

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего  
профессионального образования  
«Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

На правах рукописи



Абдурашитов Аркадий Сергеевич

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

Специальность 1.5.2—Биофизика

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:  
проф., д.ф.-м.н.  
Тучин Валерий Викторович

Саратов — 2021

## Оглавление

Введение.....	5
<b>Глава 1. Лазерная спекл-визуализация патологических сосудистых состояний .....</b>	<b>20</b>
1.1    Постановка задачи.....	20
1.2    Пространственно-временной спекл-контраст как мера скорости движения кровотоков и лимфо-токов .....	21
1.3    Применение метода лазерной спекл-визуализации для прижизненной характеристики кровотоков и лимфо-токов в различных биологических тканях при патологических сосудистых состояниях .....	24
<b>Глава 2. Теоретическая модель формирования сигнала лазерной спекл-визуализации в цифровом голографическом микроскопе с вне-осевой конфигурацией опорного поля .....</b>	<b>26</b>
1.1    Постановка задачи.....	26
2.2    Принципы формирования сигнала в методе лазерной спекл-визуализации.....	27
2.2.1 Поперечное перемещение форменных элементов .....	29
2.2.2 Продольное перемещение форменных элементов .....	30
2.3    Формирование оптического изображения рассеивающего объекта в когерентном свете .....	31
2.3    Регистрация волнового фронта на матричный фотоприемник в голографическом микроскопе с вне-осевой конфигурацией опорного поля ...	36
2.3.1 Эффекты дискретизации и квантования при регистрации распределения интенсивности на матричный фотоприемник.....	41
2.4    Выводы.....	43

<b>Глава 3. Метод количественной оценки средней скорости движения рассеивающих центров путем анализа временной динамики функции фазовой модуляции предметного волнового фронта.....</b>	<b>45</b>
3.1 Постановка задачи.....	45
3.2 Численное моделирование сигнала лазерной спекл-визуализации от сосуда с параболическим распределением скоростей.....	46
3.3 Функция распределения разности фаз между двумя реализациями спекл-картины разделенных промежутком времени.....	53
3.4 Зависимость сигнала лазерной спекл-контрастной визуализации от фокусировки оптической системы.....	60
3.5 Выводы.....	65
<b>Глава 4. Реализация голографического метода лазерной спекл-визуализации, апробация предложенного метода оценки направления и скорости на фантомных экспериментах и <i>in vivo</i> исследованиях церебрального кровотока у новорожденных гипертензивных крыс в условиях развития инсульта.....</b>	<b>68</b>
4.1 Постановка задачи.....	68
4.2 Экспериментальная установка.....	70
4.3 Экспериментальное применение численной фокусировки в методе лазерной спекл-визуализации при оценке функционального состояния церебральных сосудов.....	75
4.4 <i>In vivo</i> исследования церебрального кровотока методами голографической лазерной спекл-визуализации в условиях развития инсульта у гипертензивных крыс.....	80
4.5 <i>Invivo</i> исследования реакции церебрального кровотока методами голографической лазерной спекл-визуализации при нарушениях в функционировании гематоэнцефалического барьера.....	84

4.6	Детальное исследование микроциркуляционной компоненты скорости мозгового кровотока, в условиях открытия гематоэнцефалического барьера методами анализа затухания автокорреляционной функции комплексного сигнала лазерной спекл-визуализации.....	87
4.7	Выводы.....	89
<b>Заключение.....</b>		<b>94</b>
<b>Список литературы.....</b>		<b>99</b>
<b>Приложение А.....</b>		<b>116</b>

## Введение

Современная биофизика, в частности ее методы и объекты исследования, должны отвечать социально-значимым проблемам, возникающим в современном обществе.

Неонатальный инсульт является одной из самых распространенных причин смерти у новорожденных (смертность 25%). [1]. В последние годы статистика показывает, что в 95% случаев инсульт случается у людей старше 45 лет и более 50% приходится на людей в возрасте свыше 65 лет [2]. Однако, в силу развития современных методик ранней диагностики и визуализации, стало очевидно, что инсульту подвержены и новорожденные, причем процент встречаемости схож с таковым у взрослых. [3—5].

Неонатальному инсульту, в среднем, подвержен каждый тысячный новорожденный ребенок [4; 6], причем, согласно статистике, заболеваемость среди недоношенных младенцев (то есть детей, родившихся раньше положенного срока и с дефицитом массы тела (до 1500 грамм)), снизилась на 45% [7]. Однако истинная картина остается неясной в силу того, что неонатальный инсульт чаще всего протекает без какой-либо внешней симптоматики или неврологических признаков [4; 8; 9].

Долгосрочные клинические наблюдения, проводившиеся за диагностированными младенцами, говорят о том, что у таких детей в 50% случаях наблюдаются серьезные когнитивные расстройства, а 75% таких детей требуют особого ухода и инклюзивного подхода в школах [10—13].

Неонатальный инсульт у новорожденных в 50% случаях геморрагический, то есть характеризующийся разрывами кровеносных сосудов и выбросом объема крови во внутримозговое пространство. Основным фактором развития

неонатального геморрагического инсульта (НГИ) принято считать стресс, который испытывают новорожденные дети при процессе рождения и адаптации к новому, окружающему их миру. Первые три дня после родов являются самыми опасными, так как по статистике до 50% смертей новорожденных случаются именно в этот период [14; 15].

Таким образом, неонатальный инсульт является одной из основных проблем здоровья будущих поколений, в связи с высоким уровнем смертности и тяжестью когнитивных расстройств.

Наличие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) существенно осложняет адресную доставку действующих фармакологических веществ для терапии и снижения тяжести последствий нарушения мозгового кровообращения. ГЭБ является в высокой степени селективной преградой, которая контролирует прохождение передаваемых через кровоснабжение веществ, тем самым защищая мозговые ткани от патогенов. В начале 40-ых годов 20-ого столетия исследования, выполненные *ex vivo* с использованием красителей прижизненного окрашивания, которые проникают через ГЭБ, показали, что с анатомической точки зрения ГЭБ образован эндотелиальными клетками стенок капилляров, кончиками астроцитов, покрывающими капилляр, и перицитами, встроенными в базальную мембрану капилляров. ГЭБ позволяет проходить некоторым молекулам путем пассивной диффузии, а также избирательно и активно переносить различные питательные вещества, ионы, органические анионы и макромолекулы, такие как глюкоза, вода и аминокислоты, которые имеют решающее значение для нормального функционирования нейронов. Эта проблема была хорошо изучена Броманом [16] и Фридменом [17], а результаты были подтверждены современными исследованиями [18].

Контроль функционирования ГЭБ полностью осуществляется мозговым кровообращением, в частности астроциты обеспечивают клеточную связь между нейронными цепями и кровеносными сосудами. Это нервно-сосудистое

соединение позволяет астроцитам передавать сигналы, которые регулируют кровоток в ответ на нейронную активность. Это включает регулирование сокращения/расширения гладкомышечных клеток сосудов, окружающих артериолы, а также перицитов, окружающих капилляры. Абсолютные величины скорости кровотока в паренхиме, в месте локализации гематоэнцефалического барьера, превышают более чем в 100 раз аналогичные показатели в хороидном сплетении, где локализуется хороидный проницаемый барьер [19]. Таким образом, высокие показатели церебрального кровообращения связаны с необходимостью постоянного контроля нормального функционирования ГЭБ. Церебральная циркуляция поддерживает стабильное и уникальное внеклеточное пространство в пределах нейро-сосудистого узла. Клинические и лабораторные исследования позволяют выдвинуть гипотезу о нарушении функций ГЭБ в присутствии патологических сосудистых состояний головного мозга, таких как ишемия, инсульт, рак, различного рода механические травмы, напрямую вызывающие сбои в функционировании нейро-сосудистых узлов, а также длительные нарушения активности нейронов [20—24].

Несмотря на все больший объем доказательств существенного влияния мозгового кровообращения на нормальное функционирование ГЭБ, имеет место ограниченный набор данных и исследований, затрагивающих тематику изменения мозгового кровообращения в условиях абнормального функционирования ГЭБ.

На сегодняшний день золотыми стандартами для структурных и функциональных оценок кровеносных сосудов являются методики ультразвуковой диагностики (УЗИ), магнитно-резонансной (МРТ) и позитронно-эмиссионной (ПЭТ) томографий. Несмотря на широкую распространенность данных методик они не лишены недостатков, к которым можно отнести недостаточное пространственное и временное разрешение для визуализации капиллярных сетей, существенная дороговизна оборудования и расходных материалов, использование радиоактивных элементов (ПЭТ).

Оптические методики, такие как оптическая когерентная томография, лазерная спекл-контрастная визуализация, также их модификации и комбинации, позволяющие оценивать как различные параметры кровотока, так и уровень оксигенации участка ткани превосходят вышеуказанные методы как в пространственном, так и во временном разрешении, что дает существенное преимущество в не инвазивной структурной и функциональной визуализации капиллярных сосудистых сетей.

Развитие и оптимизация методик лазерной спекл-визуализации для исследования механизмов, лежащих в основе скрытого протекания неонатального инсульта, процессов, приведших к патологическому состоянию, а также оценка изменений мозгового кровообращения на фоне нарушений в работе ГЭБ является актуальной и абсолютно необходимой задачей современной биофизики и оптики.

Работа методов лазерной спекл-визуализации основана на анализе переменных во времени и пространстве спекл-структур, зарегистрированных на матричном фотоприемнике с конечным временем экспозиции [25; 26].

При взаимодействии высоко-когерентного лазерного излучения с объектом, имеющим статические или динамические микро-неоднородности, его изображение, сформированное оптической системой, будет иметь пространственно-временную модуляцию - спеклы (англ. *speckles*). Спекл-структуры, сформированные оптической системой, принято называть субъективными, так как их размерные характеристики определяются 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, первая из которых заключается в регистрации субъективных спекл-структур на матричном фотоприемнике со временем экспозиции много большим, чем период временной модуляции интенсивности спекл-картин [27—33]. 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 мгновенных реализаций спекл-картин, что приводит к их локальному «размытию» в местах наличия динамических рассеивателей, например, форменных элементов крови или лимфы. Такой эффект принято называть локальным снижением спекл-контраста. Численный анализ его пространственного распределения позволяет получать информацию о скорости движения кровотока или лимфотока. Вторым способом регистрации оперируют 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 [34—40]. Такой подход схож по своей сути с Доплеровскими методиками измерения скорости частиц в потоке [41].

Лазерная спекл-визуализация (ЛСВ) обладает рядом особенностей: простота аппаратной части, полнопольный характер измерений, тривиальные алгоритмы обработки экспериментальных данных. Данные качества делают методику ЛСВ идеально подходящей для прижизненной характеристики динамических биологических систем (скорости кровотока или лимфотока) [27; 29; 34; 35; 42—56]. Однако, данный метод не лишен недостатков, к которым можно отнести поверхностный характер измерений, из-за сравнительно небольшой глубины проникновения фотонов в биоткань, отсутствие селекции сигнала по глубине объекта, нетривиальная интерпретация измеряемых параметров, а именно, переход от качественных к количественным оценкам скорости, связанная с существенной зависимостью сигнала ЛСВ от внешних факторов, продиктованных экспериментальными условиями [57].

Наибольшую сложность для анализа представляет сигнал ЛСВ, сформированный многократно рассеянным светом [58], то есть несущим в себе

информацию об относительной скорости движения центров рассеяния, например, форменных элементов крови или лимфы, 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 [59—61] для увеличения глубины проникновения света в биоткань, а также 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 резко-изображаемого пространства объектива, а не рассеивающими/поглощающими свойствами объекта. При таких условиях наблюдения 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 регистрации сигнала, позволяющую в численном виде восстановить амплитуду и фазу волнового фронта, сформированного при отражении света от объекта исследования, что в свою очередь позволяет производить численную фокусировку волнового фронта, а также коррекцию некоторых aberrаций.

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 также методов автоматического анализа получаемых результатов.

Разработка новых методов регистрации изображений в системе ЛСВ, основанных на принципах цифровой голографической микроскопии, а также 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 в условиях различных патологий, в частности при неонатальном инсульте и его ранней диагностике.

**Степень разработанности темы исследования.** На момент написания диссертации существовало большое количество работ, посвященных как теоретическим исследованиям формирования сигнала в методе ЛСВ [25; 57; 62—66], так и практическим аспектам применения метода ЛСВ для прижизненной характеристики функционального состояния сосудов в условиях патологических состояний [29; 67—72], проблемам фокусировки [73—75] и статистической обработки сигнала [76—80]. Это создает базу для дальнейших глубоких и полных методологических исследований новых подходов к регистрации сигнала ЛСВ и его анализа.

**Целью** данной работы является развитие и разработка новых методологических основ лазерной спекл-визуализации, в том числе основанных на принципах цифровой голографической регистрации и специальной статистической обработки сигнала от сосудов с произвольным профилем скорости и концентрацией форменных элементов крови или лимфы.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. 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.
2. Исследовать зависимость двумерной функции фазовой модуляции предметного волнового фронта, восстановленной из комплексного сигнала ЛСВ от профиля скорости и концентрации форменных элементов.
3. Установить возможность вычисления средней скорости движения рассеивающих центров и направления их движения по статистическим свойствам двумерной функции фазовой модуляции предметного волнового фронта.
4. Экспериментально подтвердить правильность теоретических выводов и работоспособность предложенной модернизации метода ЛСВ на фантомных экспериментах.
5. Провести *in vivo* исследования кровотока в условиях развития патологического сосудистого состояния — инсульта, для валидации предложенного метода, к предоставлению новой диагностической и экспериментальной информации о скрытых механизмах формирования и протекания неонатального инсульта.

**Научная новизна:**

1. Предложена новая, упрощенная модель формирования субъективной спекл-структуры от сосуда, учитывающая профиль скорости движения форменных элементов крови или лимфы, их концентрацию и пространственное распределение.
2. 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.

3. С использованием предложенного метода впервые экспериментально была показана возможность восстановления средней скорости движения форменных элементов крови, а также направления потока в методе ЛСВ.
4. Проведены *in vivo* экспериментальные исследования по визуализации микрососудистой системы коры головного мозга крысы в условиях развития стресс-индуцированного инсульта предложенным методом цифровой голографической лазерной спекл-визуализации.

**Практическая значимость.** Предложенная теоретическая модель, описывающая формирование сигнала ЛСВ при произвольных параметрах профиля распределения скорости по сечению сосуда, а также концентрации движущихся форменных элементов крови, является в достаточной степени простым и ясным инструментом для анализа динамических характеристик спекл-структур.

С помощью предложенной модели был продемонстрирован новый 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, позволяющий получать количественные данные о скорости и направлении движения форменных элементов крови или лимфы.

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 цифровая голографическая схема регистрации спекл-структур, позволяющая восстанавливать комплексную амплитуду волнового фронта предметного канала, с использованием минимального набора опто-механических элементов, которая, в силу своей компактности и модальности, может быть интегрирована в уже существующие биомедицинские микроскопы общего

назначения для расширения их функциональных возможностей, или использоваться как портативный, самодостаточный измерительный комплекс.

Предложенным методом было проведено исследование гемодинамики у новорожденных крыс в условиях развития стресс-индуцированного инсульта, выявлены существенные изменения в венозном кровотоке на ранних стадиях развития патологии.

**Методология и методы исследования.** Для построения теоретической модели использовались положения Фурье-оптики и представление углового спектра волнового фронта. Для исследования методов голографической ЛСВ использовались математические выражения, полученные в рамках предлагаемой теории, согласно которым производилось численное моделирование.

Для проверки правильности предложенной теоретической модели формирования сигнала в методе ЛСВ, сделанных выводов и предложенных методов, проводились исследования на фантомах и мелких животных *in vivo*.

*In vivo* исследования проводились на трех группах новорожденных крыс. Контрольная (n=10), пред-инсультная (n=15), пост-инсультная (n=12). Инсульт у лабораторных крыс моделировался путем применения запатентованной методики звукового воздействия высокой интенсивности. Все манипуляции, осуществляемые над животными, были выполнены в рамках протокола этической комиссии о гуманном использовании лабораторных животных [81]. Экспериментальный протокол был одобрен этической комиссией по использованию лабораторных животных СГУ имени Н. Г. Чернышевского (протоколы № 1,8,11 и 12 от 07.02.2017 года).

## **Основные результаты и положения, выносимые на защиту:**

1. Теоретическая модель формирования аналитического сигнала лазерной спекл-визуализации, учитывающая объемную концентрацию и произвольный профиль скорости движения форменных элементов крови.
2. Метод цифровой голографической лазерной спекл-визуализации для *in vivo* исследований церебрального кровотока.
3. Скорость и направление движения кровотока в условиях отсутствия свертывания фазы можно определить по двумерной фазовой компоненте комплексного сигнала лазерной спекл-визуализации
4. Падение венозной компоненты церебрального кровотока в первые сутки развития неонатального инсульта, полученное из сигнала лазерной спекл-визуализации, сопровождается нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера, у лабораторных крыс

**Достоверность** полученных результатов обеспечивается корректностью теоретических рассуждений. Выводы, следующие из математических выражений, полученных в рамках рассматриваемой модели, согласуются с результатами измерений на фантомах и *in vivo*, а также находятся в соответствии с результатами, полученными другими научными группами.

**Апробация работы.** Основные результаты работы докладывались на:

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)
6. Saratov Fall meeting SFM'17 (Россия, Саратов, 2017)
7. Saratov Fall meeting SFM'18 (Россия, Саратов, 2018)
8. Saratov Fall meeting SFM'19 (Россия, Саратов, 2019)

Исследования по теме диссертации производились при частичной поддержке грантов:

1. Российского научного фонда №17-75-20069, №16-15-10252, №14-15-0028, №17-15-01263
2. Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ РФ НШ-7898.2016.2
3. Министерства высшего образования и науки 17.1223.2017.Pch
4. НИР «Разработка научно-технических основ диагностики основных социально-значимых заболеваний с использованием методов



молекулярного имиджинга и машинного обучения» ( НУ 8.1.43.2018 Л ), Междисциплинарная лаборатория по биофотонике, Национальный исследовательский Томский государственный университет, Программа государственной поддержки ведущих университетов Российской Федерации в целях повышения их конкурентной способности среди ведущих мировых научно-образовательных центров (5-100).

Стажировка соискателя в летней школе биофотоники BIGGS'16, проходившая в Национальном университете Ирландии, была финансово поддержана грантами РФФИ №16-15-10252 и НШ-7898.2016.2

**Личный вклад** соискателя заключается в обсуждении и решении задач, поставленных перед ним научным руководителем д.ф.м.-н. Тучиным В. В. Соискателем была проведена самостоятельная работа по описанию процесса формирования сигнала лазерной спекл-визуализации от сосуда с произвольными параметрами профиля скорости и концентрацией форменных элементов, выводу математических выражений, а также разработке программного обеспечения для численного моделирования сигнала лазерной спекл-визуализации. Соискателем была проведена работа по сборке экспериментальной системы голографической лазерной спекл-визуализации для проведения фантомных и *in vivo* исследований, подтверждающих правильность выводов, следующих из предложенной модели.

Основные результаты по теме диссертации изложены в 10 печатных изданиях, все из которых изданы в журналах, рекомендованных ВАК.

