



- and aggregation of immersed blood // *Appl. Opt.* 2002. Vol. 41, № 1. P. 258–271.
10. Wang R. K., Elder J. B. Propylene glycol as a contrasting agent for optical coherence tomography to image gastrointestinal tissues // *Lasers Surg. Med.* 2002. Vol. 30. P. 201–208.
  11. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Tissue optical immersion clearing // *Expert Rev. Med. Devices.* 2010. Vol. 7, № 6. P. 825–842.
  12. Ghosn M. G., Carbajal E. F., Befruj N. A., Tellez A., Granada J. F., Larin K. V. Permeability of hyperosmotic agent in normal and atherosclerotic vascular tissues // *J. Biomed. Opt.* 2008. Vol. 13, № 1. P. 010505.
  13. Ghosn M. G., Sudheendran N., Wendt M., Glasser A., Tuchin V. V., Larin K. V. Monitoring of glucose permeability in monkey skin *in vivo* using optical coherence tomography // *J. Biophotonics.* 2010. Vol. 3, № 1–2. P. 25–33.
  14. Kirillin M., Shirmanova M., Sirotkina M., Bugrova M., Khlebtsov B., Zagaynova E. Contrasting properties of gold nanoshells and titanium dioxide nanoparticles for optical coherence tomography imaging of skin : Monte Carlo simulations and *in vivo* study // *J. Biomed. Opt.* 2009. Vol. 14, № 2. P. 021017.
  15. Zagaynova E. V., Shirmanova M. V., Kirillin M. Yu., Khlebtsov B. N., Orlova A. G., Balalaeva I. V., Sirotkina M. A., Bugrova M. L., Agrba P. D., Kamensky V. A. Contrasting properties of gold nanoparticles for optical coherence tomography: phantom, *in vivo* studies and Monte Carlo simulation // *Phys. Med. Biol.* 2008. Vol. 53. P. 4995–5009.
  16. Kim C. S., Wilder-Smith P., Ahn Y.-C., Liaw L.-H., Chen Z., Kwon Y. J. Enhanced detection of early-stage oral cancer *in vivo* by optical coherence tomography using multimodal delivery of gold nanoparticles // *J. Biomed. Opt.* 2009. Vol. 14, № 3. P. 034008.
  17. Генина Э. А., Долотов Л. Е., Терентюк Г. С., Баикатов А. Н., Маслякова Г. Н., Тучин В. В., Ярославский И. В., Альтшулер Г. Б. Фракционная лазерная микроабляция кожи для усиления ее проницаемости для наночастиц // *Квант. электроника.* 2011. Т. 41, № 5. С. 396–401.
  18. Billaud P., Huntzinger J.-R., Cottancin E., Lerme J., Pellarin M., Arnaud L., Broyer M., Del Fatti N., Valee F. Optical extinction spectroscopy of single silver nanoparticles // *Eur. Phys. J. D.* 2007. Vol. 43. P. 271–274.
  19. Попов А. П., Приезжев А. В., Ладеман Ю., Мюлльер Р. Влияние многократного рассеяния света на наночастицах диоксида титана, имплантированных в приповерхностный слой кожи, на пропускание излучения в разных диапазонах длин волн // *Квант. электроника.* 2007. Т. 37, № 1. С. 17–21.
  20. Тучин В. В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. М.: Физматлит, 2010. 488 с.
  21. URL: Refractive index database: <http://refractiveindex.info/?group=CRYSTALS&material=TiO2> (дата обращения: 28.11.2011).

УДК 535.4

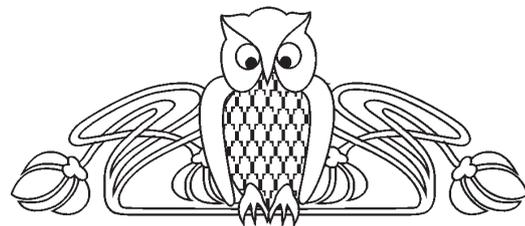
## ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ КРОВИ В ОБЛАСТИ НОГТЕВОГО ЛОЖА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ЛАЗЕРНОЙ СПЕКЛ-ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Д. Н. Агафонов, П. А. Тимошина, М. А. Виленский,  
И. В. Федосов, В. В. Тучин

