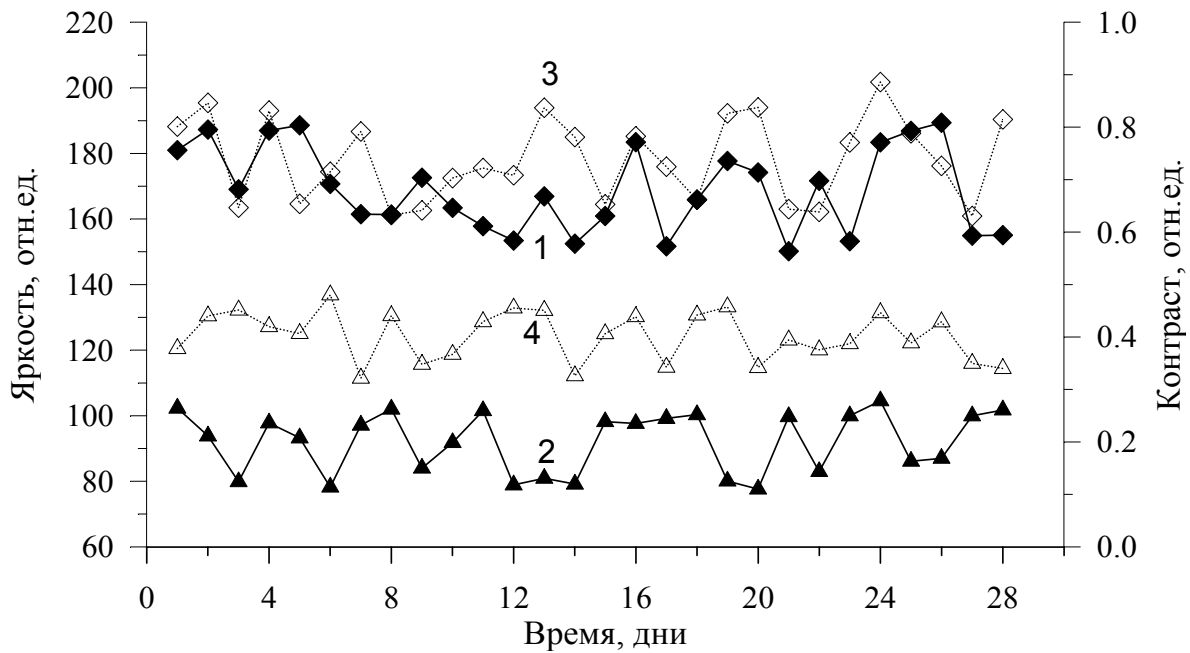


Рисунок 4 – Изменение средних значений яркости (1, 3) и контраста (2, 4) спекл-картины во времени: 1, 2 – левая тазовая конечность (опыт), 3, 4 – правая тазовая конечность (контроль)

Представленные на рисунке 4 результаты свидетельствуют о заметной вариабельности абсолютных значений измеряемых параметров спеклов, что характерно для экспериментов на животных *in vivo*. Вариации величины яркости носят сходный характер как для опытной, так и для контрольной конечностей, а средние значения этого параметра в обоих случаях близки по величине. Анализ динамики изменения контраста показывает достоверное снижение величины контраста спекла левой тазовой конечности (опытной) в сравнении с правой (контроль), что может указывать на ухудшение микроциркуляции в пораженной конечности. Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанный метод чувствителен к изменению вызванных артритом параметров микроциркуляции в конечностях животных. Это подтверждает перспективность использования предложенного метода в качестве основы для разработки способа выявления артритов и контроля динамики их лечения.

Заключение. В результате проведенных экспериментов установлено, что при исследовании механического раздражения поверхности кожи человека, а также при мони-