### Публикации автора по теме диссертации

1. Off-axis holographic laser speckle contrast imaging of blood vessels in tissues / A. Abdurashitov [идр.] // Journal of Biomedical Optics. — 2017. — Т. 22, № 9. — С. 091514.
2. 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.
3. Histogram analysis of laser speckle contrast image for cerebral blood flow monitoring / A. S. Abdurashitov [идр.] // Frontiers of Optoelectronics. — 2015. — Т. 8, № 2. — С. 187—194.
4. Optical monitoring of stress-related changes in the brain tissues and vessels associated with hemorrhagic stroke in newborn rats / O. Semyachkina-Glushkovskaya [идр.] // Biomedical Optics Express. — 2015. — Т. 6, № 10. — С. 4088—4097.
5. Hidden stage of intracranial hemorrhage in newborn rats studied with laser speckle contrast imaging and wavelets / A. N. Pavlov [идр.] // Journal of Innovative Optical Health Sciences. — 2015. — Т. 8, № 05. — С. 1550041.
6. Changes in the cerebral blood flow in newborn rats assessed by LSCI and DOCT before and after the hemorrhagic stroke / O. Semyachkina-Glushkovskaya [идр.] // Optical Techniques in Neurosurgery, Neurophotonics, and Optogenetics II. Т. 9305. — International Society for Optics, Photonics. 2015. — С. 93051D.
7. Cerebral venous circulatory disturbance as an informative prognostic marker for neonatal hemorrhagic stroke / O. Semyachkina-Glushkovskaya [идр.] // Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care V. Т. 9887. — International Society for Optics, Photonics. 2016. — С. 98872I.
8. 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.
9. Abdurashitov, A. Photodynamic therapy of brain tumors and novel optical coherence tomography strategies for in vivo monitoring of cerebral fluid dynamics / A. Abdurashitov, V. Tuchin, Semyachkina-Glushkovskaya // Journal of Innovative Optical Health Sciences. — 2019. — Т. 13, No 2. — с. 2030004.
10. Effect of a Controlled Release of Epinephrine Hydrochloride from PLGA Microchamber Array: In Vivo Studies / O. A. Sindeeva [и др.] // ACS applied materials & interfaces. — 2018. — Т. 10, No 44. — с. 37855—37864.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и одного приложения. Полный объём диссертации составляет 119 страниц, включая 34 рисунка и 2 таблицы. Список литературы содержит 166 наименований.

## **Глава 1. Лазерная спекл-визуализация патологических сосудистых состояний**

### **1.1 Постановка задачи**

Оптические методы находят свое активное применение при диагностике и терапии широкого спектра патологических состояний, вызванных нарушением нормального тонуса и функционирования сосудистых сетей.

Бесконтактные методики, основанные на эффектах взаимодействия электромагнитных колебаний, в видимом и других диапазонах спектра, с веществом, получили свое широкое распространение при измерении функциональных параметров лимфо- и кровотоков благодаря уникальным свойствам — высокому пространственному и временному разрешению, неинвазивности, безопасности. Одним из таких методов, получившим бурное развитие с внедрением новых устройств для регистрации световых колебаний — прибор с зарядовой связью (ПЗС-матрица), является метод лазерной спекл-визуализации, который в настоящее время занимает одну из лидирующих позиций в диагностике и контроле лечения широкого ряда заболеваний.

В главе 1 представлен обзор метода лазерной спекл-визуализации, а также даны основные биофизические проблемы и задачи, в решении которых применяется данный оптический способ.

## 1.2 Пространственно-временной спекл-контраст как мера скорости движения кровотоков и лимфо-токов

Во введении кратко был изложен процесс формирования субъективной спекл-картины при рассеянии когерентного лазерного излучения на динамическом, неоднородном объекте, например, участке биологической ткани или сосуде. Уместно будет подробнее остановиться на общепринятых алгоритмах анализа сигнала лазерной спекл-визуализации и его связи с количественными характеристиками кровотоков и лимфо-токов.

Спекл-контраст обычно определяется как отношение среднеквадратичного отклонения флуктуаций интенсивности спекл-картины к среднему значению этих флуктуаций в некоторой локальной области изображения объекта [25]:

$$K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle}. \quad (1.1)$$

Для того, чтобы иметь представление о скорости движения форменных элементов, требуется математический формализм, который связывал бы скорость движения, функцию флуктуаций интенсивности спекл-картины во времени и время регистрации изображения (экспозиция матричного фотоприемника) в одном уравнении.

Пионерами в вопросе вывода математического формализма стали Ферчер и Брайерс. В 1981 году они опубликовали работу, в которой изложили математические формулы, связывающие спекл-контраст со временем экспозиции матричного фотоприемника [27]. За основу была взята формула, выведенная Гудманом в 1965 году [25], соединившая в себе вариабельность флуктуаций усредненного по времени спекл-поля и временную статистику этих флуктуаций:

$$\sigma_s^2(T) = \frac{2}{T} \left( 1 - \frac{\tau}{T} \right) C_t^{(2)}(\tau) d\tau, \quad (1.2)$$

где  $\sigma_s^2(T)$  — вариация пространственного распределения интенсивности спекл-

картины, усредненной за время экспозиции  $T$ ,  $C_I^{(2)}$  — автоковариационная функция флуктуаций интенсивности спекл-картины, которая напрямую зависит от распределения скоростей движения форменных элементов, то есть от кумулятивного Доплеровского эффекта при рассеянии света на движущихся частицах.

В предположении Лоренцевского распределения скоростей формулы (1.1) и (1.2) становятся взаимосвязанными следующим соотношением:

$$K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} = \sqrt{\beta \left\{ \frac{\tau}{T} + \frac{\tau^2}{2T^2} \left[ \exp\left(\frac{-2T}{\tau}\right) \right] - 1 \right\}}, \quad (1.3)$$

где  $\beta$  — аппаратно зависящая константа, включающая в себя:

1. Соотношение размера субъективного спекла к размеру пикселя матричного фотоприемника.
2. Долю фотонов, испытавших Доплеровский сдвиг частоты.
3. Степень поляризованности вторичных источников оптических колебаний.
4. Длину временной когерентности источника излучения.

Таким образом, соотношение (1.3) устанавливает строгую математическую связь между значениями спекл-контраста и характерным временем декорреляции спекл-картины при известных параметрах эксперимента. Распределение форменных элементов крови или лимфы по скоростям не обязательно должно подчиняться Лоренцевскому, распределение любой формы может быть подставлено в уравнение (1.2) и вид зависимости спекл-контраста от времени декорреляции может быть получен аналитически или численно.

Существуют два основных подхода к анализу спекл-изображений. Это временной и пространственный алгоритм подсчета спекл-контраста. В первом случае пространственное распределение спекл-контраста рассчитывается по одной спекл-картине путем применения формулы (1.1) в скользящем окне, типичные размеры которого составляют  $5 \times 5$  или  $7 \times 7$  пикселей. Размер

скользящего окна подбирается исходя из размера субъективного спекла. Общепринятым является задавать размер скользящего окна большим или равным среднему размеру спекла, что обеспечивает сохранение пространственного разрешения. При подсчете временного распределения спекл-контраста, вычисления проводятся по тем же формулам, только вместо подсчета спекл-контраста внутри одного кадра происходит анализ функции флуктуации интенсивности спекла во времени. Второй метод, в общем случае является предпочтительным, в силу его общности и возможности обработки экспериментальных данных различными алгоритмами, включая алгоритм оценки пространственного спекл-контраста (для этого необходимо лишь усреднить несколько последовательных реализаций спекл-картин, для достижения локального снижения контраста спеклов). Другие методы лазерной спекл-визуализации являются производными этих двух протоколов.

Уместным будет перечислить все основные методы характеристики кровотоков и лимфо-токов при помощи анализа пространственно-временных свойств спекл-картины [30]:

1. LASCA (анг. laser speckle contrast analysis). Пространственное распределение спекл-контраста оценивается внутри одного изображения в скользящем окне [42; 82].
2. LSI (анг. laser speckle imaging). Происходит оценка статистических свойств функции флуктуаций интенсивности в каждом пикселе изображения по выборке, состоящей из конечного набора спекл-картин [34; 83].
3. DESP (анг. double exposure speckle photography). Метод регистрации двух спекл-полей, разделенных малым промежутком временем на фотопластинку. Сформированные при этом интерференционные полосы несут в себе информацию о скорости движения [84].
4. SESP (анг. single exposure speckle photography) [27]. Пионерское исследование возможности оценки скорости движения путем анализа

пространственной структуры зарегистрированного спекл-поля. На сегодняшний день полностью вытеснен методом LASCA.

5. LSPI (анг. laser speckle perfusion imaging). Метод, сочетающий в себе как оценку пространственного, так и временного спекл-контраста [85; 86].
6. MESI (анг. multi-exposure speckle imaging). Метод анализа функции распределения пространственного спекл-контраста в выборке спекл-картин, зарегистрированных с различным временем экспозиции. Ключевой особенностью метода является фиксация физического времени выдержки сенсора, контроль экспозиции осуществляется опосредованно, управлением длительностью лазерного импульса. Стоит обратить внимание, что на коротких длительностях лазерных импульсов происходит потеря когерентных свойств лазерного излучения, что неизбежно приведет к снижению контраста спеклов, вызванное изменением когерентных свойств излучения [87].

Выбор метода зависит от конкретных задач и аппаратной базы, которой располагает научная группа.

### **1.3 Применение метода лазерной спекл-визуализации для прижизненной характеристики крово- и лимфо- токов в различных биологических тканях при патологических сосудистых состояниях**

В силу оптической прозрачности внутриглазной жидкости первые работы, связанные с применением метода лазерной спекл-визуализации к исследованию функционального состояния сосудов были выполнены на сетчатке глаза [27], заключающиеся в оценке влияния различных фармакологических агентов на кровотоки [88; 89] и исследовании сосудистых сеток вокруг глазного нерва [90].

В дальнейшем метод получил свое широкое распространение при визуализации био-тканей, имеющих сильные рассеивающие свойства, таких как кожа. Состояние кожных кровеносных сосудов является одним из важных факторов при



диагностике целого ряда патологических состояний. Лазерная спекл-визуализация применяется в качестве инструмента для контроля лазерной терапии пламенеющего невуса [91], оценке склеротических состояний [92], а также характеристики кожной эндотелиальной активности [93] и интегральной перфузии [86].

Обширное распространение методы лазерной спекл-визуализации получили в сфере мониторинга мозгового кровотока в условиях функциональной пробы [52; 94—96] или патологических состояний, таких как ишемия или инсульт [43; 46; 54; 97—102].

Перспективным является применение методик лазерной спекл-визуализации при мониторинге реакции кровотока на контролируемое высвобождение активных веществ из микро-капсул [103] и оценке распределения действующего вещества в био-тканях [104].

Методы лазерной спекл-визуализации не ограничиваются изучением кровотока, с их помощью активно проводятся исследования волн-деполяризации, распространяющихся в коре головного мозга [43], а также динамики роста бактериальных колоний [105].

Отдельно стоит выделить направление качественной характеристики лимфатической системы [106—108]. В силу малой объемной концентрации форменных элементов лимфы, полезный сигнал лазерной спекл-визуализации формируется конечным числом центров рассеяния [109], что требует производить регистрацию сигнала лазерной спекл-визуализации с достаточно большой выдержкой матричного фотоприемника [55].

Простота аппаратного комплекса лазерной спекл-визуализации позволяет успешно сочетать данный оптический способ с другими методиками, такими как спектроскопия на отражение [52] и флуоресцентная визуализация НАДН и флавопротеинов [67].

Наряду с рутинными исследованиями, имеют место и оригинальные работы, например, по исследованию вязкости пищевых продуктов [110] и процессов высыхания краски [111].

На сегодняшний момент производятся пилотные исследования аппаратных комплексов, ассистентов хирурга, основанных на принципах лазерной спекл-визуализации для интраоперационного контроля функционирования сосудов [31; 69; 112; 113], что свидетельствует о соответствии методов и результатов жестким медицинским стандартам.

Основные результаты опубликованы:

- Histogram analysis of laser speckle contrast image for cerebral blood flow monitoring / A. S. Abdurashitov [идр.] // *Frontiers of Optoelectronics*. — 2015. — Т. 8, № 2. — С. 187—194.

## **Глава 2. Теоретическая модель формирования сигнала лазерной спекл-визуализации в цифровом голографическом микроскопе с вне-осевой конфигурацией опорного поля**

### **1.1 Постановка задачи**

Задача теоретического анализа сигнала метода лазерной спекл-визуализации сводится к разработке достаточно общего, в меру строгого (для сохранения простоты математического формализма и верности интерпретируемых результатов) подхода к характеристике временной динамики спекл-структур, который позволял бы производить количественную оценку средней скорости и направления движения форменных элементов.

Аспекты формирования сигнала ЛСВ и его интерпретации широко представлены в ряде работ, в которых был проведен анализ теоретических и практических ограничений метода лазерной спекл-визуализации [57; 62; 66],

представлены теоретические модели формирования сигнала ЛСВ при различных экспериментальных условиях [26; 58; 64; 114; 115], разработаны алгоритмы цифровой обработки зарегистрированных спекл-структур [83; 116—121], а также представлены новые пути интерпретации получаемых данных [57; 122—125].

Однако, в большинстве работ для симуляции спекл-картин, используются вычислительно емкие алгоритмы Монте-Карло или простые приближения, основанные на свойстве линзы к осуществлению фильтра низких частот к заведомо известному "идеальному" изображению большого числа точечных источников когерентного излучения.

Целью теоретических исследований, описанных в главе 2, является разработка простой и достаточно строгой теоретической модели формирования сигнала в методе ЛСВ включающей в себя:

1. Математические выражения, описывающие "идеальное" динамическое спекл-поле в некоторой точке пространства, сформированное объемной структурой - сосудом, с произвольным профилем скорости и концентрацией форменных элементов.
2. Процесс регистрации "идеального" спекл-поля на матричный фотоприемник в интерференционном микроскопе на отражение с вне-осевой конфигурацией опорного поля.

## **2.2 Принципы формирования сигнала в методе лазерной спекл-визуализации**

Для простоты рассуждений необходимо положить, что оптические поля, рассматриваемые в рамках модели, являются эргодическими, строго монохроматическими и линейно поляризованными. Оптическая система является дифракционно ограниченной с пренебрежимо малыми абберационными эффектами. Микро-структура объекта визуализации характеризуется

неоднородностями существенно большими в сравнении с длиной волны излучения.

Для описания процесса формирования результирующего спекл-поля в некоторой области пространства удобнее всего оперировать термином «фазор» — математическая абстракция — точка в пространстве  $(x, y, z)$ , характеризующаяся амплитудой  $a$  и фазой  $\varphi$  испускаемой световой волны, совокупность таких фазоров формирует волновой фронт вида:

$$\Phi(x, y, z) = a(x, y, z) \exp[i\varphi(x, y, z)]. \quad (2.1)$$

Общепринято отождествлять ось  $z$  с оптической осью системы, а плоскость  $(x, y)$  с плоскостью, в которой «лежат» оптические элементы системы и формируются оптические поля.

В случае с материальным объектом под фазором понимается локальная неоднородность - перепады высоты микро-рельефа или скачок показателя преломления. Примем плоскость  $z = 0$  совмещенной с поверхностью такого объекта. При его облучении когерентным светом в плоскости  $(x, y, 0)$  формируется волновое поле со свойствами, обусловленными поверхностью объекта. Такие рассуждения можно применить ко всем плоскостям  $(x, y)$ , перпендикулярным оси и пересекающим объект. Следует отметить, что для плоскостей  $(x, y, z \neq 0)$  необходимо провести их распространение в плоскость  $(x, y, 0)$ . Согласно теории углового спектра, данная операция осуществляется путем свертки исходного поля с функцией импульсного отклика свободного пространства  $h(x, y, \Delta z)$  [126]. Таким образом, суммарное волновое поле  $U$  в плоскости  $(x, y, 0)$  есть интеграл:

$$U(x, y, 0) = \int \Phi(x, y, z) \otimes h(x, y, \Delta z) dz. \quad (2.2)$$

Для удобства и стройности изложения перейдем от пространственных координат  $(x, y)$  к пространственным частотам  $k_x, k_y$ :

$$\hat{U}(k_x, k_y, 0) = \int \hat{\Phi}(k_x, k_y, z) H(k_x, k_y, \Delta z) dz. \quad (2.3)$$

$$H(k_x, k_y, \Delta z) = \exp\left[ik\Delta z \sqrt{1 - (\lambda k_x)^2 - (\lambda k_y)^2}\right], \quad (2.4)$$

где  $\hat{\phantom{x}}$  — символ, обозначающий двумерный Фурье-образ соответствующей функции,  $\Delta z$  - расстояние распространения волнового фронта, а  $H(k_x, k_y, \Delta z)$  — передаточная функция свободного пространства, связанная с импульсным откликом  $h(x, y, \Delta z)$  преобразованием Фурье.

Интеграл (2.2) является когерентной суперпозицией всех волновых фронтов, отраженных объектом в приближении баллистических фотонов, то есть фотонов, испытавших однократное рассеяние. После подсчета интеграла (2.3) и выполнения обратного преобразования Фурье в плоскости  $(x, y, 0)$  будет наблюдаться результирующая статическая объективная спекл-картина, а информация о взаимном расположении рассеивающих центров будет утрачена. При наличии динамической компоненты в распределении форменных элементов в толще объекта необходимо внести соответствующие поправки в интеграл (2.3).

### 2.2.1 Поперечное перемещение форменных элементов

Согласно свойству преобразования Фурье [126] линейный сдвиг функции в пространстве  $(x, y)$  соответствует фазовой модуляции в пространстве  $k_x, k_y$ , в связи с чем интеграл (2.3) приобретает вид:

$$\hat{U}(k_x, k_y, 0) = \int \hat{\Phi}(k_x, k_y, z) H(k_x, k_y, \Delta z) \exp[-i\varphi_m(\Delta_x k_x, \Delta_y k_y, z)] dz, \quad (2.5)$$

где функция  $\exp[-i\varphi_m(\Delta_x k_x, \Delta_y k_y, z)]$  отражает количественные характеристики поперечного перемещения форменных элементов. Интегралы (2.3) и (2.5) стоит интерпретировать как две мгновенные реализации динамической объективной

спекл-картины разнесенные по времени на величину  $\Delta t$ . Эффект дополнительного фазового множителя в пространстве  $k_x, k_y$  на формирование изображения рассеивающего объекта оптической системой будет рассмотрен в подразделе 2.3. Эффекты, связанные с Доплеровским сдвигом частоты света опущены из-за положенной строгой перпендикулярности векторов скорости перемещения рассеивающих центров и направлением распространения светового пучка.

### 2.2.2 Продольное перемещение форменных элементов

Продольное перемещение форменных элементов следует интерпретировать как фазовую модуляцию вдоль оптической оси системы  $z$ , иными словами локальное изменение фазы вторичных волн, испущенных неоднородностями. Математически это выражается как дополнительный фазовый множитель в интеграле (2.2). Следует отметить тот факт, что согласно свойству преобразования Фурье, линейный фазовый множитель, примененный в пространстве  $(x, y)$ , будет давать соответствующий сдвиг в пространстве  $k_x, k_y$ , таким образом, интеграл (2.3) приобретает вид:

$$\hat{U}(k_x, k_y, 0) = \int \hat{\Phi}(k_x - \Delta_{k_x}, k_y - \Delta_{k_y}, z) H(k_x, k_y, \Delta z) dz. \quad (2.6)$$

где  $\Delta_{k_x}$  и  $\Delta_{k_y}$  являются аргументами функции  $\exp[i\varphi(\Delta_{k_x} x, \Delta_{k_y} y, z)]$ , задающей дополнительные фазовые набегии для форменных элементов в случае их продольного перемещения. Эффект дополнительного фазового множителя в пространстве  $(x, y)$  на формирование изображения рассеивающего объекта оптической системой будет рассмотрен в подразделе 2.3. Наряду с этим, немаловажным фактором, который следует учесть при анализе продольного смещения форменных элементов, является эффект Доплера, который существенен в силу параллельности векторов скорости движения рассеивающих центров и направления распространения освещающего светового пучка.