Саратовский государственный университет  
E-mail: aga@optics.sgu.ru

Рассмотрена применимость метода анализа пространственного контраста лазерных спеклов для исследования параметров микроциркуляции в ногтевом ложе, а также их динамики с использованием градуировочных данных, полученных в измерениях на фантоме биоткани. С данной целью проведены исследования оптимальных условий формирования и регистрации спекл-изображений и создано программное обеспечение, реализующее адаптивный алгоритм. Данные микроскопических исследований капилляров ногтевого ложа были использованы для контроля результатов спекл-визуализации.

**Ключевые слова:** контраст лазерных спеклов, LASCA, капилляроскопия, фантом.



### The Study of Nail Bed Microcirculation by Laser Speckle-Imaging Technique

D. N. Agafonov, P. A. Timoshina, M. A. Vilensky,  
I. V. Fedosov, V. V. Tuchin

The applicability of laser speckle contrast analysis technique for study of nail bed microcirculation parameters was investigated. Parameters and their dynamics were considered using calibration data obtained with biotissue phantom. Optimal conditions of formation and registration of speckle images were discussed and program for adaptive operation and processing was presented. The data of microscopic observations of nail bed capillary network was used to verify the results of speckle visualization.

**Key words:** laser speckle contrast, LASCA, capillaroscopy, phantom.



### Введение

Мониторинг динамики микроциркуляции крови является одним из инструментов диагностики сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе связанных с наличием диабета, и сопутствующих им морфологических изменений. Обнаружение патологий гемодинамики и структуры микрокапиллярной сети может быть особенно важным при принятии медицинских решений не только на стадии диагностики, но и в процессе лечения [1–3].

В работе представлены результаты исследования капиллярного кровотока в ногтевом ложе пальца человека, проведенные с использованием метода анализа пространственного контраста лазерных спеклов (sLASCA), являющегося одним из вариантов лазерной спекл-визуализации [4, 5]. Методика анализа пространственного контраста позволяет проводить исследования нестационарных рассеивающих объектов со сложной динамикой, обладая большим разрешением по времени по сравнению с методом анализа временного контраста спекл-картины (tLASCA), где значения получают по нескольким последовательно получаемым изображениям. При этом, однако, теряется пространственное разрешение [5].

Предварительно, перед проведением *in vivo* измерений, была исследована применимость предлагаемой методики для контроля микроциркуляции в физиологических границах скоростей кровотока в капиллярной сети и определены оптимальные параметры проведения измерений. Для этих целей использовался фантом, специально созданный для моделирования оптических свойств поверхностных слоёв ткани, по каналам которого с контролируемой скоростью пропусклась взвесь частиц. Полученные при этом калибровочные данные и результаты микроскопических измерений были использованы для итоговой интерпретации и анализа данных спекл-визуализации микроциркуляции.

### Материалы и методы

При анализе пространственного контраста  $K$  расчет производится по единичному регистрируемому изображению спекл-поля по квадратной области, размер которой обычно составляет  $5 \times 5$  или  $7 \times 7$  точек [5, 6]:

$$K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} = \frac{\sqrt{\frac{1}{N^2 - 1} \sum_{i=1}^{N^2} \left( I_i - \frac{1}{N^2} \sum_{j=1}^{N^2} I_j \right)^2}}{\frac{1}{N^2} \sum_{j=1}^{N^2} I_j}, \quad (1)$$

где  $N$  – размер области расчета,  $I_i$  – яркость точек изображения.

В случае развитого спекл-поля, формирующегося при однократном рассеянии от стационарного объекта, значение контраста равно единице. Однако при получении изображений цифровым или иным способом, при конечном времени регистрации и наличии динамики рассеивающего объекта контраст уменьшается. Можно показать, что значение контраста напрямую зависит от параметров движения [7, 8]. В случае, когда рассеяние происходит на ансамбле частиц (взвеси, суспензии и т. п.), контраст будет также зависеть от оптических свойств базового вещества, частиц, их формы, размеров и характера агрегации. При этом также следует учитывать эффекты многократного рассеяния и конечность длины когерентности лазерного излучения. Таким образом, теоретический учет всех параметров, влияющих на измеряемые значения контраста, в общем случае представляется крайне сложной, либо неразрешимой задачей [8]. В связи с этим в данной работе рассмотрена возможность применения калибровки с использованием фантома.

