

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

**Разработка лазерного доплеровского анемометра для измерения скорости
кровотока *in vivo***

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД ОБ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ ПОДГОТОВЛЕННОЙ
НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ (ДИССЕРТАЦИИ)

аспиранта 4 года обучения

направление подготовки 06.06.01 – «Биологические науки»

физического факультета

Бороздовой Марии Алексеевны

Научный руководитель

Доцент кафедры оптики и биофотоники

к.ф.-м.н.,

_____ Федосов И.В.

Саратов 2018

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Изменения характеристик и структуры потоков в системе микроциркуляции крови несут в себе важную диагностическую информацию так как многие патологические состояния сопровождаются нарушениями микрогемодициркуляции и выражаются в несоответствии изменения динамики кровотока с метаболическими потребностями органов, что приводит к нарушению их функции. Такие внутрисосудистые расстройства, как замедление кровотока, тромбоз, эмболия, атеросклероз, диабетическая ретинопатия, хроническая венозная недостаточность, также в значительной степени зависят от нарушения реологических свойств крови и вызывают функциональные и морфологические изменения в микроциркуляторном русле. Повреждения на уровне микроциркуляции/макроциркуляции, аномальный кровоток на этапах эмбрионального развития приводит к врожденным дефектам.

Измерение количественных характеристик кровотока во время развития может значительно продвинуть понимание многих врожденных заболеваний, а также необходимо для понимания механизмов регуляции местного кровотока в органах и тканях. В настоящее время к наиболее эффективным диагностическим методам определения основных параметров микроциркуляции относятся методы, основанные на динамическом рассеянии света (методы лазерной доплеровской флоуметрии, спекл-визуализация, метод измерения скорости крови по изображениям частиц). Доплеровские ультразвуковые измерители скорости кровотока могут обеспечить достаточную глубину проникновения но их главный недостаток относительно низкое разрешение; даже с высокочастотной системой, разрешение составляет 60-90 мкм.

В отличие от большинства современных оптических методов исследования микроциркуляции, ориентированных на визуализацию сети кровеносных

сосудов и оценку относительных изменений объема циркулирующей крови, лазерные доплеровские анемометры (ЛДА) и доплеровские оптические когерентные томографы (ДОКТ) позволяют измерять скорость течения крови и точно оценивать объемный расход крови через отдельные артериолы и венулы. Подобные измерения необходимы для понимания фундаментальных механизмов регуляции местного кровотока в органах и тканях, а, следовательно, могут быть непосредственно использованы для целей медицинской диагностики.

Принцип действия ЛДА и ДОКТ основан на измерении величины доплеровского сдвига частоты (ДСЧ) оптического излучения, однократно рассеянного движущимися клетками. Величина ДСЧ прямо пропорциональна проекции вектора скорости на направление вектора рассеяния света, который определяется как разность волновых векторов падающего и рассеянного излучения. Абсолютная величина скорости течения может быть определена, если известен угол между вектором скорости и вектором рассеяния. ЛДА и ДОКТ применяют в основном для исследования сосудов, расположенных на небольшой глубине параллельно поверхности сильно рассеивающих свет тканей. Важнейшим преимуществом дифЛДА перед существующими ЛДА офтальмологического назначения и системами ДОКТ является слабая зависимость сигнала ЛДА от угла между осью оптического прибора и направлением скорости потока в наиболее распространенном случае, когда этот угол близок к 90° и способность точного измерения скорости потока при использовании одного канала регистрации. Несмотря на значительный успех, достигнутый к настоящему времени в части развития методов исследования микроциркуляции крови, Существует потребность в измерении абсолютной скорости кровотока оптическими методами в сосудах от 10-100 мкм, что и определило цель настоящей диссертационной работы.

Целью данной работы является разработка ЛДА дифференциальной схемы, предназначенного для измерения скорости течения крови в поверхностных артериолах и венулах животных в рамках исследования механизмов регуляции местного кровотока.

Основными задачами данной работы являются:

1. Разработка ЛДА дифференциальной схемы, и тестирование его на фантомах кровеносных сосудов, а также на сосудах животных *in vivo*.
2. Разработка программного обеспечения для обработки спектрального анализа сигнала фотодетектора.
3. Установление вклада рассеяния света частицами, пересекающими лазерные пучки за пределами измерительного объема в формирование низкочастотной составляющей спектра сигнала ЛДА.
4. Улучшение разрешающей способности разработанной схемы ЛДА

Объектом исследования являются модели кровеносных сосудов диаметром 50 – 500 мкм. Кровеносные сосуды диаметром 100-500 мкм.