## 2.3 Формирование оптического изображения рассеивающего объекта в когерентном свете

Рассмотрению подвергается пространственно инвариантная оптическая система, состоящая из микрообъектива, скорректированного на бесконечность и тубусной линзы, так как конфигурация такого рода является наиболее распространенной, освещение объекта осуществляется плоской монохроматической волной, нормально падающей на границу раздела объект-воздух.

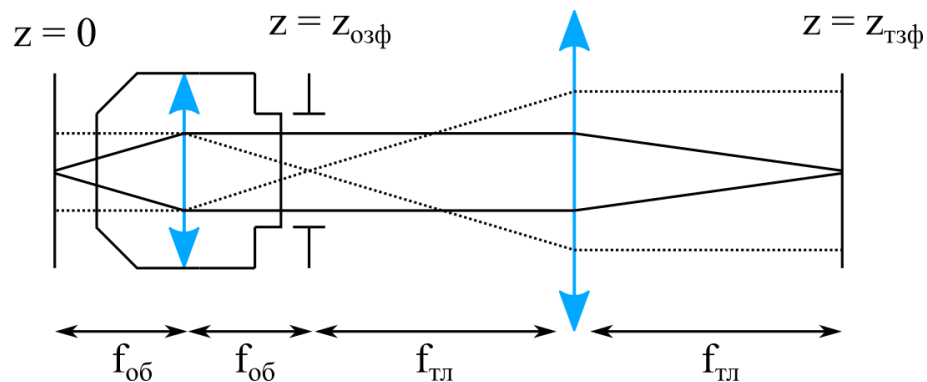


Рисунок 2.1 — Конфигурация оптической системы, рассматриваемая в данном разделе.

Положим волновой фронт вида (2.2) создается в передней фокальной плоскости микрообъектива, тогда волновой фронт в его задней фокальной плоскости определяется выражением [126]:

$$\hat{U}(k_x, k_y, z_{озф}) = \iint U(x, y, 0) \exp\left[-i \frac{2\pi}{\lambda f_{об}} (k_x x, k_y y)\right] dx dy, \quad (2.7)$$

где  $\lambda$  — длина волны источника излучения,  $f_{об}$  — фокусное расстояние микрообъектива, а  $z_{озф}$  — положение задней фокальной плоскости на оси  $z$ .

Интеграл (2.7) представляет собой преобразование Фурье исходного волнового

фронта (2.2), то есть его разложение на совокупность элементарных плоских волн, распространяющихся в направлениях, определяемых парами пространственных частот  $k_x, k_y$  вдоль оптической оси системы.

В силу ограниченности физического размера апертуры микрообъектива, направления распространения плоских волн ограничены соотношением  $k_x^2 + k_y^2 \leq (NA/f_{об})^2$ , где  $NA$ - числовая апертура микрообъектива. Данное неравенство интерпретируется как фильтрация нижних частот исходного волнового фронта виртуальным экраном  $P(k_x, k_y)$ , помещенным в заднюю фокальную плоскость микрообъектива таким что:

$$P(k_x, k_y) = \begin{cases} 1, & \text{если } k_x^2 + k_y^2 \leq (NA/f_{об})^2 \\ 0, & \text{если } k_x^2 + k_y^2 > (NA/f_{об})^2 \end{cases} \quad (2.8)$$

Положим, что единственным элементом оптической системы, вносящим ограничение на направления распространения плоских волн, является микрообъектив, тогда поместив тубусную линзу так, чтобы ее передний фокус совпадал с задним фокусом микрообъектива  $z_{озф} = z_{мзф}$ , в заднем фокусе тубусной линзы будет сформирован результирующий волновой фронт вида:

$$U_1(x', y', z_{мзф}) = \iint \hat{U}(k_x, k_y, z_{озф}) P(k_x, k_y) \exp[-i \frac{2\pi}{\lambda f_{мл}} (k_x x' + k_y y')] dk_x dk_y. \quad (2.9)$$

Интеграл (2.9) представляет собой масштабированную копию  $x' = -x/M$ ,

$y' = -y/M$  волнового фронта (2.2), претерпевшую пространственное преобразование оптической системой с импульсным откликом:

$$p(x', y') = \iint P(k_x, k_y) \exp[i2\pi(k_x x' + k_y y')] dk_x dk_y. \quad (2.10)$$

Рассмотрим случай поперечного перемещения рассеивающих центров, при котором происходит трансформация координат  $(x, y) \rightarrow (x + \Delta_x, y + \Delta_y)$ . Для



простоты суждений будем полагать, что при перемещении, начальная фаза волны, испускаемой рассеивающим центром не изменяется. В приближении линейной, пространственно-инвариантной оптической системы, перемещение в плоскости предмета будет давать пропорциональное перемещение в плоскости изображения, причем коэффициентом пропорциональности является увеличение оптической системы.

Графическая интерпретация данного эффекта представлена на рисунке 2.2. Здесь и далее распространение лучей происходит слева направо. В плоскость предмета А, находящуюся в передней фокальной плоскости линзы Л1, помещен точечный монохроматический источник света, угловой спектр которого есть плоская волна, распространяющаяся параллельно оптической оси системы (сплошная линия). При поперечном смещении источника, его изображение претерпевает смещение на величину  $\Delta x$ , а угловой спектр приобретает линейную фазовую модуляцию  $\varphi$  (пунктирная линия).

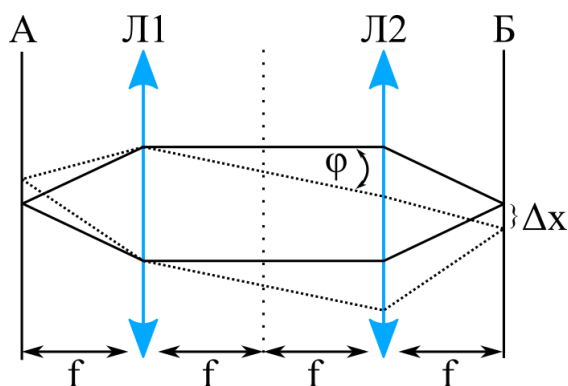


Рисунок 2.2 — К пояснению эффекта трансляции спекл-картины при поперечном смещении рассеивателей в плоскости объекта.

Обобщая геометрические рассуждения угловой спектр плоских волн, сформированный микрообъективом, приобретает постоянный фазовый множитель, пропорциональный выражению  $\exp[-i \frac{2\pi}{\lambda f_{об}} (k_x \Delta_x + k_y \Delta_y)]$ . После

преобразования Фурье, осуществляемое тубусной линзой, в ее задней фокальной плоскости будет наблюдаться результирующий волновой фронт вида:

$$U_1'(x', y', z_{\text{тбф}}) = U_1(x' - \Delta_x, y' - \Delta_y, z_{\text{тбф}}) \quad (2.11)$$

Перейдем к описанию продольного перемещения рассеивающих центров. Как было показано в 2.2.2 продольное перемещение эквивалентно фазовой модуляции исходного волнового фронта, сформированного в передней фокальной плоскости микрообъектива. Согласно интегралу 2.6, в случае линейной фазовой модуляции, угловой спектр плоских волн, сформированный в задней фокальной плоскости микрообъектива, претерпевает поперечное смещение на величины  $\Delta_{k_x}$  и  $\Delta_{k_y}$ , являющиеся аргументами функции фазовой модуляции  $\exp[-i2\pi(x\Delta_{k_x} + y\Delta_{k_y})]$ . Интересным является переход от «кипения» спеклов к их поперечной трансляции, который часто встречается в литературе [63; 127—129]. Удобнее рассматривать этот эффект с позиции геометрической оптики. На рисунке 2.3 представлена оптическая система, состоящая из двух линз в конфигурации 4f. При наличии линейной фазовой модуляции (наклона) волнового фронта в передней фокальной плоскости первой линзы, аналогичный наклон будет наблюдаться в задней фокальной плоскости второй линзы без поперечного смещения волнового фронта. Это утверждение справедливо из-за оптического сопряжения плоскостей А и Б. Рассмотрим плоскость В, отстоящую от задней фокальной плоскости линзы Л2 на величину  $\Delta z$ . В силу наличия угла  $\alpha$  между направлением распространения волнового фронта и оптической осью системы, первый приобретает поперечное смещение, которое при малых углах наклона определяется выражением  $\Delta x \approx \alpha(f + \Delta z)$ . Таким образом, при наблюдении двух последовательных реализаций спекл-картин, условно обозначенных сплошной и пунктирной линией на рисунке 2.3, отличающихся линейной фазовой модуляцией, строго в плоскости Б имеет место процесс «кипения» спеклов, а в плоскости В их трансляция.

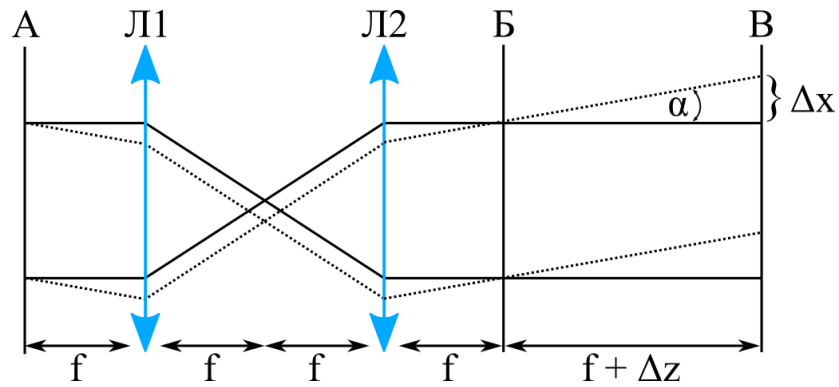


Рисунок 2.3 — К пояснению эффекта перехода «кипения» спеклов к их трансляции при рассмотрении строго сфокусированной и расфокусированной оптической системы.

В общем случае функция фазовой модуляции может принимать произвольные формы, а частный случай линейной фазовой модуляции был рассмотрен исходя из соображений простоты аналитических выражений. После преобразования Фурье, осуществляемое тубусой линзой, в ее задней фокальной плоскости будет наблюдаться результирующий волновой фронт вида:

$$U_1'(x', y', z_{mзф}) = U_1(x', y', z_{mзф}) \exp[i\varphi(x', y', z_{mзф})], \quad (2.12)$$

где  $\exp[i\varphi(x', y', z_{mзф})]$  — функция произвольной фазовой модуляции волнового фронта, описывающая продольное перемещение рассеивающих центров.

Вектор скорости движения рассеивающих центров может иметь компоненты как в продольном так и в поперечном направлениях, в связи с чем возникает разность фаз, связанная с Допплеровским эффектом и определяемая выражением [130]:

$$\Delta\varphi(x', y', z') = \frac{4V \cos[\psi(x', y', z')] \pi T}{\lambda}, \quad (2.13)$$

где  $\psi(x', y', z')$  — угол между вектором скорости движения форменных элементов и направлением распространения светового пучка,  $T$  - период дискретизации (в случае использования матричного фотоприемника является величиной обратной

частоте кадров),  $V$  - модуль вектора скорости движения рассеивающих центров,  $\lambda$  - длина волны источника излучения.

### 2.3 Регистрация волнового фронта на матричный фотоприемник в голографическом микроскопе с вне-осевой конфигурацией опорного поля

Оптическая схема, рассматриваемая в данном разделе, является модернизированной версией рисунка 2.1:

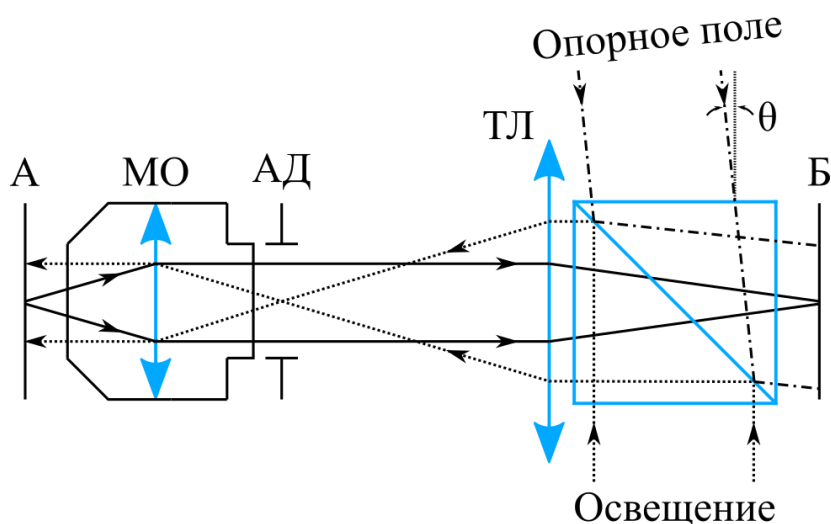


Рисунок 2.4 — Оптическая схема интерференционного микроскопа с вне-осевой конфигурацией опорного плеча. Детали конструкции системы освещения и опорного плеча опущены, так как не представляют особого интереса в рассмотрении.

Интерференционный микроскоп представляет собой интерферометр Маха-Цендера в режиме работы на отражение. Микрообъектив (МО) и тубусная линза (ТЛ), находящиеся в телецентрической конфигурации, формируют изображение объекта А в плоскости регистрации Б. Опорная волна, падающая на плоскость регистрации Б под углом  $\theta$  в совокупности с предметной волной образуют систему интерференционных полос, с периодом, пропорциональным величине  $\lambda/\theta$ . Современные фоточувствительные элементы не способны регистрировать

колебания на световых частотах, по этому регистрируется величина  $I \propto \langle U^2 \rangle$ , называемая интенсивностью, где символом  $\langle \rangle$  обозначается оператор усреднения по времени или ансамблю (что в приближении эргодичности эквивалентно). Распределение интенсивности в плоскости Б описывается выражением:

$$I_B(x', y') = [I_{\Pi}(x', y') + I_O(x', y')] + \Gamma(x', y') + \Gamma^*(x', y'), \quad (2.14)$$

где  $I_{\Pi}(x', y')$  — распределение интенсивности, формируемое предметным каналом,  $I_O(x', y')$  — распределение интенсивности опорной волны,  $\Gamma(x', y')$  — функция взаимной когерентности предметного и опорного полей. Символ \* означает комплексное сопряжение. Практический интерес представляет разделение этих интерференционных слагаемых в пространственном спектре цифровой голограммы. Здесь и далее под голограммой понимается распределение интенсивности в плоскости регистрации, описанное выражением (2.14). Требуемое разделение достигается путем подбора угла наклона опорного пучка  $\theta$  и изменением эффективной апертуры микрообъектива. На рисунке 2.5 схематично изображен пространственный спектр голограммы, представляющий собой квадрат со стороной  $F = 1/\delta$ , где  $\delta$  — шаг пространственной дискретизации, который в случае матричного фотоприемника определяется размером его пикселя. Если пиксели имеют квадратную форму, то шаг дискретизации в направлении  $x$  и  $y$  совпадает, что дает возможность положить  $F = F_x = F_y$ . Задача о разделение сводится к размещению трех окружностей суммарным диаметром  $2d$  на диагонали квадрата длиной  $\sqrt{2}F$ .

Исходя из геометрических соображений получено выражение, позволяющее рассчитать максимальный диаметр  $d$  автокорреляционной компоненты  $[I_{\Pi}(x', y') + I_O(x', y')]$ :

$$d = \frac{2\sqrt{2}F}{3 + \sqrt{2}}. \quad (2.15)$$

С позиции оптической системы диаметр автокорреляционной компоненты описывается выражением:

$$d = \frac{k_0 NA}{M}, \quad (2.16)$$

где  $k_0 = 2\pi/\lambda$  — волновое число, обусловленное длиной волны излучения  $\lambda$ ,  $NA$  — числовая апертура микрообъектива,  $M$  — увеличение оптической системы.

Подставляя выражение (2.16) в (2.15) получаем:

$$\frac{k_0 NA}{M} = \frac{2\sqrt{2}F}{3 + \sqrt{2}}. \quad (2.17)$$

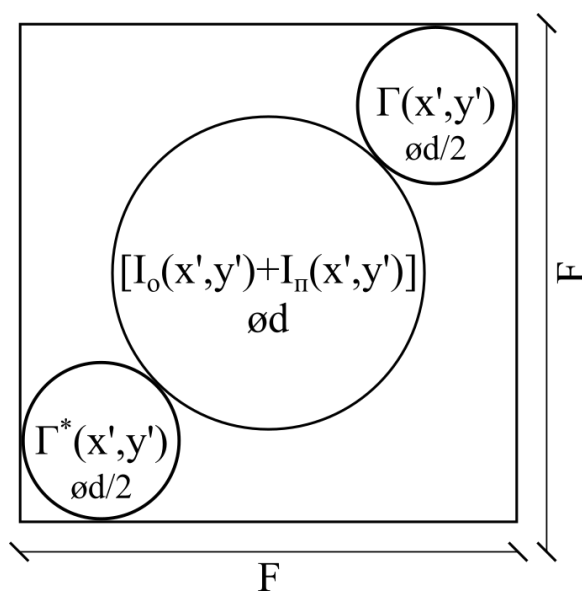


Рисунок 2.5 — К пояснению необходимости разделения интерференционных порядков в пространственном спектре голограммы и расчету оптимальных параметров оптической системы.

Угол наклона опорного пучка  $\theta$  также может быть рассчитан, исходя из простых геометрических соображений (см. рисунок 2.6).

Центры кросс-корреляционных компонент  $\Gamma(x', y')$  и  $\Gamma^*(x', y')$  находятся на окружности радиусом  $d/2 + d/4$ . Подставим вместо  $d$  выражение (2.15) и выполним ряд простых алгебраических действий:

$$k_x = \frac{3\sqrt{2}F}{6 + 2\sqrt{2}}, \quad (2.18)$$

где  $k_x$  - обозначает определенную пространственную частоту из диапазона  $F$ , причем центры кросс-корреляционных компонент совпадают с углами квадрата со стороной  $k_x$ , следовательно полная длина вектора равна  $\sqrt{2}k_x$ . При небольших углах  $\theta$  период интерференционных полос в плоскости регистрации приближенно описывается выражением  $T \approx 1/\sqrt{2}k_x \approx \lambda/\theta$ . Приняв во внимание это выражение и формулу (2.18) необходимый угол в  $\theta$ , в радианах, рассчитывается следующим образом:

$$\theta = \frac{6\lambda F}{6 + 2\sqrt{2}}. \quad (2.19)$$

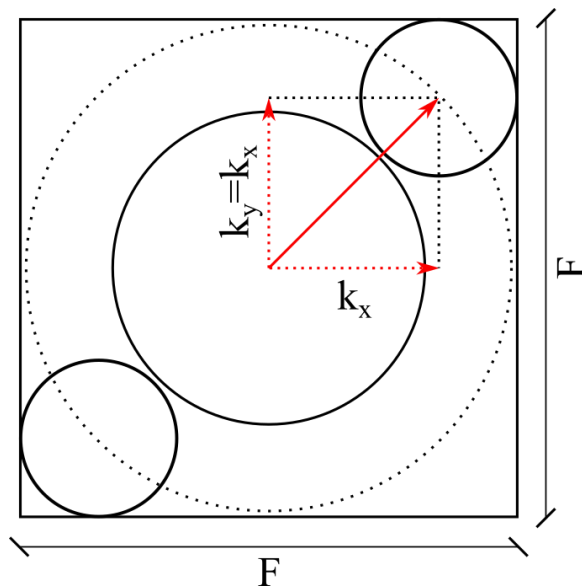


Рисунок 2.6 — К пояснению расчета необходимо угла  $\theta$  между опорной волной и оптической осью системы для достижения сепарации интерференционных

порядков в пространственном спектре голограммы.