Для проведения исследований использовалась экспериментальная установка, схема которой показана на рис. 1.

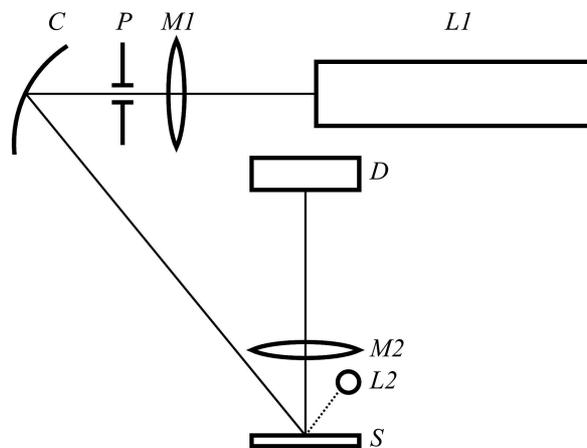


Рис. 1. Схема экспериментальной установки. В режиме спекл-визуализации: пучок излучения когерентного источника  $L1$  (He-Ne лазер ГН-5П, длина волны – 633 нм) расширялся до необходимого сечения с помощью микрообъектива  $M1$  (Ломо, 8×), диафрагмы  $P$  (10 мкм) и коллимирующего зеркала  $C$  и направлялся на исследуемый объект  $S$ . В режиме микроскопии: использовался 8-элементный светодиодный осветитель  $L2$  (центральная длина волны ~517 нм). Рассеянное излучение через микрообъектив  $M2$  (Ломо, 10×) попадало на детектор  $D$  (КМОП камера Basler A602f)

Данная установка позволяла проводить регистрацию изображений одного и того же участка образца как в когерентном свете (освещение лазером), так и при некогерентном освещении



(светодиоды) без механической перенастройки. В связи с тем, что в конечном итоге объектом исследований является кровоток, для спекл-визуализации использовался красный He-Ne лазер с длиной волны 633 нм, на которой наблюдается существенное рассеяние зондируемого излучения эритроцитами. Для микроскопических исследований применялось зелёное освещение (центральная длина волны ~517 нм), что обусловлено высоким поглощением крови в данной спектральной области и, таким образом, приводит к увеличению контрастности изображений.

Для проведения измерений и расчета контраста в среде LabVIEW 8.5 (National Instruments, США) была создана программа, позволяющая в режиме реального времени с частотой до 100 кадров в секунду регистрировать распределения интенсивности спекл-поля и рассчитывать по формуле (1) по указанной оператором области средний контраст или пространственное распределение контраста с параллельной визуализацией. Для регистрации использовалась монохромная камера Basler A602f (в режиме 8-битного цвета с 256 градациями яркости и размером кадра до 656×491 пикселей).

*Микроскопические исследования микроциркуляции ногтевого ложа*

Для получения параметров кровотока и геометрии капиллярной сети были проведены микроскопические исследования ногтевого ложа пальца руки человека. В области кутикулы были локализованы отдельные капиллярные петли, для которых путём анализа записанных видеоизображений получены геометрические размеры и скорости кровотока.

Для уменьшения рассеяния в эпидермисе и выравнивания оптической плотности тканей на поверхность кожи наносился просветляющий агент – 50%-ный водный раствор глицерина с ДМСО [9].

*Исследование применимости метода sLASCA с использованием фантома*

Фантом, использованный для моделирования микроциркуляции, имел следующую структуру: базовое вещество – эпоксидная смола с рассеивающей композицией; верхний слой каналов с диаметром 180–200 мкм располагался на глубине 230–250 мкм; на глубине 2 мм находились дополнительные каналы, моделировавшие сосуды дермы. Цифровая камера регистрировала изображения одного из каналов верхнего слоя. Кровоток моделировался пропусканием по каналам фантома взвеси частиц красного пигмента. Скорость по-

тока регулировалась с использованием дозатора лекарственных веществ MLW Lineomat, Германия.