Предмет исследования:

- вклад рассеяния света частицами, пересекающими лазерные пучки за пределами измерительного объема в формирование низкочастотной составляющей спектра сигнала ЛДА;
- Зависимость динамики кровотока от пульса;
- глубина проникновения зондирующих пучков в поверхностные кровеносные сосуды;
- Зависимость разрешающей способности ЛДА от угла между пучками формирующими измерительный объем

Методология и методы исследования.

В работе использовались ЛДА дифференциальной схемы для измерения скорости потоков сильно рассеивающих жидкостей. Оригинальный метод определения величины ДСЧ, основанный на вычислении разностного спектра мощности сигнала ЛДА. спектральный анализ осуществлялся при помощи программного обеспечения, разработанного в среде LabVIEW (National Instruments, США). Сигнал фотодетектора регистрировался АЦП звукового адаптера персонального компьютера с частотой 44100 кГц и разрешением 16 бит. Оценка спектра сигнала строилась как среднее по неперекрывающимся модифицированным периодограммам с окном данных Ханнинга

Достоверность полученных результатов обеспечивается точностью используемых методов, согласованностью характеристик рассматриваемых объектов с имеющимися теоретическими и экспериментальными результатами, опубликованными в ведущих отечественных и зарубежных изданиях, широкой апробацией результатов работы, обсуждением результатов работы на многочисленных международных конференциях.

Научная новизна работы:

1. Впервые был предложен и запатентован Способ измерения скорости крови основанный на вычислении разностного спектра мощности сигнала, зарегистрированного при поочередном перекрывании когерентных пучков лазерного излучения доплеровского анемометра дифференциальной схемы позволяет определить абсолютное значение скорости кровотока
2. Впервые продемонстрировано применение разработанной модификации устройства ЛДА к измерению *in vivo* в условиях выраженной модуляции кровотока.
3. Впервые произведено мгновенное выделение составляющей, содержащей информацию о величине доплеровского сдвига частоты проблема с которой возникает на фоне флуктуаций интенсивности излучения,

многократно рассеянного клетками крови и окружающими сосуд тканями в реальном времени *in vivo*.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

- Полученные в работе данные говорят о преимуществах метода ЛДА и о существенности вклада рассеяния света частицами, пересекающими лазерные пучки за пределами измерительного объема в формирование низкочастотной составляющей спектра сигнала ЛДА. И необходимости мгновенного выделения составляющей, содержащей информацию о величине доплеровского сдвига частоты
- Использованная модификация ЛДА обеспечивает точное измерение скорости потока при использовании одного канала регистрации ДСЧ в отличие от существующих систем ЛДА офтальмологического назначения и систем ДОКТ.
- Разработанное программное обеспечение для спектрального анализа сигнала фотодетектора с использованием нового метода обработки сигнала ЛДА может быть использована в дальнейших исследованиях.

На защиту выносятся следующие положения:

- Способ измерения скорости крови основанный на вычислении разностного спектра мощности сигнала, зарегистрированного при поочередном перекрывании когерентных пучков лазерного излучения доплеровского анемометра дифференциальной схемы позволяет определить абсолютное значение скорости кровотока
- Метод и устройство ЛДА для измерения скорости кровотока с использованием механического прерывателя пучков лазерного излучения
- Система лазерного доплеровского анемометра с жидкокристаллическим прерывателем и подводом излучения при помощи волоконных световодов

Научно-квалификационная работа состоит из введения, 4х глав, и заключения. Первая глава посвящена описанию существующих оптических