Формулы (2.17) и (2.19) используются для расчета оптимального режима работы голографического микроскопа с вне-осевой конфигурацией опорного плеча. Стоит отметить тот факт, что рассуждения, в результате которых получены данные выражения, производились для рассеивающего объекта, то есть при полном заполнении апертуры микрообъектива рассеянным светом.



### 2.3.1 Эффекты дискретизации и квантования при регистрации распределения интенсивности на матричный фотоприемник

Существенно важным аспектом работы любого оптического прибора является процедура регистрации (дискретизации и квантования) распределения интенсивности изображения объекта (или интерференционной картины) на матричный фотоприемник. Если в разделе 2.4 были, в основном, рассмотрены свойства оптической системы, и как они влияют на пространственный спектр голограммы, то в данном разделе будет изложена цепочка преобразований осуществляемых матричным фотоприемником над «идеальным» распределением интенсивности. Как и в прошлом разделе будем полагать пиксель квадратной формы, со стороной  $\delta$ , формально описываемый выражением:

$$\text{rect}\left(\frac{x'}{\delta x}\right) = \begin{cases} 0, & \text{если } \left|\frac{x'}{\delta x}\right| > \frac{1}{2} \\ \frac{1}{2}, & \text{если } \left|\frac{x'}{\delta x}\right| = \frac{1}{2} \\ 1, & \text{если } \left|\frac{x'}{\delta x}\right| < \frac{1}{2} \end{cases}. \quad (2.20)$$

Регистрация изображения на массив таких элементов эквивалентна его свертке с функцией  $pp(x', y') = \text{rect}\left(\frac{x'}{\delta x}\right)^2$ :

$$I'_B(x', y') = I_B(x', y') \otimes pp(x', y'). \quad (2.21)$$

Таким образом, исходное изображение претерпевает пространственную фильтрацию фильтром  $pp(x', y')$  с передаточной функцией:

$$\mathfrak{F}\{pp(x', y')\} = \delta x^2 \sin c\left(\frac{k_x \delta x}{2}\right)^2. \quad (2.22)$$

Первый ноль функции (2.22) находится в точке  $k_x = \pi/\delta x$ , таким образом, полоса пропускания фильтра есть окружность с диаметром  $\approx 2\pi/\delta x$ , внутри которой фильтр равен единице, а вне нее нулю.

Вторым этапом регистрации является дискретизация, то есть выбор конечного числа точек из функции распределения интенсивности  $I'_B(x', y')$ :

$$I''_B(x', y') = I'_B(x', y') \text{comb}(x' - n\delta x)^2, \quad (2.23)$$

где  $n$  — количество точек, а  $\text{comb}(x' - n\delta x)$  функция выборки такая, что:

$$\text{comb}(x' - n\delta x) = \left\{ \begin{array}{l} 1, \text{ если } x' = n\delta x \\ 0, \text{ во всех остальных случаях} \end{array} \right\}. \quad (2.24)$$

Уравнение (2.23) эквивалентно свертке в спектральной области:

$$\hat{I}''_B(k_x, k_y) = \hat{I}'_B(k_x, k_y) \otimes \text{comb}\left(k_x - \frac{n}{\delta x}\right)^2. \quad (2.25)$$

Уравнение (2.24) продуцирует копии спектра исходного сигнала  $\hat{I}'_B(k_x, k_y)$ , отстоящие друг от друга на величину  $1/\delta x$ . При условии, что спектр  $\hat{I}'_B(k_x, k_y)$  является частотно-ограниченным и имеет ширину  $2k_{\max}$ , выбрав необходимый интервал дискретизации такой что:

$$1/\delta x \geq 2k_{\max}, \quad (2.26)$$

возможно полностью восстановить исходную функцию  $\hat{I}''_B(k_x, k_y)$  по дискретному набору ее значений. В случае оптических систем, волновой фронт, формируемый изображающей оптикой на плоскость фотоприемника является частотно-ограниченным в силу конечных размеров апертур линз. Для восстановления функции необходимо произвести пространственную фильтрацию спектра вида (2.25) некой функцией маской. Удивительной особенностью регистрации оптических полей на матричный фотоприемник является тот факт, что эта

фильтрация выполняется автоматически. Матричный фотоприемник с размером пикселя  $\delta x$  обладает полосой пропускания  $1/\delta x$ , поэтому, при соблюдении условия  $k_0 NA/M \leq 1/\delta x$  (см. рисунок 2.7), необходимая фильтрация будет осуществлена матричным фотоприемником автоматически.

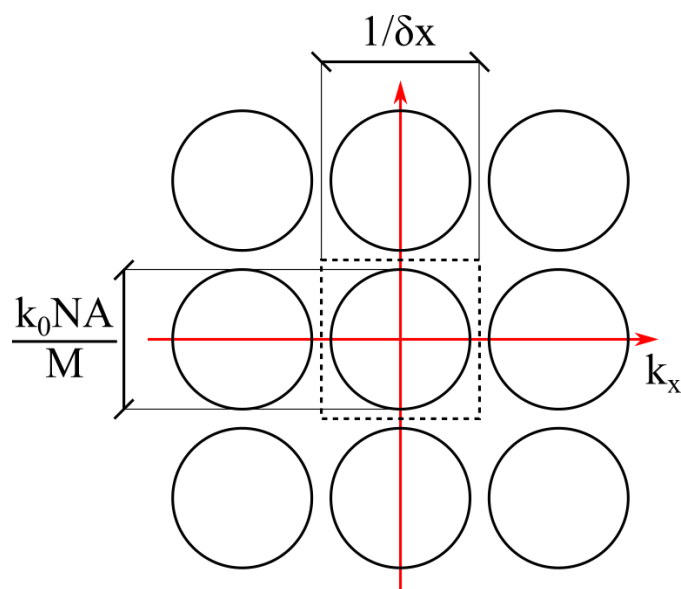


Рисунок 2.7 — К пояснению автоматической фильтрации, выполняемой матричным фотоприемником с шагом  $\delta x$  над пространственным спектром зарегистрированного распределения интенсивности вида 2.25.

## 2.4 Выводы

Во второй главе представлены математические выражения, образующие основы модели формирования сигнала в методе лазерной спекл-визуализации и описывающие волновой фронт, созданный произвольным объектом в передней фокальной плоскости микрообъектива. Описан процесс формирования и регистрации интерференционного сигнала в плоскости матричного фотоприемника, при использовании плоской опорной волны. Численные результаты, полученные при помощи компьютерного моделирования и

фантомных и *in vivo* исследований, в рамках данной математической модели, будут показаны в последующих главах.

Необходимо отметить, что устоявшимся типом освещения в методе лазерной спекл-визуализации является освещение «под углом» [38; 50; 52; 74; 132—135], в связи с этим, наибольший интерес представляет выражение (2.13) — описывающие Доплеровскую разность фаз между двумя волновыми фронтами, разнесенными во времени. В силу высокой степени монохроматичности и когерентности используемых источников излучения невозможно восстановить трехмерное распределение фазовой функции вида (2.13), а только ее проекцию на двумерную плоскость. Однако, даже этой проекции достаточно для определения направления потока и количественной оценки средней скорости, что будет показано в последующих главах.

Приближение баллистичности фотонов может быть частично реализовано при использовании поляризатора, выставленного параллельно поляризации освещения. Обычно, плоско-параллельные элементы встраиваются в «бесконечности» оптической системы, например между микрообъективом и тубусной линзой. При несоблюдении условия баллистичности физическая интерпретация выражения (2.13) неоднозначна как в силу наличия Доплеровской компоненты, отражающей скорость потока «как целого», так и компоненты, описывающей скорость движения рассеивателей друг относительно друга.

Основные результаты опубликованы:

- 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.
- Off-axis holographic laser speckle contrast imaging of blood vessels in tissues / A. Abdurashitov [идр.] // Journal of Biomedical Optics. — 2017. — Т. 22, № 9. — С. 091514.

### **Глава 3. Метод количественной оценки средней скорости движения рассеивающих центров путем анализа временной динамики функции фазовой модуляции предметного волнового фронта**

#### **3.1 Постановка задачи**

Методы лазерной спекл-визуализации заключаются в регистрации субъективной, динамической спекл-картины на матричный фотоприемник с конечным временем экспозиции, причем  $T_{\text{эксп}} \gg \tau$ , где  $\tau$  — время декорреляции спекл-картины, то есть время, за которое одна спекл-картина сменится другой, статистически независимой. В связи с этим, за время экспозиции камеры произойдет усреднение большого числа независимых спекл-реализаций, что приведет к локальному снижению спекл-контраста  $K$ , численный анализ которого дает косвенное представление о скорости движения рассеивающих центров [27; 42; 67; 113; 119; 136; 137].

Диаметрально противоположенным является детектирование динамической спекл-картины при условии  $T_{\text{эксп}} \ll \tau$ . В таком случае снижение спекл-контраста  $K$  пренебрежимо мало, и оценке подвергается динамика интенсивности спекла во времени [34; 35; 37—40; 94; 138].

Несмотря на существенное различие в детектировании, в обоих случаях анализу подлежит функция флуктуаций интенсивности спекл-картины, которая существенным образом зависит от формы распределения скоростей движения рассеивающих центров [57; 66; 80], свойств источника излучения [139], и ряда других экспериментальных параметров [140; 141], что делает затруднительными прямые измерения скорости.

Выражения (2.12) и (2.13) являются основными математическими формулами, которые будут рассмотрены в рамках данной главы. Важность этих

формулы обусловлена первопричиной флуктуаций интенсивности спекл-картины — изменение частоты, а следовательно и мгновенной фазы светового колебания при рассеянии на движущейся частице.

Целью исследований, выполненных в рамках главы 3 являются:

1. Разработка программного обеспечения, а именно текста программы и набора функций, для моделирования сигнала лазерной спекл-визуализации и его регистрации в интерференционном микроскопе с внеосевой конфигурацией опорного плеча, согласно теоретической модели, изложенной в главе 2.
2. Анализ свойств функции фазовой модуляции предметного волнового фронта от времени и установление ее взаимосвязи с направлением и средней скоростью движения рассеивающих центров.

### **3.2 Численное моделирование сигнала лазерной спекл-визуализации от сосуда с параболическим распределением скоростей**

Моделирование будет разделено на следующие этапы для ясности изложения:

1. Формирование результирующего волнового фронта в передней фокальной плоскости микрообъектива согласно выражению (2.3).
2. Внесение дополнительной фазовой модуляции вида (2.13) для учета эффекта Доплера, возникающего при рассеянии света на частице, движущейся с постоянной скоростью под некоторым углом к освещающему пучку.
3. Преобразования, осуществляемые оптической системой над исходным волновым фронтом, согласно выражению (2.9).
4. Когерентная суперпозиция предметного и опорного полей в плоскости матричного фотоприемника для получения распределения интенсивности вида (2.14).

5. Процедура детектирования голограммы и выделение интерференционного порядка  $\Gamma(x', y')$  в спектральной области.
6. Реконструкция предметного волнового фронта в моменты времени  $t$  и  $t + \Delta t$  для определения вида проекции функции фазовой модуляции (2.13), а также ее статистических свойств.

Полный набор функций, осуществляющий выполнение всех вышеизложенных пунктов представлен в Приложении А

На рисунке 3.1 представлены геометрии сосуда с различной объемной концентрацией рассеивающих центров. Каждая ненулевая точка внутри сосуда — фазор вида  $a(x, y, z)\exp[i\varphi\{x, y, z\}]$ , где  $a(x, y, z)$  и  $i\varphi\{x, y, z\}$  — случайные функции, чьи значения лежат в интервалах  $[0, 1]$  и  $[0, 2\pi]$  соответственно, которые описывают вторичные источники световых колебаний, обусловленные рассеянием света на форменных элементах крови.

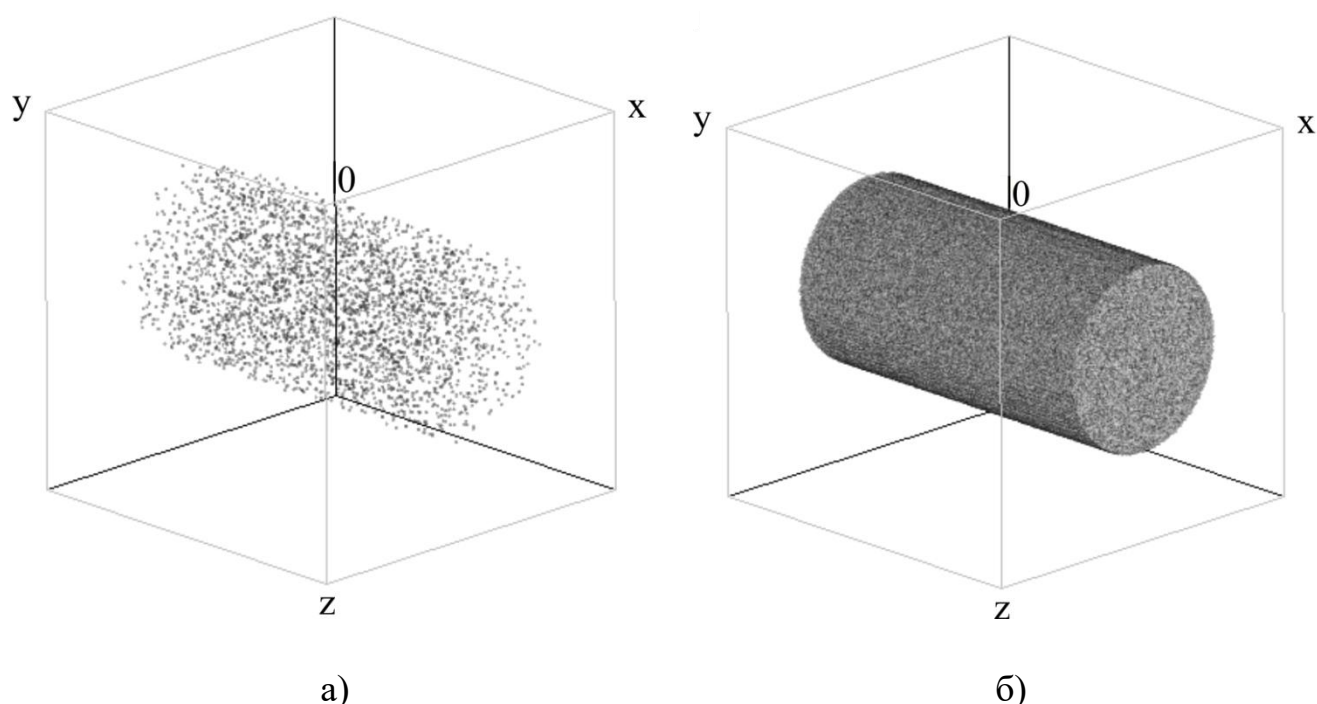


Рисунок 3.1 — Распределение рассеивающих центров внутри сосуда с различной объемной концентрацией: а) 0.1%, б) 90%, что соответствует малому и большому гематокриту (содержанию форменных элементов) соответственно. Данные

значения характеры как при визуализации капиллярных сетей, где спекл-картина формируется десятками или сотнями эритроцитов, так и для наблюдения относительно крупных сосудов, когда волновой фронт формируется большим ансамблем форменных элементов.

Плоскость  $(x, y, 0)$  совмещена с передней фокальной плоскостью микрообъектива. Согласно интегралу (2.3) в данной плоскости был рассчитан результирующий волновой фронт, являющийся когерентной суперпозицией оптических полей, отраженных от каждого сечения  $(x, y)$  для всех  $z$ , где имеются источники вторичных световых колебаний (см. рисунок 3.2).

При распространении результирующего волнового фронта через оптическую систему его угловой спектр претерпевает фильтрацию согласно выражению (2.9). Параметры оптической системы и системы регистрации изложены в таблице 1.

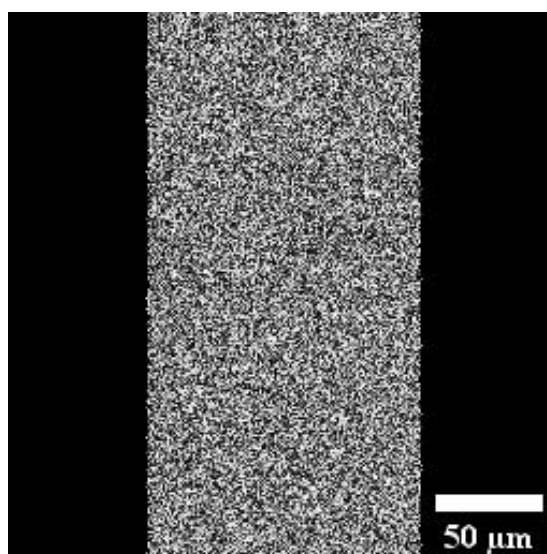


Рисунок 3.2 — Распределение интенсивности результирующего волнового фронта в плоскости  $(x, y, 0)$ .

При наличии опорной волны вида:



$$U_O(x', y', z_{mзф}) = \exp[i2\pi k_x(x' + y')], \quad (3.1)$$

где  $k_x$ , согласно уравнению (2.19) — пространственная частота, ответственная за период несущих интерференционных полос, сформированных в плоскости регистрации, при когерентной сумме предметного и опорного фронтов, распределение интенсивности подчиняется выражению (2.14) и иллюстрируется рисунком 3.4.

Таблица 1 — Характеристики оптической системы и системы регистрации изображения, использованные при численном моделировании

Числовая апертура	0.03
Увеличение	1
Длина волны излучения, мкм	0.6
Размер пикселя, мкм	1
Размер изображения, пикс	256x256
Диаметр сосуда, мкм	64
Объемная концентрация рассеивателей, %	10
Частота кадров, Гц	300

Пространственный спектр голограммы (преобразование Фурье распределения интенсивности в плоскости матричного фотоприемника) представлен на рисунке 3.5. Вид и положение интерференционных порядков аналогично 2.5. Необходимая фильтрация порядков может быть осуществлена как вручную, путем выделения необходимой области спектра, так и автоматически: координата центра интерференционного порядка определяется по периоду интерференционных полос, а радиус рассчитывается из параметров оптической системы, согласно выражениям (2.17), (2.18), (2.19).

После фильтрации, селективированный интерференционный порядок необходимо сместить в область нулевой пространственной частоты, во избежание

появления дополнительной линейной фазовой модуляции при обратном преобразовании Фурье, после которого восстановление предметного волнового фронта в комплексном виде завершено. Рассмотрение амплитуды восстановленного фронта не представят особого интереса, так как оно с

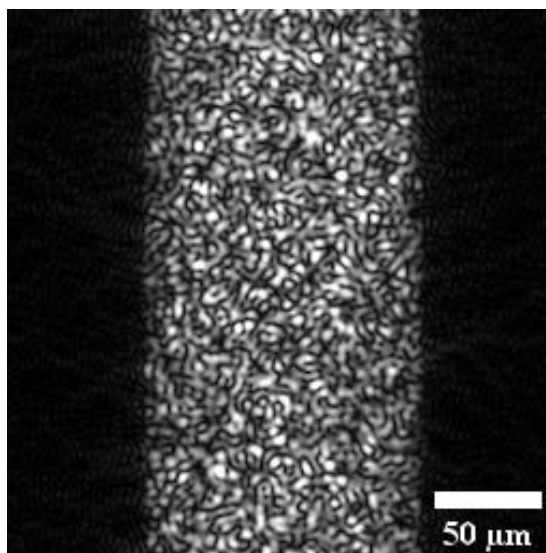


Рисунок 3.3 — Распределение интенсивности результирующего волнового фронта в плоскости матричного фотоприемника в отсутствии опорной волны. Отчетливо виден эффект ограниченной апертуры микрообъектива, который проявляется в увеличении размера спекла (невозможность разрешить два и более близлежащих источника вторичных колебаний приводит к их слиянию в один укрупненный спекл, интенсивность которого зависит от фаз данных источников), а также к размытию границ сосуда.