Одним из самых важных параметров при исследованиях контраста является время регистрации спекл-картины – экспозиция. Несмотря на то что существует возможность, в известных пределах, программного управления экспозицией используемой камеры (параметр shutter speed), в реальном эксперименте имеются ограничения, не позволяющие выбирать любое доступное значение. Так, в связи с разными у различных образцов коэффициентами поглощения и рассеяния, характеристиками внутренней динамики (или в случае их временных или пространственных вариаций у одного образца), при неизменной интенсивности падающего излучения наблюдаются существенные различия в статистике регистрируемого распределения интенсивности, а следовательно, и рассчитываемом на его основе контрасте.

Автоматизированный алгоритм настройки параметров цифровой камеры, который был разработан и включен в состав используемой программы анализа контраста, позволил в некоторых пределах компенсировать указанные выше различия путем оптимального подбора усиления (gain) и яркости (brightness) при фиксированной экспозиции. Тем не менее, в случае недостаточного времени накопления или слишком большого количества света, падающего на детектор камеры за время экспозиции, статистика интенсивности регистрируемого изображения искажается вследствие частичного погружения в темновой шум или соответственно «перегрузки» светочувствительных элементов детектора.

Другим важным моментом была необходимость определить применимость метода анализа контраста для мониторинга динамики реального кровотока микрокапиллярной сети. Взяв за основу полученные ранее в микроскопических исследованиях значения скорости микроциркуляции, а также данные других авторов, авторы статьи провели исследования зависимости контраста, рассчитанного методом sLASCA, от скорости движения частиц. В качестве объекта использовался тот же фантом, по каналам которого пропускалась взвесь частиц красного красителя с объемной концентрацией около 1% и размером частиц 7–10 мкм. Скорость движения потока частиц регулировалась с использованием дозатора и устанавливалась в пределах 0–8 мм/с, чтобы покрыть все возможные физиологические значения скорости капиллярного кровотока.

Измерения контраста проводились при экспозициях камеры 5 мс и 10 мс – минимальных



значениях, при которых отсутствовали заметные искажения статистики регистрируемой интенсивности из-за недостаточности падающего на детектор излучения, рассеянного образом.

*Динамика микроциркуляции ногтевого ложа при окклюзии*

В эксперименте исследовался средний контраст спеклов в области кутикулы ногтевого ложа при контролируемой динамике микроциркуляции. Для этого рука добровольца на несколько секунд пережималась манжетой тонометра (модель Medica CS-105), вследствие чего наблюдалась блокада кровотока в капиллярах. Затем давление

в манжете быстро сбрасывали и записывали данные о контрасте как функции времени. Данные исследования проводились как с использованием просветляющего агента (50%-ный водный раствор глицерина с ДМСО), так и без него.

**Результаты и их обсуждение**

Разработанное программное обеспечение позволило провести расчет пространственного распределения контраста и оценить относительные значения скоростей в области ногтевого ложа (рис. 2, а), а также провести дальнейшие исследования применимости метода sLASCА и динамики микроциркуляции ногтевого ложа при окклюзии.

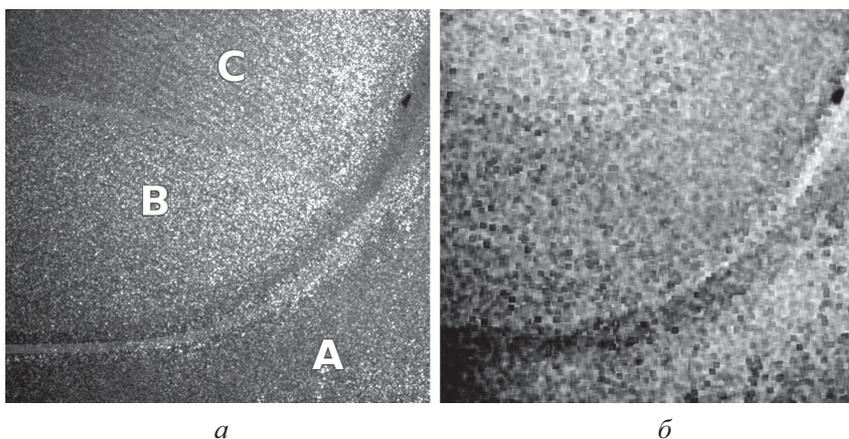


Рис. 2. Изображение ногтя пальца руки человека в когерентном свете (а) и соответствующее пространственное распределение контраста спекл-картины (б) (инвертировано : меньше контраст – ярче точка). А – область кутикулы, В – лунка, С – область ногтя