методов измерения абсолютного значения скорости кровотока, описывает преимущества и недостатки лазерной доплеровской анемометрии по сравнению с другими методами, во второй главе описаны теоретические основы лазерной доплеровской анемометрии и диагностики потоков, включает в себя описание нового способа измерения течения крови, основанный на вычислении разностного спектра мощности сигнала ЛДА, описывается схема ЛДА основанного на бинокулярном микроскопе, и результаты экспериментов на фантомах кровеносных сосудов. В третьей главе описывается модификация схемы ЛДА с механическим модулятором примененная для исследований потоков сильно рассеивающих жидкостей, особенности хорионаллантоисной оболочки куриного эмбриона как модели для исследования кровеносных сосудов, результаты экспериментов проведенных на ЛДА с механическим модулятором. В четвертой главе описывается ЛДА с увеличенным углом между пучками на дискретных элементах и его применение для измерения скорости потоков в фантомах кровеносных сосудов, описываются кровеносные и лимфатические сосуды брыжейки крысы как модель для исследования скорости кровотока, а также применение системы лазерного доплеровского анемометра с жидкокристаллическим прерывателем и подводом излучения при помощи волоконных световодов для измерений скорости кровотока *in vivo*. Диссертация изложена на 87 страниц, содержит 33 рисунка, 1 таблицу, 23 формулы.

Конкурсная поддержка работы

1. Проектная часть госзадания в сфере научной деятельности № 3.1340.2014/К при поддержке Минобрнауки РФ «Разработка методов диагностики функционального состояния клеточных структур микроциркуляторного русла по данным оптических методов исследования» (2014-2016, исполнитель)

2. Проектная часть госзадания в сфере научной деятельности № 3.1586.2017/ПЧ при поддержке Минобрнауки РФ «Квантификация физических закономерностей регуляции кровотока в микроциркуляторной сети методами оптического мониторинга и численного моделирования» (2017-2019, исполнитель)

Личный вклад автора диссертации

Автор лично участвовал в разработке всех установок использованных для исследования. Автором самостоятельно сконструированы и собраны все установки, выполнены экспериментальные исследования, написано программное обеспечение, обработка полученных данных. Автор участвовал в анализе и обсуждении полученных результатов, в написании научных статей и апробации результатов исследований на конференциях, симпозиумах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные выводы по данной работе заключаются в следующем:

1. . Разработан ЛДА дифференциальной схемы, предназначенный для исследования регуляции местного кровотока в артериолах и венулах диаметром 50 – 500 мкм. ЛДА обеспечивает измерение абсолютной скорости
2. Результаты экспериментов, выполненные с использованием фантомов кровеносных сосудов представленные в данной работе, демонстрируют преимущества ЛДА дифференциальной схемы перед существующими оптическими методами измерения скорости кровотока в сравнительно крупных кровеносных сосудах.
3. Показано, что при зондировании кровеносного сосуда в направлении, перпендикулярном его оси, результат измерения скорости практически не зависит от величины угла между оптической осью ЛДА и осью сосуда, при изменении угла на величину $\pm 10^\circ$. Таким образом, ЛДА обеспечивает точное измерение скорости потока при использовании одного канала регистрации ДСЧ в отличие от существующих систем ЛДА офтальмологического назначения и систем ДОКТ .
4. Установлен вклад рассеяния света частицами, пересекающими лазерные пучки за пределами измерительного объема в формирование

низкочастотной составляющей спектра сигнала ЛДА. Предложен метод определения величины ДСЧ, основанный на вычислении разностного спектра мощности сигнала ЛДА

5. Проведены эксперименты на хориоаллантаоисной оболочке(ХАО) 13-дневных куриных эмбрионов. Сосудах с диаметром в диапазоне от 111 до 229 мкм, лежащих на глубине от 70 до 200 мкм. Кровоток в ХАО значительно колеблется во время сердечного цикла, даже в относительно небольших артериальных сосудах приводит к более или менее выраженному расширению спектра пика на доплеровской частоте, что в свою очередь затрудняет измерение, при времени наблюдения 10 сек, существует только около 10-20 сердечных циклов. Таким образом, в зависимости от конкретного значения частоты сердечных сокращений и фазы сердечного цикла в моменты начала или в конце записи расчетное абсолютное значение скорости может изменяться. Для решения этой проблемы был выделен импульсный сигнал, измерения были синхронизированы с фазой путем фильтрации сигнала с помощью полосового фильтра Чебышева порядка 5 с полосой 2500-2700 Гц. Каждый максимум импульсной волны соответствует самому высокому сдвигу частоты и, следовательно, к максимальной скорости, а минимум соответствует самой низкой скорости соответственно.
6. Разработана новая модификация схемы ЛДА с величиной измерительного объема, сравнимого с размером частиц. Небольшой период интерференционных полос улучшает разрешение устройства. При измерениях на глубине больше 5 мкм пик предлагаемая дифференциальная схема ЛДА обеспечила возможность измерения расхода цельной крови в сосуде емкостью 100 мкм.
7. Способ измерения скорости крови основанный на вычислении разностного спектра мощности сигнала, зарегистрированного при поочередном перекрывании когерентных пучков лазерного излучения