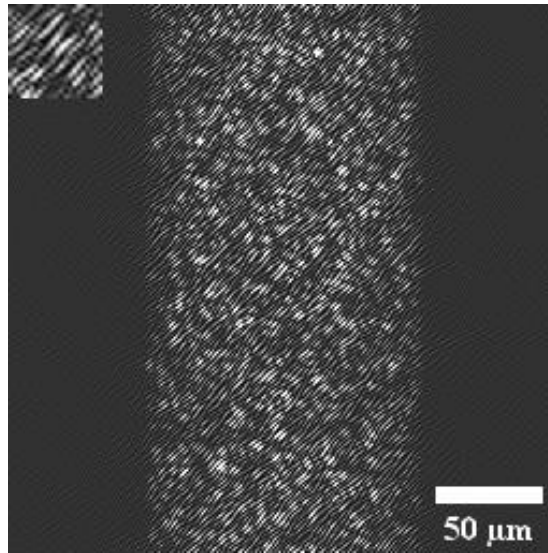


Рисунок 3.4 — Распределение интенсивности интерференционной картины в плоскости матричного фотоприемника. В увеличенном фрагменте показаны интерференционные полосы высокой пространственной частоты, рассекающие спеклы.

точностью до постоянного множителя повторяет изображение 3.3. Анализу будет подвергаться распределение фазы фронта (см. рисунок 3.6), рассчитанное как:

$$\varphi(x', y', z_{mзф}) = \arctan \left[ \frac{\Re\{U_1(x', y', z_{mзф})\}}{\Im\{U_1(x', y', z_{mзф})\}} \right]. \quad (3.2)$$

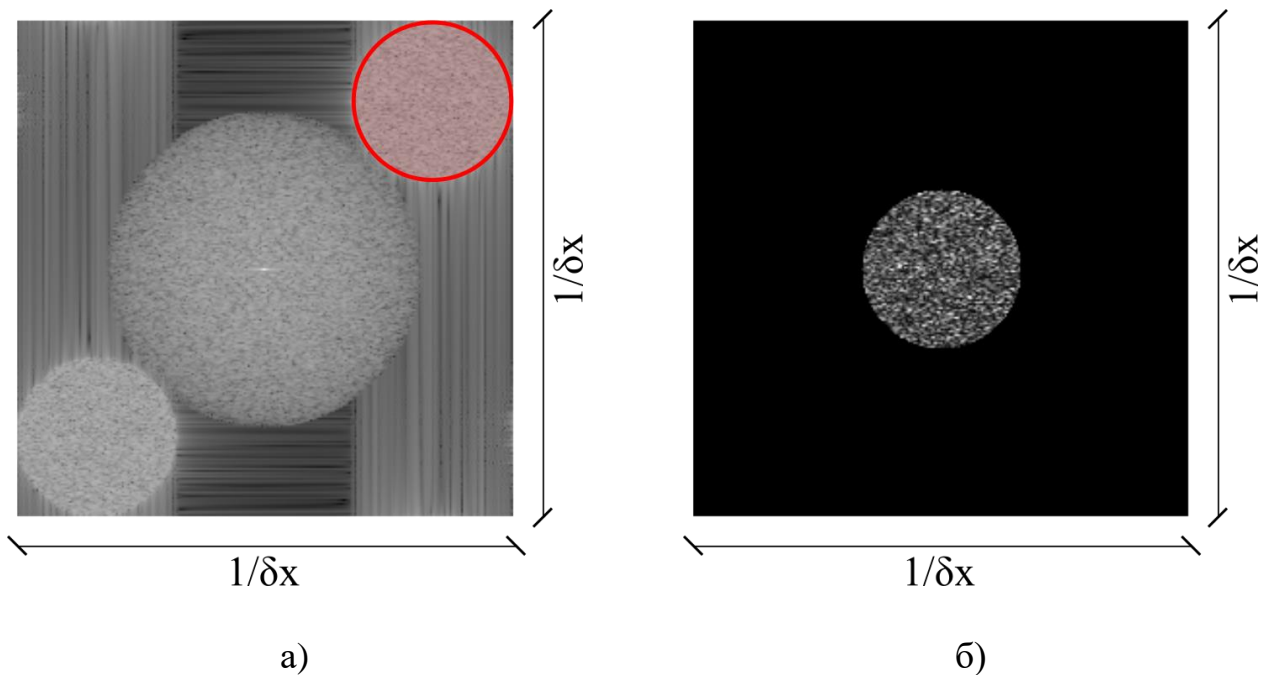


Рисунок 3.5 — а) Пространственный спектр когерентной суперпозиции предметного и опорного полей, зарегистрированный на матричный фотоприемник с размером пикселя  $\delta$ . Красным кругом обозначена маска, осуществляющая пространственную фильтрацию спектра. Внутри окружности маска равна единице, вне ее нулю. б) Пространственный спектр после фильтрации и центрирования

Формально положим существование двух мгновенных реализаций динамической спекл-картины, разнесенных во времени на величину  $\Delta t$  таких что:

$$U_1(x', y', z_{mзф}, t_0) = u_1(x', y', z_{mзф}, t_0) \exp[i\varphi_1(x', y', z_{mзф}, t_0)] \quad (3.3)$$

$$U_2(x', y', z_{mзф}, t_0 + \Delta t) = u_2(x', y', z_{mзф}, t_0 + \Delta t) \exp[i\varphi_1(x', y', z_{mзф}, t_0) + i\Delta\varphi(x', y', z_{mзф}, t_0 + \Delta t)] \quad (3.4)$$

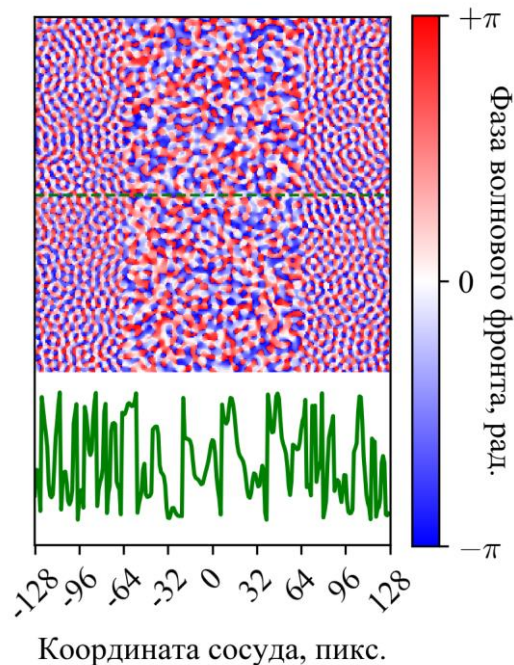


Рисунок 3.6 — Распределение фазы предметного волнового фронта в плоскости

$(x', y', z_{mзф})$ , восстановленное из голограммы. В силу свойств функции  $\arctan$  фаза лежит в интервале  $[-\pi, \pi]$ .

Дополнительная разность фаз в уравнении (3.4), в большей степени, обусловлена Доплеровским эффектом, который связан с системой освещения "под углом" и наличием распределения направлений векторов скоростей движения частиц в пространстве. Разделим уравнения (3.4) и (3.3) (пространственные и временные координаты опущены для удобства восприятия):

$$\frac{U_2}{U_1} = \frac{u_2}{u_1} \exp[i(\Delta\varphi)]. \quad (3.5)$$

В приближении того, что лишь небольшая часть вторичных источников световых колебаний покинуло поле зрения оптической системы за время  $\Delta t$  (малая направленная скорость движения), множитель  $u_2/u_1 \cong 1$ , в связи с чем, уравнение 3.5 приобретает чисто фазовый характер, детальному рассмотрению которой посвящен параграф 3.3.

### **3.3 Функция распределения разности фаз между двумя реализациями спекл-картины разделенных промежутком времени**

Положим параболический профиль скорости движения рассеивающих центров в сосуде, проиллюстрированный рисунком 3.7, угол между векторами

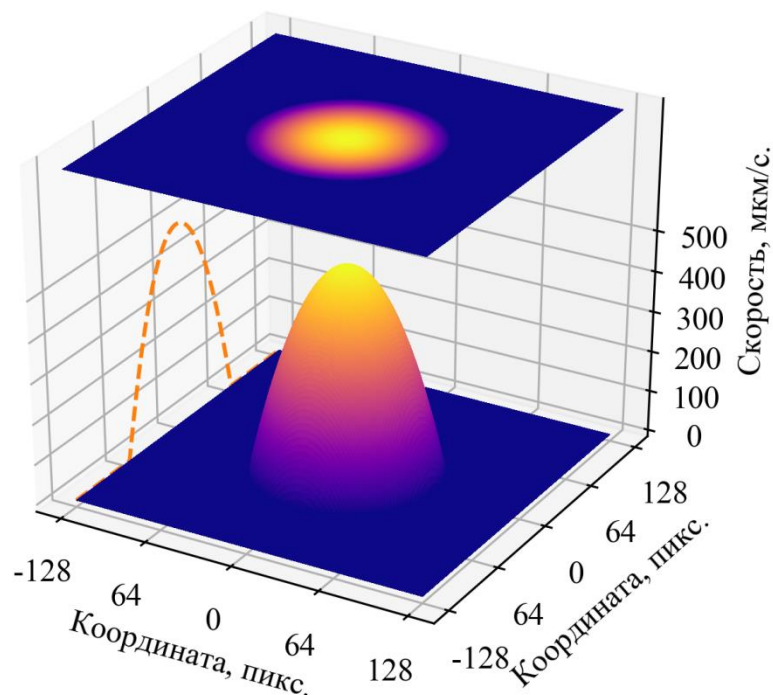


Рисунок 3.7 — Параболическое распределение скорости движения рассеивающих центров в трехмерном пространстве, рассматриваемое в данном параграфе.

скорости рассеивающих центров и направлением освещающего пучка 85 градусов, тогда по формуле (2.13) функция фазовой модуляции в сечении  $(x, z)$  имеет вид, представленный на рисунке 3.8.

Как было показано ранее, в силу высокой степени когерентности источника излучения разрешить функцию фазовой модуляции по глубине объекта не представляется возможным. Регистрации подвергается ее проекция на плоскость  $(x, y)$ . Профиль фазы предметного волнового фронта в моменты времени  $t_0$  и  $t_0 + \Delta t$  представлен на рисунке 3.9. Как видно из данного рисунка визуально сложно заметить какую-либо разницу. Это связано с тем, что спекл-структура «маскирует» изменения фазы, связанное с Доплеровским эффектом. В силу наличия информации о комплексной амплитуде волнового фронта, согласно уравнению (3.5), возможно восстановить разницу между фазовыми профилями

предметного волнового фронта в разные моменты времени и провести ее статистический анализ.

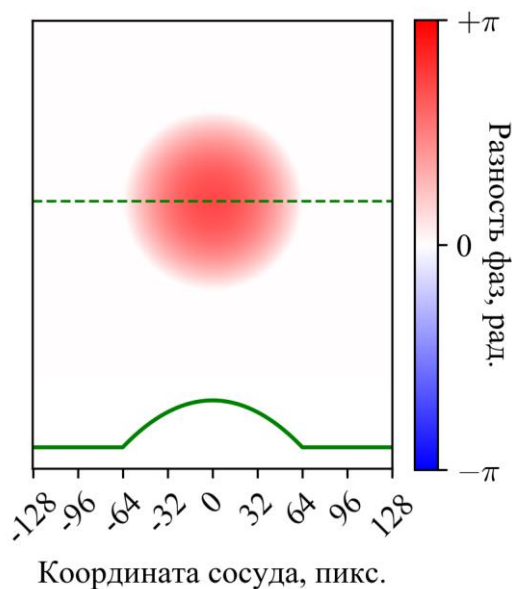


Рисунок 3.8 — Распределение дополнительной (по отношению к фону) фазовой задержки в поперечном сечении сосуда, вызванной эффектом Доплера. Данный фазовый профиль был получен исходя из профиля скорости, указанного на рисунке 3.7 и угла зондирования 85 градусов.

Как видно из рисунка 3.10 разница фаз смещена относительно нулевого значения, что обусловлено движением рассеивающих центров.

Смещение разности фаз в сторону отрицательных или положительных значений стоит интерпретировать как изменение направления движения частиц, как в классической Доплеровской анемометрии. На рисунке 3.10 отчетливо наблюдается заниженное значение фазового профиля, полученное при численном моделировании сигнала голографической лазерной спекл-визуализации, в сравнении с теоретической фазовой задержкой, вызванной эффектом Доплера. Данный факт связан, в основном, со следующими параметрами:

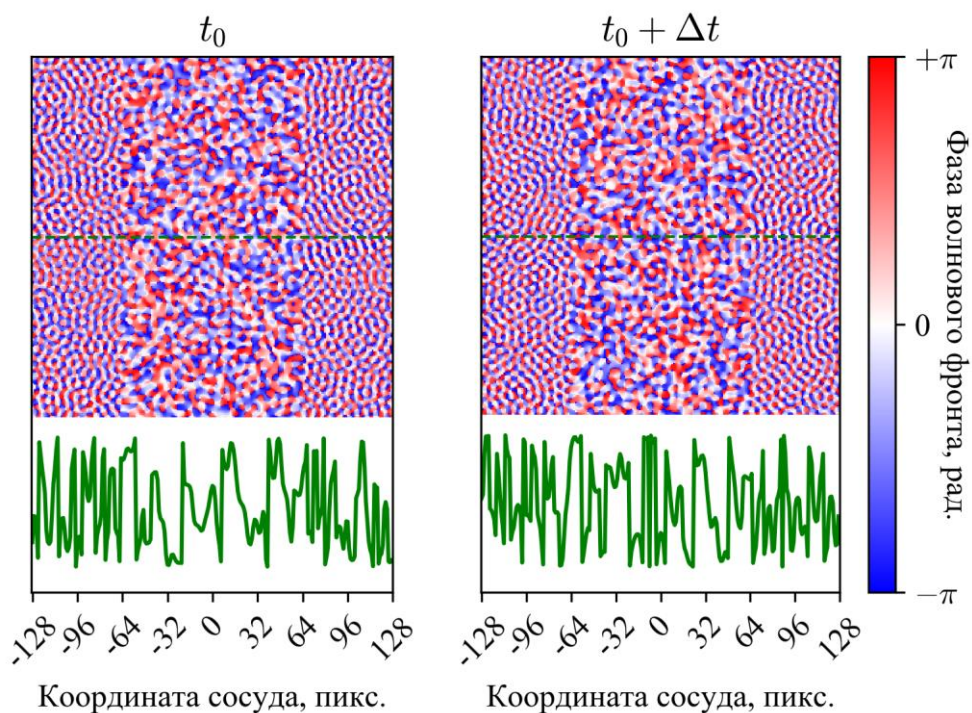


Рисунок 3.9 — Профиль распределения фазы предметного волнового фронта в моменты времени  $t_0$  и  $t_0 + \Delta t$  соответственно. Данные фазовые профили скорости были получены исходя из профиля скорости, указанного на рисунке 3.7 и угла зондирования лазерным пучком 85 градусов. Интервал времени  $\Delta t = 3$  мс.

1. Математическая функция арктангенс, используемая для восстановления фазы из комплексной амплитуды, возвращает значения в отрезке  $[-\pi, \pi]$ . Таким образом, любая разность фаз, по модулю превышающая  $\pi$  радиан будет преобразовано согласно выражению:

$$\Delta\varphi' = \begin{cases} \Delta\varphi - 2\pi, & \text{если } \Delta\varphi > 0 \\ \Delta\varphi + 2\pi, & \text{если } \Delta\varphi < 0 \end{cases} \quad (3.6)$$

Данный эффект принято называть заворачиванием фазы по модулю  $\pi$ . Исходя из этого условия и отсутствия возможности селекции сигнала по глубине, как например, в оптической когерентной томографии, детекции будет подвергаться усредненный по глубине объекта фазовый профиль,



что приводит к уменьшению разности фаз в центре сосуда (происходит усреднение фазовой задержки, вызванной как пристеночными, так и центральными компонентами потока).

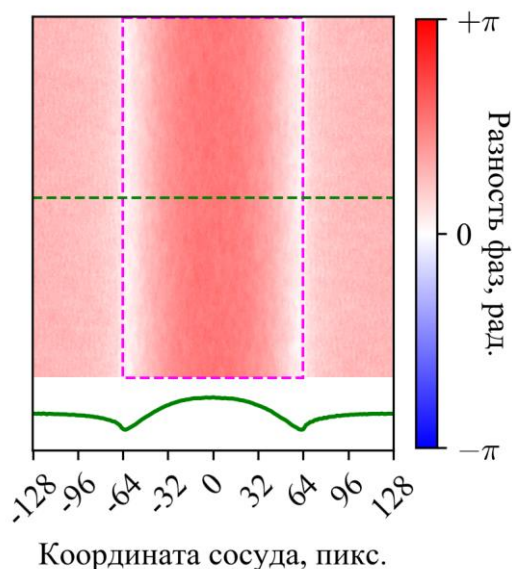


Рисунок 3.10 — Разница в фазе между двумя комплексными амплитудами волнового фронта, зарегистрированными в разные моменты времени.

Прямоугольником отмечены границы сосуда.

2. При появлении разности фаз, превышающей по модулю  $\pi$  радиан, фазовый профиль от сосуда претерпевает существенные изменения, которые частично проиллюстрированы на рисунке 3.12. Так, например, при нарастании линейной скорости от периферии к центру сосуда (или появлению эквивалентной временной задержки между регистрацией пары интерференционных картин) будет возможно наблюдение роста, а затем уменьшения разности фаз. Данный случай требует применения специализированных алгоритмов разворачивания фазы для адекватной характеристики фазовых профилей такого типа [142]. Однако, в силу интегрального характера измерений по глубине объекта, резкие фазовые переходы будут «смазываться» и/или взаимно уничтожаться из-за

усреднения (см рисунок 3.11), что делает затруднительным применение большого числа алгоритмов, которые работают на анализе фазовых разрывов такого рода или вовсе недопустимым постановку эксперимента в таком виде, в котором в поперечном сечении сосуда могут возникнуть фазовые разрывы.

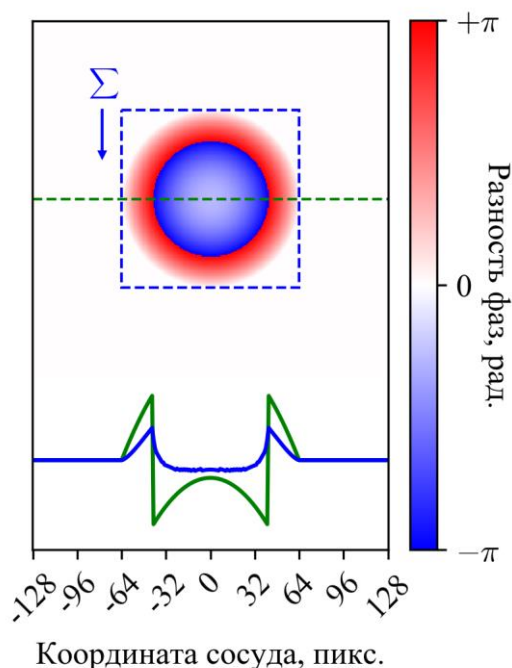


Рисунок 3.11 — Эффект «смазывания» фазовых переходов, вызванный интегральным характером измерений. Наблюдается существенное отличие суммарного фазового профиля (синяя линия) и теоретического профиля с фазовыми разрывами (зеленая линия).