Результат работы программы – расчет пространственного распределения контраста, полученного по одному изображению спекл-картины с использованием фотообъектива Мир-1В (относительное отверстие 1:2,8, фокусное расстояние 37 мм), показан на рис. 2, б. Наблюдается заметно более высокое значение контраста в области лунки (~0.62) по сравнению с областями кутикулы и ногтя (~0.54), что объясняется фактом пониженной микроциркуляции в этой области.

Микроскопические исследования позволили получить параметры кровотока и геометрии капиллярной сети. Полученные значения хорошо согласуются с данными из других источников: ширина петли – 20–60 мкм, диаметр капилляров – 9–20 мкм, линейная скорость движения эритроцитов – до 200–300 мкм/с [3, 4]. Глубина залегания рассмотренных капиллярных петель составляла порядка 150–250 мкм. При этом использование просветляющего агента оказалось крайне важным фактором, позволившим осуществить данные измерения.

На рис. 3. приведен график зависимости контраста от экспозиции камеры в случае броуновского и быстрого упорядоченного движения рассеивателей в канале фантома. Заметно существенное падение контраста как при малых, так

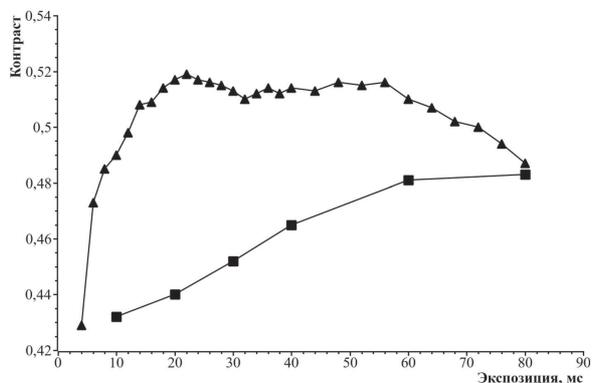


Рис. 3. Зависимость контраста спекл-картины от экспозиции камеры: ▲ – при броуновском движении рассеивателей; ■ – при движении рассеивателей в каналах фантома со скоростью 10 мм/с



и при больших значениях экспозиции, вызванное искажением статистики регистрируемой интенсивности. Данный факт говорит о необходимости внимательного выбора параметров при регистрации спекл-картины. Кроме того, видно, что наибольшее различие контраста при изменении скорости рассеивателей (большая чувствительность метода анализа контраста) находится в области малых экспозиций.

Результаты измерений, показанные на рис. 4, подтверждают указанный выше факт большей чувствительности метода при меньших экспозициях, а также показывают наибольшую зависимость контраста от скорости в области до 0.5 мм/с, т. е. именно для реальных скоростей микроциркуляции ногтевого ложа.

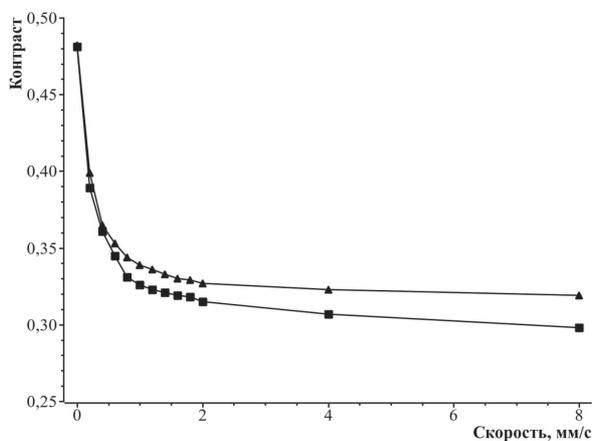


Рис. 4. Зависимость контраста от скорости упорядоченного движения рассеивателей в каналах фантома для экспозиций: ▲ – 10 мс; ■ – 5 мс. Значения для нулевой скорости фактически соответствуют скорости броуновского движения частиц

Предварительные измерения показали также, что объемная концентрация частиц в области единиц процента заметно не влияет на область наибольшей чувствительности. Однако требуются дальнейшие исследования для больших концентраций частиц, вплоть до физиологических значений гематокрита.

