

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

**Методы лазерной спекл-визуализации динамических процессов в
биологических системах**

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

аспиранта 4 курса

направления 03.06.01 «Физика и астрономия»

физического факультета

Абдурашитова Аркадия Сергеевича

Научный руководитель

заведующий кафедры оптики и биофотоники

д.ф.-м.н., профессор

_____ Тучин В.В.

Саратов 2019

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Работа методов лазерной спекл-визуализации основана на анализе переменных во времени и пространстве спекл-структур, зарегистрированных на матричные фотоприемники с конечным временем экспозиции. При взаимодействии высококогерентного лазерного излучения с объектом, имеющим статические или динамические микро-неоднородности, изображение объекта, сформированное оптической системой, будет иметь пространственную, изменяющуюся во времени модуляцию - спеклы (англ. speckles). Спекл-структуры, сформированные оптической системой принято называть субъективными, так как их размерные характеристики определяются, в основном, параметрами оптической системы (длиной волны излучения, числовой апертурой и увеличением). По методу регистрации и алгоритмам обработки экспериментальных данных лазерная спекл-визуализация делится на два типа: пространственная и временная. Первый заключается в регистрации субъективных спекл-структур на матричный фотоприемник с временем экспозиции много большим, чем период временной модуляции интенсивности спекл-картин. Это характерное время принято называть временем декорреляции спекл-структуры, то есть время, за которое одна спекл-структура сменится другой, статистически независимой, в силу локальных изменений рассеивающих свойств объекта. При таком режиме, за время экспозиции происходит усреднение большого числа реализаций спекл-картин, что приводит к их локальному «размытию» в местах наличия динамических рассеивателей, например, форменных элементов крови. Такой эффект принято называть локальным снижением спекл-контраста, численный анализ его пространственного распределения позволяет получать информацию о скорости движения кровотоков или лимфо-токов. Второй, в отличие от первого, оперирует временами экспозиции существенно меньшими, в сравнении со временем декорреляции, что приводит к регистрации спекл-структур свободных от локального «размытия». Численная обработка происходит путем анализа временной динамики интенсивности спекл-структур в каждом пикселе изображения. Такой подход схож по своей сути с Доплеровскими методиками. Лазерная спекл-визуализация обладает рядом особенностей: простота аппаратной части, полнопольный характер измерений, тривиальные алгоритмы получения экспериментальных данных. Данные качества делают методику ЛСВ идеально подходящей для прижизненной характеристики динамических биологических систем (скорости кровотоков или лимфо-токов). Однако, данный метод не лишен недостатков, к которым можно отнести поверхностный характер измерений из-за сравнительно небольшой глубины проникновения баллистических фотонов в био-ткань, отсутствие селекции сигнала по глубине объекта, нетривиальная интерпретация измеряемых параметров, а именно, переход от качественных к количественным оценкам скорости, связанный с существенной зависимостью сигнала метода ЛСВ от внешних факторов, продиктованных экспериментальными условиями. Наибольшую сложность для

анализа представляет сигнал ЛСВ, сформированный многократно рассеянным светом, то есть несущим в себе информацию об относительной скорости движения центров рассеяния, например, форменных элементов крови, а не о средней, направленной скорости движения всего потока. Данная ситуация возникает особенно часто при визуализации относительно крупных сосудов с большой концентрацией форменных элементов. Основным методом устранения влияния многократного рассеяния на сигнал ЛСВ является использование в высокой степени поляризованных источников излучения и анализатора в системе формирования изображения, ось которого установлена параллельно направлению поляризации источника. Стоит отметить, что перспективным является применение различных просветляющих агентов [34—36] для увеличения глубины проникновения света в био-ткань, а так же для снижения влияния рассеяния от вышележащих слоев на сигнал от сосуда, что актуально, например для кожи или интактного черепа. При визуализации относительно прозрачных сред с высоким пространственным разрешением, возникает проблема затухания сигнала ЛСВ, вызванная малой глубиной резкого-изображаемого пространства объектива, а не рассеивающими/поглощающими свойствами объекта. При таких условиях необходимо производить фокусировку оптической системы на различные глубины объекта, которая выполняется специализированными механическими или пьезоэлектрическими устройствами, ограничивающими скорость работы и ведущими к существенному удорожанию комплекса ЛСВ. В данном контексте уместно применять технологию голографической записи изображения, позволяющую в численном виде восстановить амплитуду и фазу волнового фронта, сформированного при отражении света от объекта исследования. Наряду с этим в решении биофизических задач необходимо анализировать большие объемы данных, представляющие собой набор измерений для различных групп животных, патологий и др, что делает целесообразным оптимизацию алгоритмов записи и обработки изображений, а так же методов автоматического анализа получаемых результатов. Разработка новых методов регистрации изображений в системе ЛСВ, основанных на принципах голографической микроскопии, а так же оптимизация алгоритмов обработки и анализа сигнала ЛСВ являются темой данного исследования.

Актуальность темы исследования обусловлена большой практической значимостью и востребованностью оптических методов, предоставляющих новые возможности визуализации при оценке функционального состояния сосудов с различными патологиями.