При увеличении средней скорости движения или уменьшении частоты кадров матричного фотоприемника, будет наблюдаться все большее количество фазовых разрывов. В общем случае, для выполнения условия адекватной дискретизации фазового профиля сосуда необходимо чтобы на каждый фазовый разрыв приходилось не менее 2 точек выборки. Исходя из этого, максимально детектируемая скорость описывается выражением:

$$V_{\text{макс}} = \frac{\lambda}{4T}, \quad (3.7)$$

где  $\lambda$  — центральная длина волны излучения,  $T$  — период временной дискретизации комплексной амплитуды предметного волнового фронта. Стоит отметить, что данная формула выводится из соображения сонаправленности вектора скорости движения частиц и направления освещающего пучка. Данное условие практически никогда не может быть реализовано экспериментально, за исключением случаев, когда волоконный зонд в корпусе иглы вводится непосредственно в кровоток.

При существенном нарушении дискретизации фазовый профиль имеет вид равномерной прямой без явно выраженной параболической или иной зависимости распределения фазы в его поперечном сечении, что делает невозможным восстановление направления и среднего значения скорости движения частиц. На рисунке 3.12 представлены сравнительные результаты, полученные при фиксации скорости движения форменных элементов и изменении частоты кадров (временной задержки между измерениями комплексной амплитуды волны, отраженной от сосуда).

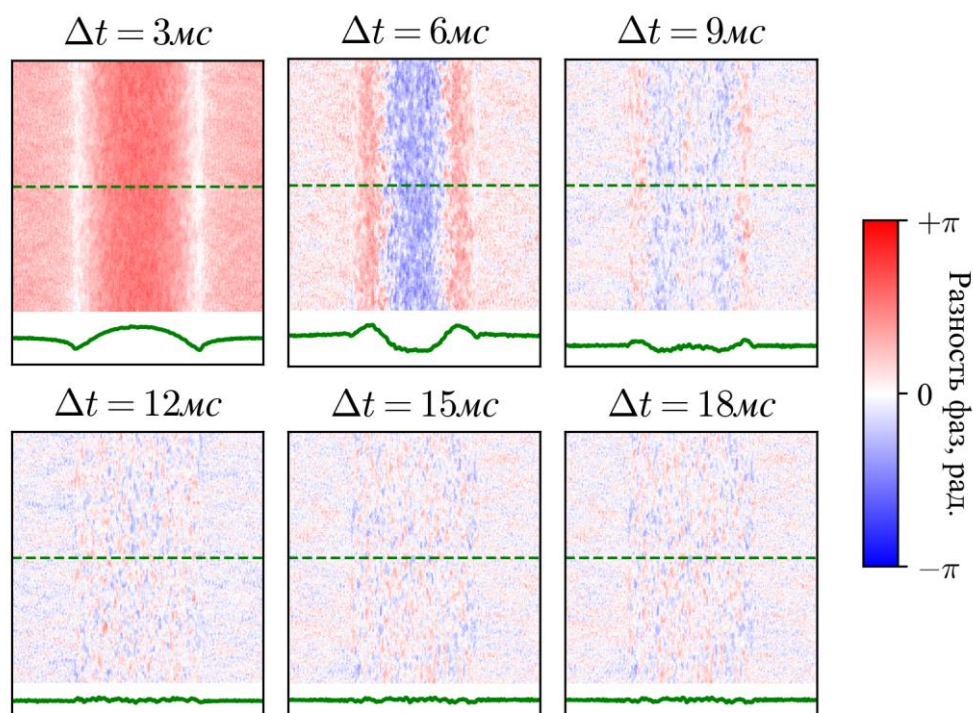


Рисунок 3.12 — Зависимость двумерной функции фазовой модуляции волнового фронта от временной задержки между спекл-картинами. Отчетливо наблюдается пороговое значение времени задержки (при данных параметрах системы регистрации: частота кадров 300 Гц, угол наклона зондирующего пучка по отношению к вектору скорости  $85^\circ$ , максимальная скорость при вершине потока 500 мкм/с) в 9 мс, при котором становится невозможно восстановить фазовый профиль в поперечном сечении сосуда, а следовательно и скорость движения кровотока- или лимфо-тока.

### 3.4 Зависимость сигнала лазерной спекл-контрастной визуализации от фокусировки оптической системы

Как было показано в разделе 2.3 при наличии дефокусировки оптической системы возможен переход от "кипения" спеклов к их трансляции в плоскости изображения, в силу наличия фазовой модуляции, вызванной движением форменных элементов. На рисунке 3.13 изображены мгновенные реализации

спекл-картин, при различной фокусировке оптической системы, в присутствии параболической фазовой модуляции в поперечном сечении сосуда.

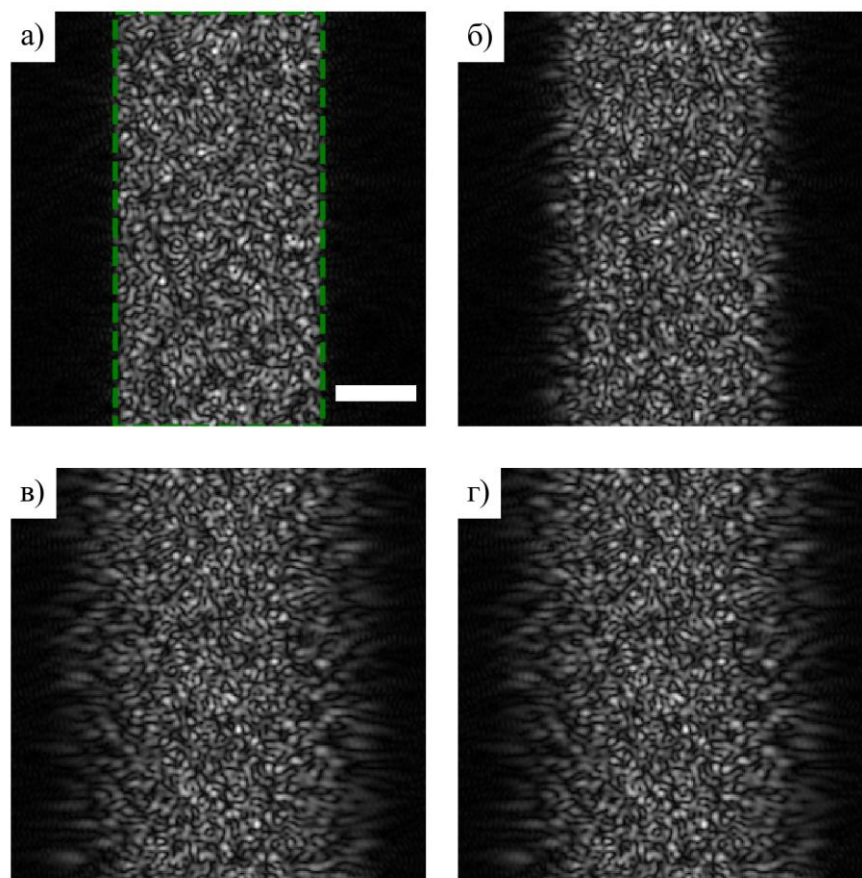


Рисунок 3.13 — Численная дефокусировка оптической системы при наблюдении сигнала лазерной спекл-визуализации от сосуда с характерной функцией фазовой модуляции, описанной в подразделе 3.3. Расстояние расфокусировки  $\Delta z = 0, 1.5, 3, 4.5$  мм для а), б), в), г) соответственно, относительно положения наилучшего фокуса. Масштаб 50 мкм.

Характер трансляции спеклов при расфокусировке оптической системы можно выяснить, анализируя форму функции фазовой модуляции в поперечном сечении сосуда. Примем параболическую форму функции фазовой модуляции, изображенную на рисунке 3.8. Сечение данной функции есть парабола, ограниченная диаметром сосуда. Абсолютное значение первой производной такой

функции представляет собой фрагмент функции  $f(x)=|x|$  (см рисунок 3.15), исходя из чего можно сделать вывод, что спеклы будут «сбегаться» от периферии сосуда к его центру со скоростью, зависящей от расстояния дефокусировки и поперечной пространственной координаты (см. рисунок 3.14).

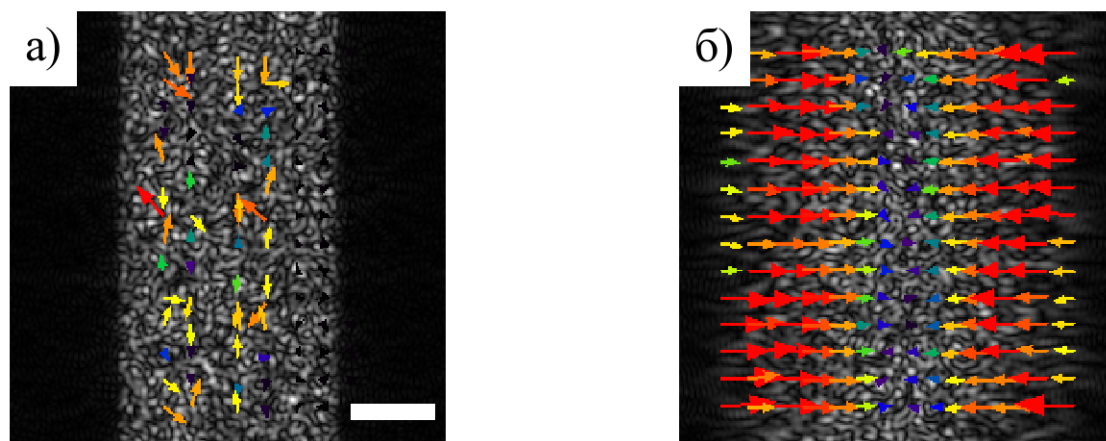


Рисунок 3.14 — Иллюстрация характера изменения динамики спеклов при параболической фазовой модуляции сосуда при расстояниях дефокусировки  $\Delta z = 0, 4.5$  мм для а) и б) соответственно, относительно положения наилучшего фокуса. Масштаб 50 мкм. Размер стрелки и теплота цвета прямо пропорциональны абсолютному значению амплитуды перемещения участка изображения. Расчет динамики спеклов производился с использованием алгоритма цифровой трассерной визуализации [<https://sites.google.com/site/qingzongtseng/piv>].

Было произведено исследование зависимости пространственного спекл-контраста от времени экспозиции при заданной скорости движения форменных элементов и различных значениях расфокусировки оптической системы. Для этого, согласно выражениям, описанным в главе 2, было произведено

компьютерное моделирование комплексного сигнала лазерной спекл-визуализации от сосуда. Для достижения локального размытия спекл-картин было произведено прогрессивное усреднение мгновенных реализаций результирующего спекл-поля, что эквивалентно постепенному повышению физического времени экспонирования фоточувствительного элемента в матричном фотоприемнике.

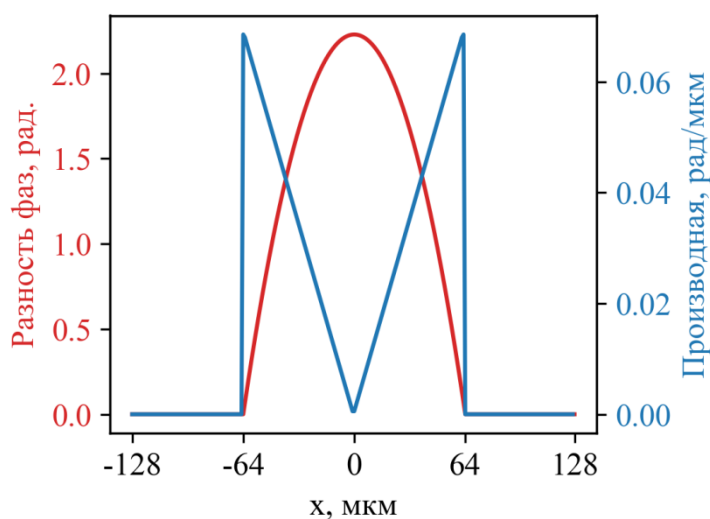


Рисунок 3.15 — Фазовый профиль в поперечном сечении сосуда и абсолютное значение его первой производной. Вид зависимости первой производной от координаты сосуда показывает нарастание скорости роста фазы (ускорение) от периферии к центру, что в свою очередь выражается в нарастании скорости трансляции спеклов при расфокусировки

Пространственный спекл-контраст был рассчитан как отношение среднеквадратичного отклонения флуктуаций интенсивности спекл-картины к среднему значений этих флуктуаций в скользящей области размером 5x5 пикселей. Для ускорения расчета пространственного спекл-контраста была произведена векторизация классической формулы 1.1 такая что:

$$K = \frac{\sqrt{\frac{1}{N^2 - 1} \left( raw \otimes kernel - \frac{1}{N^2} (raw \otimes kernel)^2 \right)}}{\frac{1}{N^2} (raw \otimes kernel)}, \quad (3.8)$$

где  $raw$  - исходное распределение интенсивности в спекл-картине,  $\otimes$  - операция двумерной свертки,  $kernel$  - ядро свертки размером  $N \times N$  вида:

$$kernel = \begin{pmatrix} 1 & \dots & 1 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & \dots & 1 \end{pmatrix} \quad (3.9)$$

На рисунке 3.16 изображена зависимость среднего значения пространственного спекл-контраста в области интереса (зеленый прямоугольник на рисунке 3.13). В силу наличия дефокусировки оптической системы, динамика спеклов представляет собой сумму «кипения» и трансляции от центра к периферии (из-за наличия параболической фазовой модуляции, вносимой эффектом Доплера). Большим дефокусировкам системы формирования изображения соответствует большая линейная скорость трансляции спеклов. Тем самым, происходит более быстрое затухание сигнала спекл-контраста с повышением выдержки фоточувствительного элемента, что негативно сказывается на работе метода, снижая его динамический диапазон измерений.

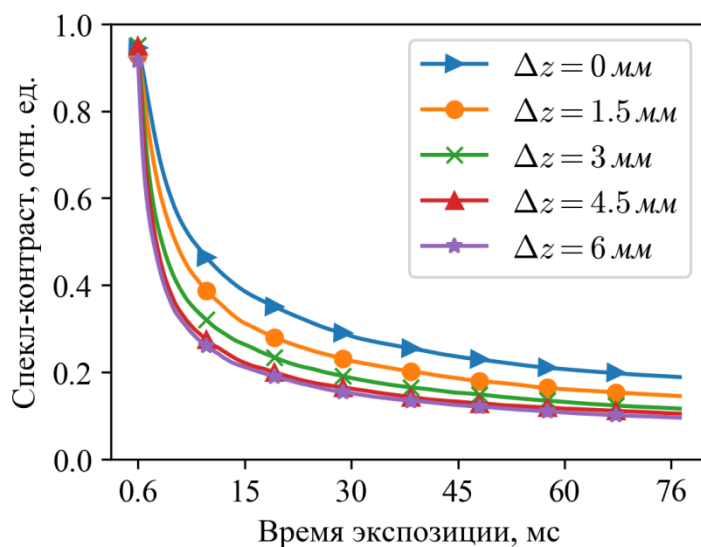




Рисунок 3.16 — Зависимость пространственного спекл-контраста от времени экспозиции матричного фотоприемника для различных значений расфокусировки оптической системы и фиксированной скорости движения форменных элементов.

Отчетливо наблюдается усиление затухания спекл-контраста с нарастанием значения расфокусировки.

### 3.5 Выводы

В главе 3 были рассмотрены результаты, полученные при численном моделировании сигнала лазерной спекл-визуализации от сосуда, с известным профилем скорости и концентрацией форменных элементов согласно теоретической модели, предложенной в главе 2.

Показана возможность восстановления направления и количественного значения средней скорости движения рассеивающих центров при известной геометрии эксперимента, а именно, угла между преобладающим направлением скорости движения частиц и зондирующим световым пучком.

Определены границы применимости фазового метода для характеристики потока, а именно, максимальная скорость, которая может быть достоверно измерена при фиксированной частоте кадров матричного фотоприемника.

Стоит отметить один уникальный вид распределения скорости движения частиц в потоке - "top-hat" или равномерный поток, то есть такой, в котором длина вектора скорости частицы мало зависит от ее положения в сосуде. Такие потоки могут наблюдаться в местах стыков двух сосудов разного сечения [143]. В таком случае, силам, возникающим в результате взаимодействия жидкости со стенками сосуда меньшего диаметра требуется некоторое время для торможения пристеночных слоев, в связи с чем на некотором малом интервале длины может наблюдаться поток с практически прямоугольным профилем скорости. При потоках такого типа распределение фазы в поперечном сечении сосуда -

константа, поэтому при восстановлении разности фаз функцией возникает неопределенность в связи с отсутствием фазовых разрывов. В таком случае разность фаз всегда принимает некое постоянное значение из отрезка  $[-\pi, \pi]$ , в независимости от абсолютного значения скорости движения и частоты временной дискретизации. Однако, в силу малой распространенности таких сосудистых переходов в биологических объектах, при их оптической визуализации данными эффектами можно пренебречь.

Необходимым условием работы фазового метода является достаточно малое время экспозиции, в сравнении с временем декорреляции спекл-картины. При несоблюдении данного условия, как указывалось ранее, будет наблюдаться локальное снижение спекл-контраста, а вместе с ним и снижение или полное исчезновение видности интерференционных полос, что сделает невозможным разделение интерференционных компонент в пространственном спектре цифровой интерферограммы.

Наряду с фазовыми, оценка скорости может быть осуществлена методами, основанными на динамике интенсивности предметного волнового фронта, такими как расчет пространственного и временного спекл-контраста, что делает протокол регистрации интерференционных спекл-картин универсальным, а данные, полученные в результате эксперимента или моделирования пригодными для обработки довольно широким набором методов.

Был произведен анализ зависимости сигнала лазерной спекл-контрастной визуализации от величины дефокусировки системы. Выявлен негативный тренд к уменьшению динамического диапазона измеряемых скоростей с увеличением дефокусировки оптической системы. Данный факт напрямую связан с профилем фазовой модуляции в поперечном сечении сосуда, возникающий в связи с рассеянием света на движущихся частицах.

Основные результаты опубликованы:

- 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.
- 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.
- 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.

## **Глава 4. Реализация голографического метода лазерной спекл-визуализации, апробация предложенного метода оценки направления и скорости на фантомных экспериментах и *in vivo* исследованиях церебрального кровотока у новорожденных гипертензивных крыс в условиях развития инсульта.**

### **4.1 Постановка задачи**

Фантомный эксперимент, с последующими *in vivo* исследованиям, являются неотъемлемой частью валидации любой теоретической модели.

Наиболее распространенными оптическими схемами, применяемыми в методах лазерной спекл-визуализации, основанных на оценке флуктуаций интенсивности предметного волнового фронта (пространственное или временное исследование динамики контраста спеклов), являются микрообъектив малого увеличения и апертуры (фото-объектив), формирующий распределение комплексной амплитуды в плоскости матричного фотоприемника, а также, источник когерентного освещения, излучение которого в виде плоской или сферической волны доставляется на объект исследования под некоторым, ненормированным, углом к оптической оси системы [38; 50; 52; 132—135; 144—146].