доплеровского анемометра дифференциальной схемы позволяет определить абсолютное значение скорости кровотока

8. Метод и устройство ЛДА для измерения скорости кровотока с использованием механического прерывателя пучков лазерного излучения
9. Разработана система лазерного доплеровского анемометра с жидкокристаллическим прерывателем и подводом излучения при помощи волоконных световодов
10. Разработанная схема ЛДА и программное обеспечение программное обеспечение может применяться для мгновенного выделения составляющей, содержащей информацию о величине доплеровского сдвига частоты проблема с которой возникает на фоне флуктуаций интенсивности излучения, многократно рассеянного клетками крови и окружающими сосуд тканями.

Апробация работы.

Основные результаты работы докладывались на **конференциях**:

1. VII съезде Российского фотобиологического общества (14-20 сентября, 2014, Шепси, Россия) <http://www.photobiology.ru/ru/arxiv.htm>

Лазерный доплеровский анемометр для измерения скорости кровотока в микрососудах, Бороздова М.А., Федосов И.В., Тучин В.В., (устный)

2. Конференции Saratov Fall Meeting 2014 (September 22 – 26, 2014, Saratov, Russia)

Laser Doppler velocimetry method for blood microcirculation studies, M.A. Borozdova, I.V. Fedosov, V.V. Tuchin (стендовый)

3. 19-я Международной Пушинской школе-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века»(Пушино 20-24 апреля 2015 г.) <http://www.biology21.ru/>

Лазерный доплеровский анемометр для измерения скорости кровотока in vivo, Бороздова М.А., Федосов И.В., Тучин В.В., (стендовый)

4. Asia Communications and Photonics Conference 2015 (November 19-23, 2015, Shanghai, Russia) <http://www.acp-conf.org/> Quantification of absolute blood velocity using LDA, Borozdova M.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V.(стендовый)

5. Конференции Saratov Fall Meeting 2015 Borozdova M.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V, “Quantification of absolute blood velocity using LDA” SFM’15 Conference on Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data II, Russia, Saratov, 2015.

6. Бороздова М.А., Федосов И.В., Тучин В.В., «Измерения количественных характеристик крови в сосудах хориоаллантаоисной оболочки куриного эмбриона методом лазерной доплеровской анемометрии», стендовый доклад, 5-й съезд биофизиков России, 5-10 октября. Ростов-на-Дону, 2015

7. Конференции Saratov Fall Meeting 2016 Borozdova M.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V, “ Doppler effect in optics and relativity” SFM’16 Conference on Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data II, Russia, Saratov, 2016.

8. Borozdova M.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V, “quantification of blood velocity using laser doppler anemometer” SFM’17 Conference on Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data II, Russia, Saratov, 2017.

Публикации автора по теме диссертации в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. Бороздова М. А., Федосов И. В., Тучин В. В. Метод анализа сигнала лазерного доплеровского анемометра для измерения скорости течения крови //Квантовая электроника. – 2015. – Т. 45. – №. 3. – С. 275-282.

2. Borozdova M. A., Fedosov I. V., Tuchin V. V. Laser Doppler anemometer: new algorithm for signal processing at high light scattering //Saratov Fall Meeting 2014: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVI; Laser Physics and Photonics XVI; and Computational Biophysics. – International Society for Optics and Photonics, 2015. – Т. 9448. – С. 94481N.

3. Borozdova M. A. et al. Quantitative measurement of blood flow dynamics in chorioallantoic membrane of chicken embryo using laser Doppler anemometry

//Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS). – International Society for Optics and Photonics, 2016. – Т. 9917. – С. 99170W.

4. M. A. Borozdova, I. V. Fedosov, V. V. Tuchin, "Quantification of absolute blood velocity using LDA ," Proc. SPIE 10716, Saratov Fall Meeting 2017: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX, 107160I (26 April 2018); doi: 10.1117/12.2317509

5.Способ измерения скорости течения крови// Патент № 2610559 РФ.2016/
Бороздова М.А., Федосов И.В., Тучин В.В.