Цель диссертационной работы – развитие и разработка новых методологических основ лазерной спекл-визуализации, в том числе основанных на принципах голографической регистрации и специальной статистической обработки сигнала..

Для достижения поставленной цели поставлены и решались следующие **задачи**:

- Разработка теоретической модели формирования сигнала ЛСВ, позволяющей производить анализ формирования субъективной спекл-

картины от сосуда с произвольным профилем скорости и концентрацией форменных элементов крови или лимфы.

- Исследовать зависимость двумерной функции фазовой модуляции предметного волнового фронта, восстановленной из комплексного сигнала ЛСВ от профиля скорости и концентрации форменных элементов.
- Установить возможность вычисления средней скорости движения рассеивающих центров и направления их движения по статистическим свойствам двумерной функции фазовой модуляции предметного волнового фронта.
- Экспериментально подтвердить правильность теоретических выводов и работоспособность предложенной модернизации метода ЛСВ на фантомных экспериментах.
- Провести *in vivo* исследования кровотока в условиях развития патологических состояний для валидации предложенного метода по оценке скорости и направления движения форменных элементов крови.

Объектом исследования являются процессы формирования субъективных спекл-картин, полученных при отражении когерентного света от сосуда или участка биологической ткани.

Предмет исследования:

- Двумерная функция фазовой модуляции волнового фронта, отраженная от сосуда или участка биологической ткани;
- Методы статистического анализа двумерной функции фазовой модуляции и ее соотнесение со скоростью и направлением движения кровотока.

Достоверность научных результатов, представленных в работе, результатов обеспечивается корректностью теоретических рассуждений. Выводы, следующие из математических выражений, полученных в рамках рассматриваемой модели согласуются с фантомным и *in vivo* экспериментами. Результаты, полученные при проведении фантомных и *in vivo* экспериментов находятся в соответствии с результатами, полученными другими научными группами.

Научная новизна диссертационной работы

- Предложена новая, упрощенная модель формирования субъективной спекл-структуры от сосуда, учитывающая как профиль скорости движения форменных элементов крови или лимфы, так и их концентрацию.

- Впервые представлен новый метод анализа средней скорости движения рассеивающих центров в методе ЛСВ, основанный на анализе двумерной функции фазовой модуляции волнового фронта, сформированного при отражении света от объекта исследования.
- С использованием предложенного метода впервые экспериментально была показана возможность восстановления значения средней скорости движения форменных элементов крови, а также направления потока в методе ЛСВ.
- Проведены *in vivo* эксперименты по визуализации коры головного мозга мыши в условиях развития ишемии предложенным методом голографической лазерной спекл-визуализации

Теоретическая и практическая значимость исследования

- Предложенная теоретическая модель, описывающая формирования сигнала ЛСВ при произвольных параметрах профиля распределения скорости по сечению сосуда, а так же концентрации движущихся форменных является в достаточной степени простым и ясным инструментом для анализа динамических характеристик спекл-структур.
- С помощью предложенной модели был продемонстрирован иной способ оценки скорости движения форменных элементов, основанный на анализе двумерной функции фазовой модуляции предметного волнового фронта, а не на оценке пространственного или временного спекл-контраста.
- Математические выражения, полученные на основе данной модели позволяют производить количественный анализ средней скорости движения рассеивателей (при известном угле освещающего пучка) и направления их движения.
- Предложена голографическая схема регистрации спекл-структур, позволяющая восстанавливать комплексную амплитуду волнового фронта предметного канала, с использованием минимального набора опто-механических элементов.

Положения и результаты, выносимые на защиту

1. Модель формирования спекл-картины от сосуда, с произвольной концентрацией и профилем скорости движения форменных элементов.
2. Фазовая лазерная спекл-визуализация позволяет с высокой точностью производить количественные, полнопольные измерения средней скорости и направления движения форменных элементов.
3. Метод реализации фазовой ЛСВ для *in vivo* измерений церебрального кровотока у лабораторных мышей при наличии ишемического состояния.
4. Численная фокусировка позволяет повысить четкость границ сосудов, для более точного измерения их диаметров, а так же компенсировать смещения объекта вдоль оптической оси.

Научно-квалификационная работа состоит из введения, четырех глав, и заключения. Первая глава посвящена обзору современного состояния направления исследования, а также обоснованию актуальности работы. Во второй главе описывается математическая модель формирования субъективной спекл-картин при отражении когерентного света от сосуда с произвольным профилем скорости. Описан процесс формирования и регистрации сигнала в интерференционном микроскопе на отражение. Введение понятия функции фазовой модуляции предметного волнового фронта. В третьей главе производится численное моделирование сигнала ЛСВ, согласно предложенной модели, а так же восстановление функции фазовой модуляции предметного волнового фронта при параболическом распределении скоростей. В четвертой главе проводятся фантомные и *in vivo* эксперименты по визуализации церебральных сосудов головного мозга мыши при ишемических состояниях предложенными методами фазовой лазерной спекл-визуализации. Полный объем работы составляет 81 страницу, включая 25 рисунков и 2 таблицы. Список литературы содержит 131 наименование.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной диссертационной работе развиты теоретические методы, описывающие формирование сигнала в методе лазерной спекл-визуализации, разработаны новые подходы к анализу экспериментальных данных. Проведены *in vivo* исследования церебральных сосудов в условиях развитой ишемии предложенными методами голографической лазерной спекл-визуализации. Показана высокая чувствительность метода, превосходящая таковую у методов, основанных на анализе пространственно-временных свойств распределения интенсивности спекл-картины. Естественным развитием метода является переход к более быстрым камерам, с частотой кадров в единицы или десятки килогерц для расширения динамического диапазона измеряемых скоростей, разработка быстрых и оптимизированных алгоритмов, позволяющих производить анализ такого большого потока данных в квази-реальном масштабе времени, а также алгоритмов определения положения наилучшего фокуса и его динамической подстройки численными методами.