В ряде работ в систему регистрации устанавливают анализатор, чья ось поляризации параллельна или перпендикулярна поляризации освещения, для детектирования спекл-картин, сформированных при прямом отражении (баллистическими фотонами) или фотонами, подвергнутыми многократному рассеянию в толще образца [146—151].

Авторам известна работа [152], в которой происходит модуляция фазы зарегистрированной волны при помощи пространственного светового

модулятора, работающего на жидко-кристаллических ячейках. Такое дополнение дает возможность итеративного подбора компенсирующей фазовой маски, для увеличения глубины зондирования метода, а также получения количественной информации о скорости движения. Однако, данная схема не лишена недостатков, низкая скорость работы вкупе с высокой стоимостью световых модуляторов такого рода существенно снижает распространенность схем данного типа.

Необходимо отметить наличие оптических конфигураций, реализующих осевую голографическую схему [153—156]. В которых, с использованием высокоскоростной камеры, с частотой кадров до 75 кГц, детектируется интерференционная картина, формируемая плоской опорной и предметной волной, чей частотный спектр был уширен Доплеровским эффектом. В силу наличия данного уширения в плоскости регистрации наблюдается биение интенсивности, которое и подлежит анализу математическим аппаратом Фурье. Снятые с такой частотой объемы данных невозможно проанализировать в реальном масштабе времени, что приводит к необходимости пост-обработки сигнала для получения результатов.

Эффектам фокусировки в методе лазерной спекл-визуализации уделяется мало внимания. Известно несколько работ, затрагивающих эту тематику [73—75]. В силу используемых фото-объективов с малой числовой апертурой, глубина резко-изображаемого пространства, как правило, полностью перекрывает максимальную глубину оптического зондирования. Наряду с этим, в силу достаточно большой протяженности спеклов вдоль оптической оси, фокусировка системы в относительно широких пределах (определяемых числовой апертурой объектива) не приводит к существенному изменению распределения интенсивности спекл-картины. Целями практических исследований, изложенных в главе 3 являются:

1. Сборка экспериментальной установки, учитывающей теоретические аспекты, изложенные в главе 1.

2. Проведение отладки установки на динамическом фантоме сосуда, для определения динамического диапазона измеряемых скоростей движения, а также определения границ применимости метода голографической лазерной спекл-визуализации.
3. Проведение *in vivo* исследований на лабораторных новорожденных крысах в условиях моделированного неонатального стресс-индуцированного инсульта, определение ранних маркеров развития данной патологии.
4. Исследования мозговой гемодинамики в условиях моделирования нарушения функционирования гемато-энцефалического барьера путем высоко-интенсивного звукового воздействия.
5. Валидация возможности метода статистической оценки функции фазовой модуляции предметного волнового фронта к предоставлению новой диагностической и количественной информации о направлении и величине скорости движения рассеивающих центров на фантомном и *in vivo* исследовании.

## 4.2 Экспериментальная установка

Перечень основных оптических компонентов установки приведен в таблице 2.

Таблица 2 — Табулированный список основных оптических элементов, использованных при сборке экспериментальной установки

---

Лазер He-Ne HNL210L, 632.8 нм, 21.5 мВт, Thorlabs inc.

Одномодовый волоконный делитель с сохранением поляризации PMC630-50BAPC, Thorlabsinc.

Волоконные коллиматоры, F810APC-780, Thorlabs inc.

Матричный фотоприемник, Basler Aca2040-180km

Объектив Tamron 21HC, 50 мм, F-stop 2.2-22

Тубусная линза LA1461, 250 мм, Thorlabs inc.

Светоделительный кубик BS013, Thorlabs inc.

Анализатор LPVISE100-A, Thorlabs inc.

---

Оптическая схема экспериментальной установки представлена на рисунке 4.1 и является логическим развитием схемы, иллюстрированной рисунком 2.4. Излучение гелий-неонового лазера было заведено в одномодовый волоконный делитель с сохранением поляризации, выходы делителя обозначены как В1 и В2 соответственно. В силу малого диаметра центрального световода, торцы волокон можно рассматривать как точечные источники света, обладающие высокой степенью пространственной когерентности. По средствам зеркала З, имеющего ось качения, и дополнительной оптики излучение лазера доставляется на объект исследования. Наклон зеркала необходим для придания угла между освещающим пучком и вектором скорости движения рассеивающих центров. Зеркало находится в задней фокальной плоскости тубусной линзы, что делает плоскость А и плоскость зеркала оптически сопряженными, то есть, при углах наклона зеркала не выходящих за пределы конуса, определяемого числовой апертурой объектива, освещающий пучок не будет выходить из поля зрения, а лишь приобретать соответствующий наклон (фазовую модуляцию). В системе освещения и регистрации установлен анализатор АН, чья ось поляризации параллельна исходной поляризации лазера. Данный анализатор позволяет отсечь паразитные состояния поляризации, возникающие в волоконном делителе, в силу его неидеальности, а также произвести селекцию фотонов, отраженных от объекта исследования.

Для контроля интенсивности опорного поля при визуализации объектов с разной отражающей способностью, в референтный канал была установлена сборка из двух поляризаторов П1 и П2, причем ось поляризации П2 параллельна оси поляризации анализатора АН. Это условие необходимо соблюдать для достижения максимального контраста интерференционных полос в плоскости

регистрации Б. Вращением поляризатора П1 устанавливалась необходимая интенсивность опорного поля.

В качестве объекта исследования был выбран медицинский катетер с наружным диаметром 0.68 мм и внутренним - 0.3 мм, изготовленный из прозрачного силикона, по которому производилась прокачка слабо рассеивающей жидкости (1% водный раствор клея ПВА). Прокачка осуществлялась при помощи инсулинового шприца объемом 1 мл и прецизионной подвижки с делением 10 мкм. Линейная скорость подвижки была установлена 1 мкм/с, что соответствовало теоретической средней скорости движения рассеивателей  $\approx 280$  мкм/с.

Частота кадров матричного фотоприемника была установлена равной 300 Гц, а время экспонирования 500 мкс, что обеспечивало достаточную временную дискретизацию комплексной амплитуды предметного волнового фронта и минимизацию эффектов, связанных со снижением контраста спеклов.

Зарегистрированная цифровая голограмма катетера и ее пространственный спектр представлены на рисунке 4.2. Процедура восстановления комплексной амплитуды волнового фронта, а также функции фазовой модуляции была выполнена согласно положениям, изложенным в главе 2.

На рисунке 4.3 изображены характерные карты распределения скорости в капилляре, восстановленные из двумерной функции фазовой модуляции предметного волнового фронта, отражающие различное направление и скорость движения потока жидкости при прямом и обратном движении поршня в шприцевой помпе.

Как видно из рисунка 4.3, метод оценки функции фазовой модуляции позволяет производить как количественные измерения средней скорости движения частиц, так и определение направления движения частиц по отношению к освещающему световому пучку, при его известном и контролируемом наклоне.



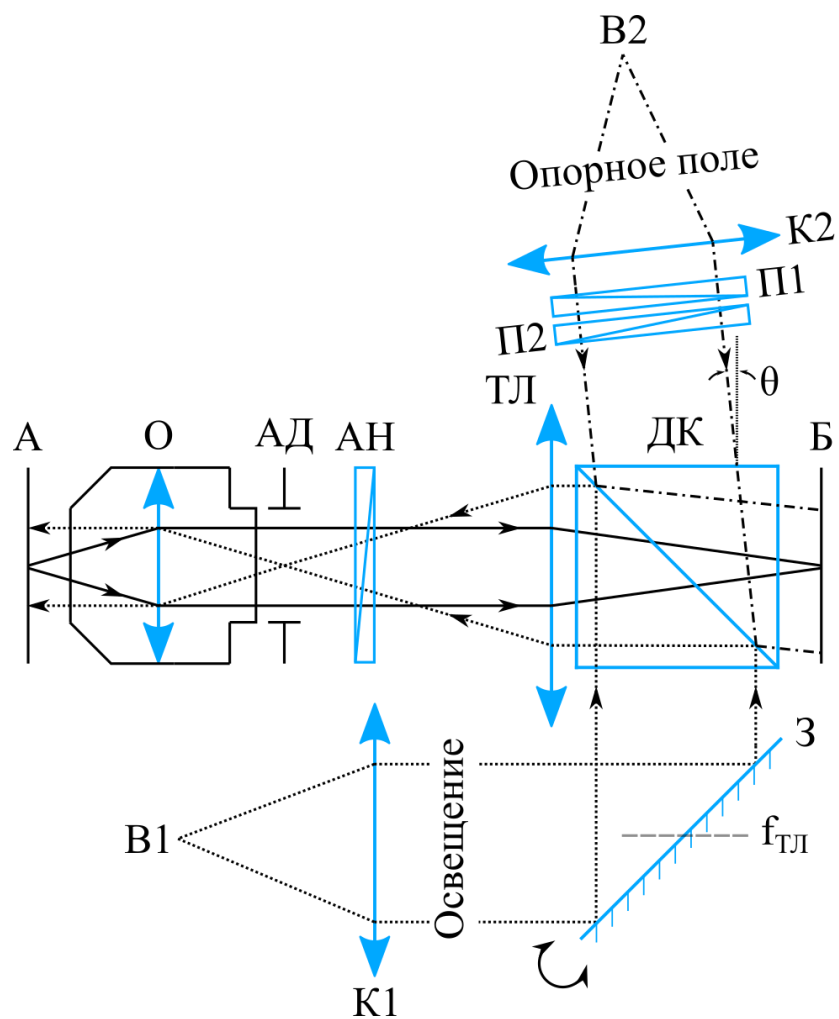
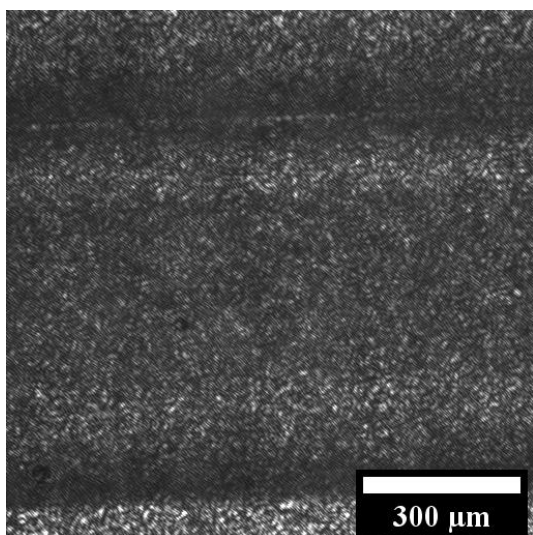
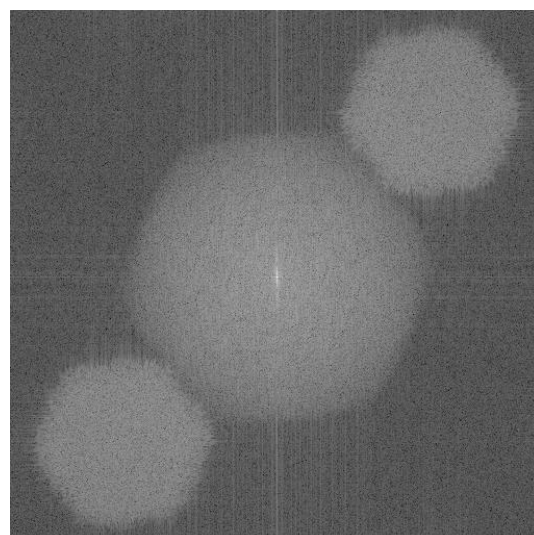


Рисунок 4.1 — Оптическая схема интерференционного микроскопа на отражение, где А - плоскость объекта, О - объектив, АД – апертурная диафрагма (в данном случае встроенная в объектив), АН - анализатор, ТЛ - тубусная линза, ДК - делительный кубик, Б - плоскость матричного фотоприемника, В1 и В2 - выходные торцы волоконного делителя, К1 и К2 - коллимационные линзы, З - зеркало, П1 и П2 - сборка поляризаторов.



а)



б)

Рисунок 4.2 — а) - Голограмма катетера, малое время экспонирования матричного фотоприемника позволят получать мгновенные реализации спекл-картины, свободные от локального размытия, б) - пространственный спектр голограммы, в которой в явном виде имеет место полное разделение интерференционных слагаемых, представленных в уравнении 2.14, что свидетельствует об оптимальной настройке оптической системы, форма интерференционных порядков обусловлена физической формой апертурной диафрагмы.

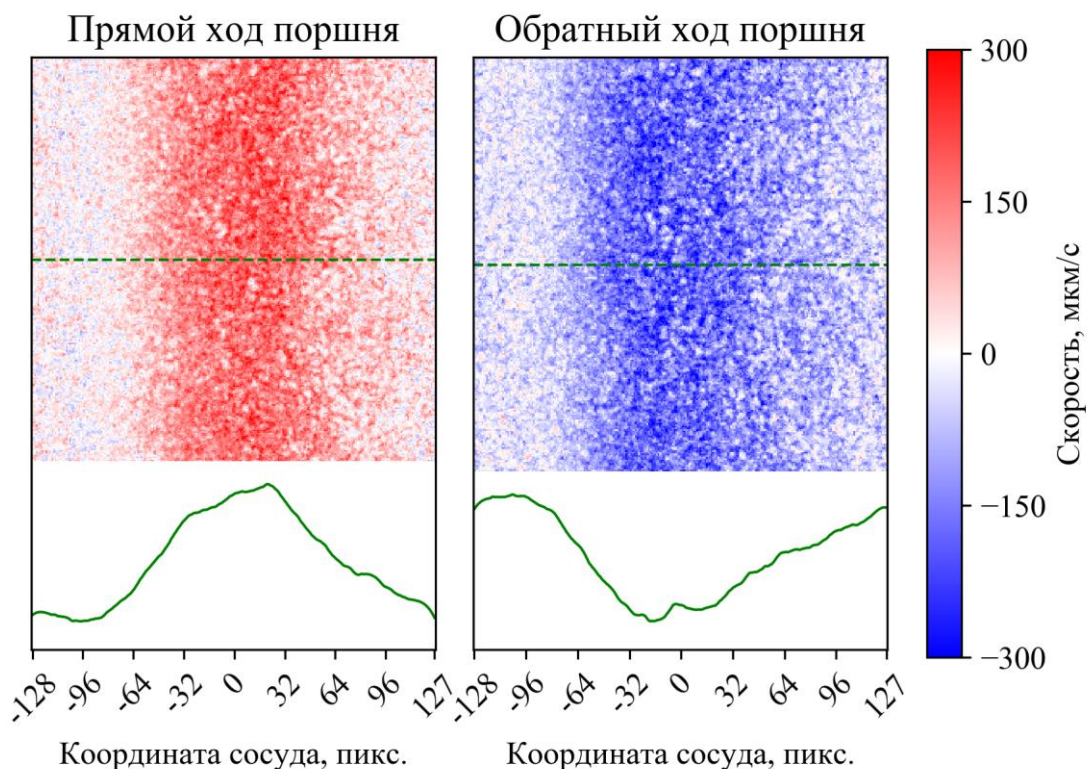


Рисунок 4.3 — Профили скорости в поперечном сечении капилляра, восстановленные предложенными методом голографической лазерной спекл-визуализации. Для повышения соотношения сигнал шум производилось суммирование изображения по строкам, а также фильтрация результирующего профиля скорости фильтром Савитского-Голея.

### 4.3 Экспериментальное применение численной фокусировки в методе лазерной спекл-визуализации при оценке функционального состояния церебральных сосудов

Как было показано ранее, в большинстве случаев использования метода лазерной спекл-визуализации для прижизненной характеристики крово- и лимфотоков, аспектам фокусировки не уделяется существенного внимания, в силу сравнительно малых числовых апертур используемых объективов.

Однако, сигнал метода лазерной спекл-визуализации в большой степени зависит от объемной концентрации форменных элементов крови или лимфы.

Данное утверждение напрямую следует из формулы расчета спекл-контраста, в которой в явном виде фигурирует средняя интенсивность спекл-картины. В связи с чем, измерения диаметра сосуда и его учет в расчете спекл-контраста является обязательным [122].

Проблемы фокусировки сильно проявляются при визуализации внутренних органов, которые не могут быть полностью изолированы от туловища объекта исследования, например, легкие, печень, почки и т.д, а также при исследовании микрогемодинамики с высоким пространственным разрешением. В силу дыхательной и/или сердечной активности, перемещения объекта исследования могут быть больше, чем глубина резко-изображаемого пространства объектива, в связи с чем возникает эффект существенной расфокусировки сосудистых сетей, что делает невозможным достоверную оценку диаметров сосудов.

Регистрация комплексной амплитуды предметного волнового фронта в методе лазерной спекл-визуализации позволяет производить численную фокусировку после регистрации цифровой голограммы. Численная фокусировка осуществляется на основе распространения углового спектра комплексной амплитуды в свободном пространстве [126]. Функция, описывающая распространение углового спектра, определяется выражением[126]:

$$t(z) = \exp\left(-ikz\sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2}\right), \quad (4.1)$$

где  $k = 2\pi/\lambda$  - волновой вектор,  $f_x$  и  $f_y$  - пространственные частоты. Одним из граничных условий применимости метода углового спектра является расстояние распространения волнового фронта (фокусировки), которое должно быть существенно большим, в сравнении с длиной волны света, используемого для записи цифровой голограммы. Действие трансферной функции 4.1 на угловой спектр плоских волн интерпретируется как внесение дополнительной фазовой задержки для каждой плоской волны, определяемой парой пространственных частот  $f_x$ ,  $f_y$ . Это связано с тем, что плоские волны, распространяющиеся под

относительно большими углами к оптической оси, проходят геометрически большие расстояния до расчетной плоскости, в сравнении с параксиальными волнами. Пример фазовой трансферной функции представлен на рисунке 4.4.

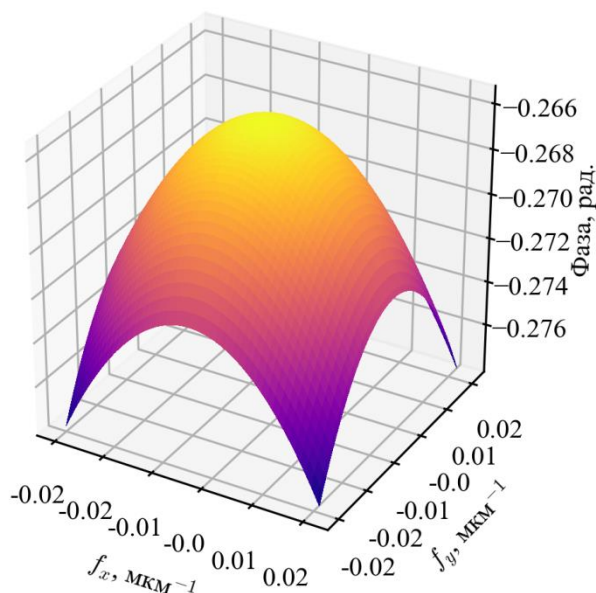


Рисунок 4.4 — Вид фазовой задержки, вносимой трансферной функцией для каждой плоской волны, определяемой парой пространственных частот  $(f_x, f_y)$ .