На рис. 5 отражены результаты измерений контраста в ногтевом ложе пальца при окклюзии и последующей релаксации. Значения контраста при блокаде кровотока ( $\sim 0.65$ ) соответствовали «нулевым» значениям скорости на градуировочной кривой (см. рис. 4). После сброса давления в манжете скорость кровотока в течение 6–8 с быстро росла (контраст падал до  $\sim 0.38$ ), а затем восстанавливался до первоначальных значений (контраст  $\sim 0.43$ ). Примечательно, что непосредственно после начала восстановления кровотока наблюдалась постокклюзионная ги-

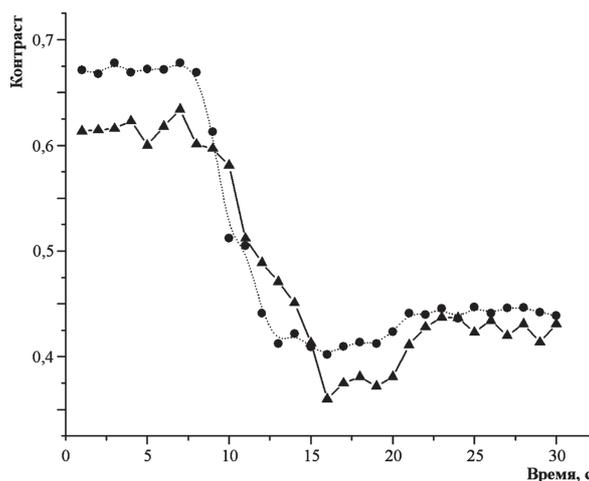


Рис. 5. Изменения значения контраста при окклюзии и последующей релаксации: ▲ – сухая кожа; ● – кожа с просветляющим агентом. Давление в манжете тонометра было сброшено на 8-й с

перемия – повышение скорости сверх средних первоначальных значений, длившаяся около 5 с ( $\sim 0.3$  мм/с), после чего кровоток постепенно стабилизировался до  $\sim 0.18$  мм/с (оценка скорости по градуировочной кривой на рис. 4).

Использование просветляющего агента в данном эксперименте не дало ожидаемого заметного повышения чувствительности [10], так как наблюдаемые отношения скоростей микроциркуляции во время и после блокады кровотока примерно равны. Тем не менее, полученная иммерсия в поверхностном роговом слое кожи существенно снизило эффекты рассеяния на поверхности, приводящие к дополнительному снижению контраста. Это повысило точность оценки абсолютных значений скорости кровотока, однако требуются дальнейшие исследования влияния различных факторов на возможность точного измерения абсолютных значений скорости кровотока методом анализа контраста.

Таким образом, в данной работе показана возможность исследования динамики микроциркуляции в ногтевом ложе пальца человека с использованием метода анализа пространственного контраста лазерных спеклов и градуировочных данных, полученных при измерениях на фантоме. Показаны некоторые ограничения и техники, влияющие на применимость и точность рассматриваемого метода.

#### Благодарности

Фантом для исследований предоставлен Научно-образовательным институтом оптики и биофотоники. Авторы выражают особую благо-



дарность группе разработчиков: В. В. Лычагову, Э. А. Гениной, А. Н. Башкатову и В. И. Кочубею.

Исследование проведено при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 09-02-01048-а, 224014), Седьмой рамочной программы Комиссии Европейского Союза в области технических и естественных наук (грант № 224014 PHOTONICS4LIFE of FP7-ICT-2007-2), Министерства образования и науки РФ (проекты № 1.4.09; 2.1.1/4989; 2.2.1.1/2950 и госконтракты № 02.740.11.0484; 02.740.11.0770; 02.740.11.0879).