торинге тока жидкости внутри зубного фантома наблюдается отрицательная корреляция между величиной контрастности и скоростью движения рассеивающих центров. Также было выявлено, что средняя яркость спекл-картины определяется условиями измерения и практически не зависит от изменений микроциркуляции в исследуемом объекте. Наблюдение за пораженной артритом конечностью крысы показало достоверное снижение значения контраста спекл-картины кожной поверхности пораженной конечности в сравнении со здоровой. Однако зависимость данного параметра от фазы заболевания на данном этапе исследований не выявлена. Возможные причины, связанные с небольшой отечностью мягких тканей, а также с динамикой распространения поражений микроциркуляторного русла при развитии артрита, требуют дальнейшего изучения. В целом полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования разработанных методик исследования для анализа микроциркуляции в тканях человека со значительно различающимися биофизическими характеристиками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Механика кровообращения / К. Каро [и др.]. – М. : Мир, 1981. – 624 с.
2. Шебалин, А. Лазерная медицинская диагностика состояния организма по биоспеклам кожи / А. Шебалин // Фотоника. – 2008. – № 1. – С.14–18.
3. Рубникович, С. П. Лазерно-оптический метод исследования в диагностике микроциркуляции десны у пациентов с болезнями пародонта / С. П. Рубникович, Ю. Л. Денисова // Стоматологический журнал. – 2008. – № 2. – С. 166–169.
4. Дик, С. К. Лазерно-оптические методы и технические средства контроля функционального состояния биообъектов / С. К. Дик. – Минск : БГУИР, 2014. – 235 с.
5. Современные неинвазивные технологии визуализации в дерматологии / Ю. Ю. Штиршнайдер [и др.] // Вестник дерматологии и венерологии. – 2011. – Вып. № 5. – С. 41–53.
6. Briers, J. D. Laser speckle contrast analysis (LASCA): A non-scanning full-field technique for monitoring capillary blood flow / J. D. Briers, S. Webster // J. Biomed. Optics. – 1996. – Vol. 1, no. 2. – P. 174–179.
7. Гудмен, Дж. Статистическая оптика / Дж. Гудмен; под ред. Г. В. Скродского. – М. : Мир, 1988. – 528 с.
8. Briers, J. D. Laser Doppler speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging / J. D. Briers // Physiological Meas. – 2001. – Vol. 22. – P. 35–66.
9. Estimation of blood microcirculation in integuments by non-invasive speckle-optical method under the photodynamic action / S. Dick [et. al] // Z. Med. Phys. – 2009. – V.19. – P. 90–96.
10. New Insights into Image Processing of Cortical Blood Flow Monitors Using Laser Speckle Imaging / T. M. Le [et. al] // IEEE Transactions on Medical Imaging. – 2007. – Vol. 26(6). – P.833–842.

REFERENCES

1. Mekhanika krovoobrashcheniya / K. Karo [i dr.]. – M. : Mir, 1981. – 624 s.
2. Shebalin, A. Lazernaya meditsinskaya diagnostika sostoyaniya organizma po biospeklam kozhi / A. Shebalin // Fotonika. – 2008. – № 1. – S.14–18.
3. Rubnikovich, S. P. Lazerno-opticheskiy metod issledovaniya v diagnostike mikrotsirkulyatsii desny u patsientov s boleznyami periodontal / S. P. Rubnikovich, Yu. L. Denisova // Stomatologicheskij zhurnal. – 2008. – № 2. – S. 166–169.
4. Dik, S. K. Lazerno-opticheskiye metody i tekhnicheskkiye sredstva kontrolya funktsionalnogo sostoyaniya bioobyektov / S. K. Dik. – Minsk : BGUIR, 2014. – 235 s.
5. Sovremennyye neinvazivnyye tekhnologii vizualizatsii i dermatologii / Yu. Yu. Shtirshnayder [i dr.] // Vestnik dermatologii i venerologii. – 2011. – Vyp. № 5. – S. 41–53.
6. Briers, J. D. Laser speckle contrast analysis (LASCA): A non-scanning full-field technique for monitoring capillary blood flow / J. D. Briers, S. Webster // J. Biomed. Optics. – 1996. – Vol. 1, no. 2. – P. 174–179.
7. Gudmen, Dzh. Statisticheskaya optika / Dzh. Gudmen; pod red. G. V. Skrotskogo. – M. : Mir, 1988. – 528 s.
8. Briers, J. D. Laser Doppler speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging / J. D. Briers // Physiological Meas. – 2001. – Vol. 22. – P. 35–66.
9. Estimation of blood microcirculation in integuments by non-invasive speckle-optical method under the photodynamic action / S. Dick [et. al] // Z. Med. Phys. – 2009. – V.19. – P. 90–96.
10. New Insights into Image Processing of Cortical Blood Flow Monitors Using Laser Speckle Imaging / T. M. Le [et. al] // IEEE Transactions on Medical Imaging. – 2007. – Vol. 26(6). – P.833–842.