Основные результаты работы заключаются в следующем:

1. Была разработана простая и сравнительно общая модель формирования сигнала в методе лазерной спекл-визуализации, учитывающая как объемную концентрацию форменных элементов крови или лимфы так и профиль скорости движения, способная как описывать известные явления, как трансляция или "кипение" спеклов, так и предсказать новые методы анализа экспериментальных данных.
2. Проведено численное моделирование сигнала лазерной спекл-визуализации, зарегистрированного в интерференционном микроскопе с вне-осевой конфигурацией опорного поля, согласно предложенным математическим выражениям.

3. Показана возможность предложенного метода, а именно, анализа двумерной функции фазовой модуляции к предоставлению информации о скорости и направлению движения рассеивающих центров.
4. Для экспериментальной проверки выдвинутых предположений и результатов численного моделирования был собран интерференционный микроскоп Маха-Цендера в режиме на отражение и вне-осевой конфигурацией опорного плеча, проведены исследования динамического фантома сосуда, подтверждена возможность использования функции двумерной фазовой модуляции волнового фронта для предоставления информации и скорости и направлении движения рассеивающих центров.
5. Проведены *in vivo* исследования кровотока коры головного мозга мыши в условиях развитой ишемии предложенным голографическим методом лазерной спекл-визуализации. Показана высокая чувствительность фазового метода к визуализации сосудов, превосходящая таковую у методов, основанных на анализе пространственно-временных свойств распределения интенсивности спекл-картины.
6. *In vivo* подтверждена возможность использование численной фокусировки в методе лазерной спекл-визуализации для коррекции положения наилучшего фокуса.
7. В заключении автор выражает благодарность и большую признательность научному руководителю Тучину В. В. за помощь в постановке задачи, обсуждении результатов и научное руководство. Также автор благодарит Синдееву О. А. за помощь в работе с образцами и фантомами, а также научных коллег Гришина О. В., Намыкина А. А. и Дьяченко А. А. за конструктивную критику отдельных пунктов работы.

Апробация работы

Основные результаты научных исследований представлены на следующих научных симпозиумах, конференциях и школах:

1. Saratov Fall meeting SFM'14 (Россия, Саратов, 2014)
2. Presenting Academic Achievements to the World 2015 (Россия, Саратов, 2015)
3. Saratov Fall meeting SFM'15 (Россия, Саратов, 2015)
4. Presenting Academic Achievements to the World 2016 (Россия, Саратов, 2016)
5. Advanced Laser Technologies ALT'16 (Ireland, Galway, 2016)

Публикации:

По результатам исследования автором было опубликовано 7 работ из них 7 в международных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК для публикации материалов кандидатских диссертаций.

1. Off-axis holographic laser speckle contrast imaging of blood vessels in tissues / A. Abdurashitov [и др.] // *Journal of biomedical optics*. — 2017. — Т. 22, № 9. — С. 091514. 9
2. Histogram analysis of laser speckle contrast image for cerebral blood flow monitoring / A. S. Abdurashitov [и др.] // *Frontiers of Optoelectronics*. — 2015. — Т. 8, № 2. — С. 187—194.
3. Abdurashitov, A. A robust model of an OCT signal in a spectral domain / A. Abdurashitov, V. Tuchin // *Laser Physics Letters*. — 2018. — Т. 15, № 8. — С. 086201.
4. Ellipticity imaging for visualizing and quantifying long and short range correlations in laser speckle data II: phantom and animal studies / A. Majumdar [и др.] // *Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics XVI*. Т. 10877. — International Society for Optics, Photonics. 2019. — С. 1087705.
5. Laser speckle imaging and wavelet analysis of cerebral blood flow associated with the opening of the blood–brain barrier by sound / O. Semyachkina-Glushkovskaya [и др.] // *Chinese Optics Letters*. — 2017. — Т. 15, № 9. — С. 090002.
6. Study of cerebral bloodflow autoregulation in rats assessed by LSCI / S. Sindeev [и др.] // *2016 International Conference Laser Optics (LO)*. — IEEE. 2016. — S2—18.
7. Hidden stage of intracranial hemorrhage in newborn rats studied with laser speckle contrast imaging and wavelets / A. N. Pavlov [и др.] // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2015. — Т. 8, № 05. — С. 1550041.