### Список литературы

1. *Hern S., Mortimer P. S.* Visualization of dermal blood vessels – capillaroscopy // *Clin. Exp. Dermatol.* 1999. Vol. 24. P. 473–478.
2. *Виленский М. А., Агафонов Д. Н., Зимняков Д. А., Тучин В. В., Здражевский Р. А.* Спекл-корреляционный анализ микрокапиллярного кровотока ногтевого ложа // *Квант. электроника.* 2011. Т. 41, № 4. С. 324–328.
3. *Bukhari M., Herrick A. L., Moore T., Manning J., Jayson M. I. V.* Increased nailfold capillary dimensions in primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis // *Br. J. Rheum.* 1996. Vol. 35. P. 1127–1131.
4. *Briers J. D., Webster S.* Laser speckle contrast analysis (LASCA) : a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow // *J. Biomed. Opt.* 1996. Vol. 1. P. 174–179.
5. *Luo Q., Qiu J., Li P.* Blood flow cytometry and cell aggregation study with laser speckle // *Advanced optical flow cytometry : methods and disease diagnoses / ed. V. V. Tuchin.* Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. 734 p.
6. *Briers J.D.* Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging // *Physiol. Meas.* 2001. Vol. 22. P. R35–R66.
7. *Boas D.A., Dunn A.K.* Laser speckle contrast imaging in biomedical optics // *J. Biomed. Opt.* 2010. Vol. 15(1). P. 011109.
8. *Duncan D.D., Kirkpatrick S.J.* Can laser speckle flowmetry be made a quantitative tool? // *J. Opt. Soc. Amer. A : Opt. Image Sci. Vis.* 2008. Vol. 25(8). P. 2088–2094.
9. *Tuchin V. V.* Optical Clearing of Tissues and Blood. Bellingham : SPIE Press, 2006. 254 p.
10. *Zhu D., Wang J., Zhi Z., Wen X., Luo Q.* Imaging dermal blood flow through the intact rat skin with an optical clearing method // *J. Biomed. Opt.* 2010. Vol. 15. P. 026008.

УДК 535.417: 616.379-008.64

## ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА «ЭРИТРОЦИТ – ПЛАЗМА» НАТИВНОГО МАЗКА КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПОЛНОПОЛЬНОЙ МИКРОИНТЕРФЕРОМЕТРИИ В БЕЛОМ СВЕТЕ



А. Л. Кальянов, Л. И. Малинова\*, Е. В. Боголюбова,  
И. В. Смирнов, В. В. Лычагов, В. П. Рябухо

Саратовский государственный университет  
E-mail: kalyanoval@yandex.ru

\*ФГУ «Саратовский научно-исследовательский институт кардиологии»  
Министерства здравоохранения и социального развития РФ  
E-mail: sarniik@yandex.ru

В работе представлены результаты исследования морфофункциональных свойств эритроцитов пациентов с ишемической болезнью сердца в нативном мазке крови методом полнополевой микроинтерферометрии в белом свете. Получены трехмерные изображения и профили поверхности комплекса «отдельно расположенный эритроцит – окружающая плазма крови». Сопоставлена динамика угла наклона плазмы крови вблизи отдельно расположенного эритроцита во времени в процессе внутривенной стандартизированной нагрузки глюкозой у больных ишемической болезнью сердца и ишемической болезнью сердца, ассоциированной с сахарным диабетом.

**Ключевые слова:** низкокогерентная интерферометрия, полнополевая интерферометрия, интерференционная микроскопия, морфофункциональные свойства эритроцитов, перфузия, ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет.

### Investigation of «Erythrocyte – Plasma» Complex in Native Human Blood Slide Using White-Light Full-Field Microinterferometry

A. L. Kalyanov, L. I. Malinova, E. V. Bogolyubova,  
I. V. Smirnov, V. V. Lychagov, V. P. Ryabukho

Morphofunctional properties of erythrocytes in native blood slide of coronary heart disease patients are investigated using white light full-field microinterferometry. Three dimensional images and surface profiles of complex «single RBC – surrounding blood plasma» are shown. Dynamic of slope angle of the plasma near the RBC during standardized intravenous glucose load is explored. The dynamic of patients with coronary heart disease is compared with one of patients with coronary heart disease and diabetes mellitus.