*In vivo* эксперимент производился на линейной мыши, которая была введена в состояние анестезии путем внутрибрюшной инъекции Нурпорм (0.4мл/кг). Глубина наркоза контролировалась путем периодической проверки ножного рефлекса. Для улучшения качества изображения часть черепной коробки была трепанирована при помощи специализированной бор-машинки, твердые мозговые оболочки были сохранены интактными. Лабораторная мышь была зафиксирована в специализированной установке, обеспечивающей фиксацию головы в процессе эксперимента. Анализ производился путем оценки временной динамики интенсивности спекл-структур. Время экспозиции было установлено равным 500 мкс. Как видно из рисунка 4.5а) имеет место явная расфокусировка оптической системы, которая может быть вызвана как артефактами движения, так и

недостаточно точной настройкой первоначального фокуса. В силу чего, диаметр большого числа сосудов невозможно измерить с приемлемой точностью.

Голографическая схема регистрации позволяет производить численную коррекцию положения наилучшего фокуса без применения сложных механических систем и узлов обратной связи, которые могут нарушить стабильность установки. Наряду с этим, информация об угловом спектре предметного фронта и его комплексной амплитуде дает возможность производить коррекцию aberrаций, что также положительно сказывается на качестве спекл-изображения.

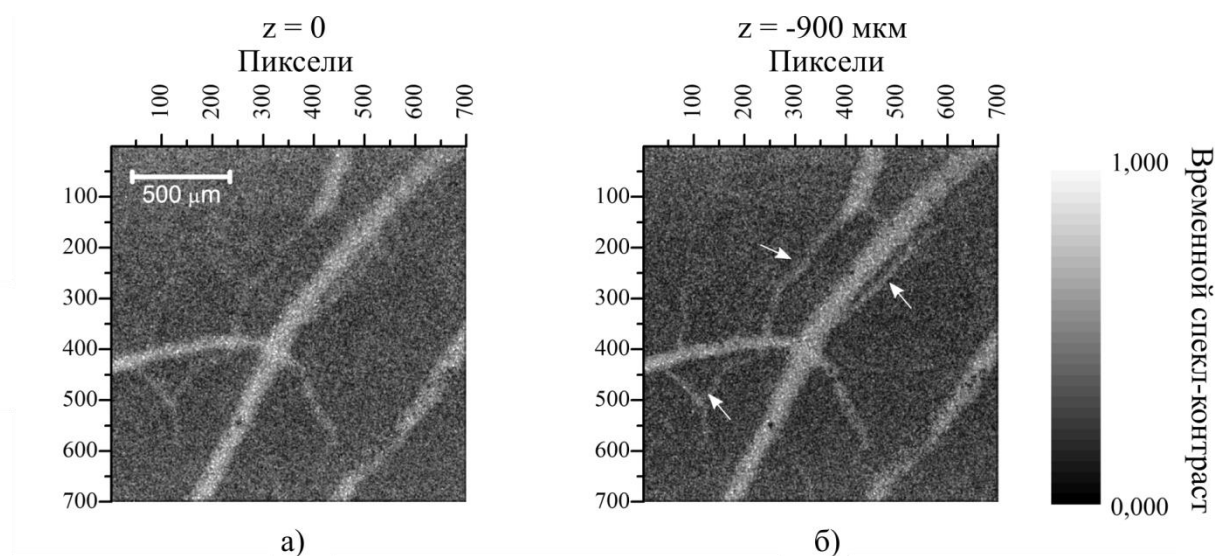


Рисунок 4.5 — Применение численной фокусировки в методе голографической лазерной спекл-визуализации для коррекции положения наилучшего фокуса и улучшения резкости границ сосуда, для более точного измерения диаметра.

Белыми стрелками отмечены четкие границы сосудов после выполнения численной фокусировки системы.

Стоит отметить тот факт, что методы численной фокусировки не способны предоставить возможность селекции сигнала по глубине в условиях рассеивающей среды. Данный эффект связан с тем, что численная фокусировка

позволяет произвести распространение волнового фронта в свободном пространстве, то есть корректному распространению подвергается волновой фронт (световая волна со сложной пространственной структурой), сформированный при однократном его отражении от объекта. Вкупе с использованием линзы малой числовой апертуры, глубина резко-изображаемого пространства которой существенно превышает длину свободного пробега фотона (см. рисунок 4.6), методы численной фокусировки помогают лишь скорректировать аксиальные перемещения объекта вызванные дыханием или спонтанными движениями.

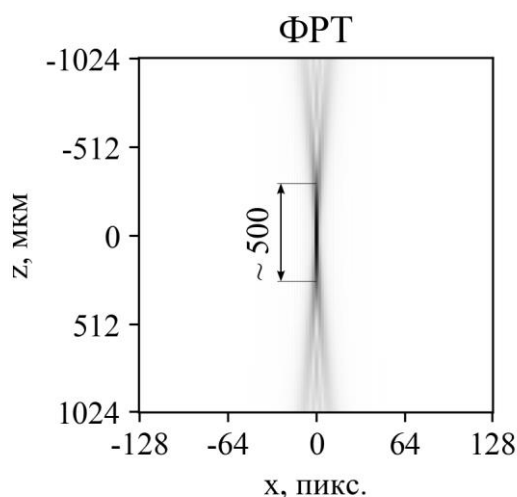


Рисунок 4.6 — Продольное сечение оптической перетяжки (функции рассеяния точки, ФРТ), сформированной линзой малой числовой апертуры (0.03). Глубина резко-изображаемого пространства такой линзы равна  $\approx 500$  мкм при длине волны источника излучения в 632.8 нм.

Другим, немаловажным преимуществом использования численной фокусировки является возможность визуализации относительно крупных органов, обладающих существенной кривизной поверхности, например почки или легкие. При оптическом наблюдении таких органов с существенным полем зрения, за счет наличия кривизны, некоторые участки ткани могут уходить из области резко-изображаемого пространства. В таких случаях численная фокусировка способна

восстановить всю поверхность объекта «в фокусе» без каких либо механических элементов всего из одной цифровой голограммы объекта.

#### **4.4 *In vivo* исследования церебрального кровотока методами голографической лазерной спекл-визуализации в условиях развития инсульта у гипертензивных крыс**

Апробация предложенной методики анализа функции фазовой модуляции предметного волнового фронта для установления средней скорости и направления движения кровотока производилась на новорожденных беспородных крысах возрастом 3 дня. Животные были разделены на три группы: 1) интактные новорожденные крысы (контрольная группа  $n=10$ ); 2) стрессорная группа 1 (4 часа после отмены стрессорных раздражителей, пред-инсультное состояние  $n=15$ ); стрессорная группа 2 (24 часа после отмены стрессорных раздражителей, пост-инсультное состояние  $n=12$ ). Для индуцирования геморрагического инсульта стрессорные группы животных 1 и 2 подвергались звуковому воздействию высокой интенсивности (120 дБ, 17 Гц) на протяжении 10 секунд с последующим перерывом в 60 секунд. Данный цикл повторялся на протяжении двух часов.

Время экспозиции камеры было установлено равным 300 мкс, частота записи кадров 390 Гц, мощность лазерного излучения на объекте исследования не превышала 2 мВт.

При помощи зеркала 3 (см. рисунок 4.1) подбирался наклон освещающего пучка по отношению к вектору скорости движения форменных элементов крови. Минимизация угла наклона пучка позволяет измерять сравнительно быстрые потоки, однако при условии перпендикулярности освещающего пучка и вектора скорости движения крови в сосудах имеет место ненулевой Доплеровский сдвиг частоты, возникающий в силу распределения форменных элементов крови по скорости движения и направлению в трех-мерном пространстве. Максимальный угол наклона освещающего пучка в экспериментальной установке составлял 88



градусов. Данный факт обусловлен необходимостью уменьшения эффективной числовой апертуры объектива для разделения интерференционных порядков в пространственном спектре голограммы.

На рисунке 4.7 представлены типичные двумерные карты распределений скоростей кровотока, полученные путем анализа функции фазовой модуляции предметного волнового фронта, отраженного корой головного мозга крысы в нормальном состоянии (контроль), а также спустя 4 и 24 часа после отмены стрессорного воздействия. Анализу подвергался сагиттальный синус, который является мажоритарной веной, собирающей в себя большие объемы крови и перенаправляющей их в периферийную циркуляцию.

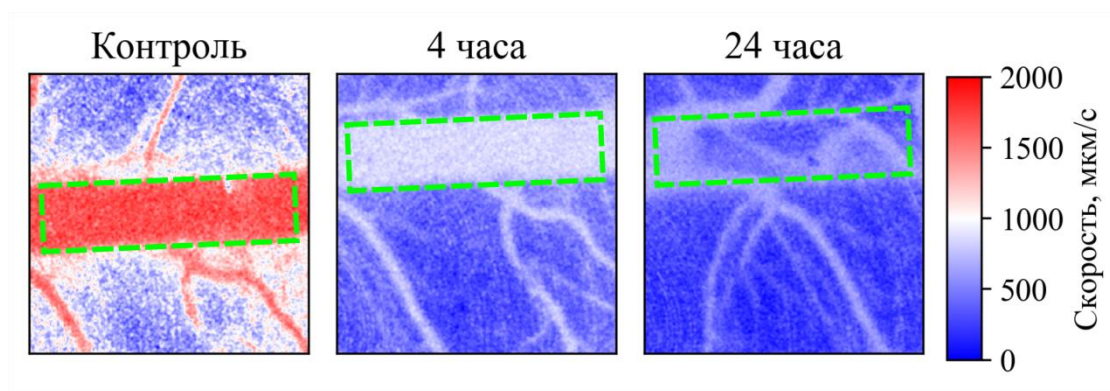


Рисунок 4.7 — Типичные двумерные карты распределения скоростей движения форменных элементов крови в коре головного мозга крысы при нормальном и патологическом состоянии (4 и 24 часа после отмены стрессорного воздействия).

Численный анализ карт распределения скоростей в различных группах животных представлен на рисунке 4.8. Данные были получены путем статистического анализа средней скорости движения эритроцитов в регионах интереса, обозначенных прямоугольниками на рисунке 4.7. Отчетливо наблюдается падение средней скорости движения эритроцитов в  $\approx 1.7$  и  $\approx 2.3$  раза, а также увеличение диаметра сагиттального синуса на  $\approx 13\%$  и  $\approx 20\%$  в

стрессорных группах 1 и 2 (4 и 24 часа после отмены стрессорного воздействия соответственно).

В данном исследовании, с использованием предложенного метода голографической лазерной спекл-визуализации были получены экспериментальные данные, показывающее пагубное воздействие стресса, в частности его способность к провоцированию инсульта у новорожденных особей крыс.

Были выявлены динамики скорости кровотока и диаметра сагиттальной вены в первые 24 часа развития стресс-индуцированного инсульта. Несмотря на то, что в первые 4 часа (стадия молчания) не было зарегистрировано никаких визуальных признаков наличия инсульта у новорожденных крыс (расстройство поведения, дезориентация), анализ гемодинамики показал расширение сагиттального синуса и резкое падение скорости кровотока, аналогичная негативная динамика наблюдалась и на 24 час.

Другими, независимыми авторами, также было зарегистрировано снижение церебрального венозного оттока на фоне возникновения интракраниальных геморрагий [157]. Важно отметить, что латентный период при повреждающем действии стресса на мозговое кровообращение не сопровождается существенными нарушениями в функционировании крупных артерий. Из этого можно сделать вывод, что нарушение церебрального венозного оттока является ранним маркером патологических изменений, связанных с интракраниальными геморрагиями.

Разрывы сосудов мозга (24 часа после отмены стрессорного воздействия) сопровождаются прогрессирующим увеличением патологических изменений в мозговом кровообращении: существенное увеличение диаметра сагиттальной вены, сопровождающиеся вазодилатацией мозговых артерий и падением скорости кровотока в них, что свидетельствует о развитии внутричерепной гипотензии. Данные выводы и результаты согласуются с актуальными исследованиями,

подтверждающими, что гипотензия и низкое церебральное перфузионное давление сопровождают интракраниальные геморрагии [158].

Предполагается, что снижение микроциркуляции (4 часа после отмены стрессорного воздействия) с потерей способности к саморегуляции в цереброспинальных сосудах ухудшает оксигенацию тканей мозга [159]. У больных с субарахноидальным кровоизлиянием исследователи обнаружили, что падение уровня микроциркуляции и оксигенации связано с плохим неврологическим состоянием [160].

Таким образом, результаты, полученные при помощи предложенного метода голографической лазерной спекл-визуализации показывают, что снижение церебрального артериального и венозного кровотока связано с тяжестью повреждающего эффекта стресса на гемодинамику головного мозга. Ранняя стадия интракраниальной геморрагии характеризуется уменьшением венозного оттока из полости черепа без каких-либо изменений в кровотоке мозговых артерий. Прогрессирование венозной недостаточности у крыс с интракраниальной геморрагией провоцирует вторичные патологические изменения в церебральном артериальном кровообращении через снижение артериального кровотока и последующее развитие церебральной гипотензии. Эти факты позволяют предположить, что стресс-индуцированные изменения в церебральном венозном кровообращении являются более показательными компонентами мозговой гемодинамики для диагностики риска развития интракраниальной геморрагии, чем изменения в мозговом артериальном кровотоке.

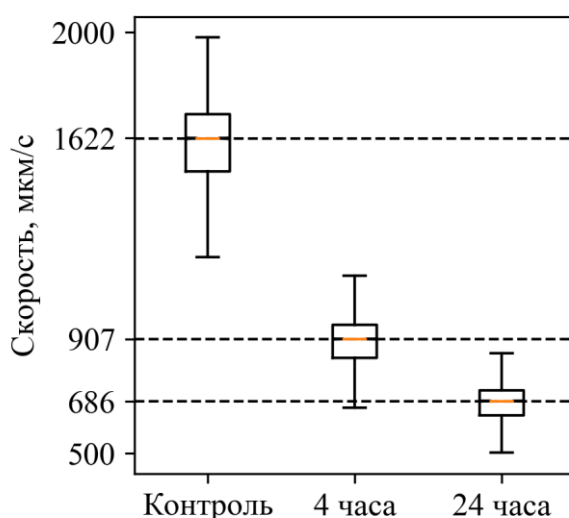


Рисунок 4.8 — Венозная гемодинамика в первые 24 часа развития стресс-индуцированного неонатального инсульта у новорожденных крыс. Отчетливо наблюдается негативная динамика развития болезни, выраженная в существенном падении скорости кровотока в сагиттальном синусе, что свидетельствует о прогрессировании венозной недостаточности и ухудшении кровоснабжения тканей головного мозга крысы. Результаты характеризуются значением  $p < 0.05$  и считаются статистически достоверными.

#### 4.5 *In vivo* исследования реакции церебрального кровотока методами голографической лазерной спекл-визуализации при нарушениях в функционировании гематоэнцефалического барьера

Воздействие звука высокой интенсивности способно нарушать нормальное функционирование гематоэнцефалического барьера [161]. Схожесть моделей индуцирования инсульта и нарушения работы ГЭБ позволяет оценивать патологические изменения в мозговом кровообращении, возникающие на фоне абнормальной работы ГЭБ на тех же группах животных, что и в пункте 4.4. Для более детального анализа ранней динамики развития патологии была добавлена еще одна группа животных ( $n=10$ ), в которой показатели мозгового

кровообращения оценивались спустя 90 минут после акустического открытия гематоэнцефалического барьера.

Фигура 4.9 отражает зависимость между временным интервалом, прошедшим с момента открытия ГЭБ и изменениями мозговой гемодинамики. Результаты показывают, что в первые 90 минут после отмены акустического воздействия имеет место существенное падение функциональной активности венозных сосудов, что обуславливается повышением проницаемости ГЭБ к тяжелым и легким молекулярным соединениям [161]. Восстановление работы гематоэнцефалического барьера спустя 4 часа после отмены звукового воздействия сопровождается нормализацией венозного оттока (в сравнении с 90 минутами), однако, пролонгированное накопление жидкости в паренхиме мозга, вызванное длительным восстановлением после вазогенного отека, вызывает повторное нарушение работы ГЭБа спустя 24 часа после отмены звукового воздействия. Механизмом, лежащим в основе данного отложенного эффекта, возможно, является повышение внутричерепного давления [161].

В микро-циркуляционном русле не было зарегистрированного никаких статистически значимых изменений, одной из причин данного эффекта может быть компенсаторный механизм, включающий в себя перераспределение потоков крови в мозговых венах для поддержания жизне-деятельности организма в условиях резко-развивающейся патологии.

На сегодняшний момент, в силу малой изученности проблематики локального открытия гематоэнцефалического барьера, сравнение результатов, полученных в рамках данного исследования с мировыми научными группами затруднено. О. Prager и соавторы, с использованием методики точечной лазерной Доплеровской флоуметрии показали, что при открытии ГЭБ с помощью фармакологического агента (дезоксихолевая кислота), происходит повышение показателей венозного и артериального кровотока, а в случае тромбозного сценария повышения проницаемости ГЭБа имеет место рост артериального, но

существенное падение венозных компонентов скорости церебрального кровотока [162]. С. J. Эк с соавторами, а также Н. Hagberg с соавторами показали снижение локального индекса церебрального кровотока в месте «открытия» гематоэнцефалического барьера при гипоксической ишемии головного мозга мыши [20; 163].

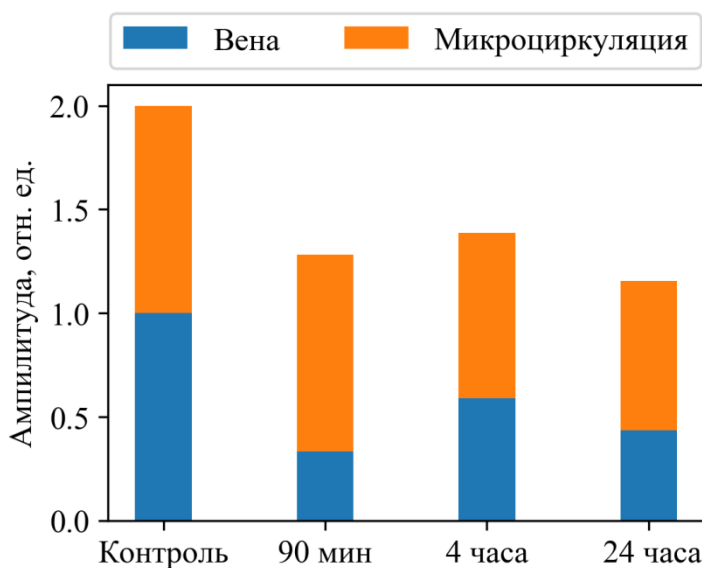


Рисунок 4.9 — Нормированные венозная и микроциркуляционная составляющие мозгового кровообращения в первые 24 часа после акустического открытия гематоэнцефалического барьера. Отчетливо наблюдается негативная динамика в венозной компоненте скорости мозгового кровотока, выраженная в существенном падении скорости в сагиттальном синусе по прошествии 90 минут после отмены звукового воздействия, по отношению к контрольной группе животных.

Микроциркуляционное русло - оптически неразрешимые сосуды, при интегральной оценке скорости кровотока показывает незначительное снижения показателя на  $\approx 30\%$  от контрольного значения по прошествии 24 часов.

#### **4.6 Детальное исследование микроциркуляционной компоненты скорости мозгового кровотока, в условиях открытия гематоэнцефалического барьера методами анализа затухания автокорреляционной функции комплексного сигнала лазерной спекл-визуализации**

Интерференционный характер регистрации сигнала предложенного цифрового голографического метода лазерной спекл-визуализации позволяет производить непосредственный анализ корреляционной функции комплексной амплитуды волнового фронта, отраженного от поверхности исследуемого объекта.

Известным фактом является зависимость между характерным временем затухания автокорреляционной функции интенсивности и скоростью движения форменных элементов вида [66]:

$$\tau = \frac{\lambda z}{DV}, \quad (4.2)$$

где  $\lambda$  — длина волны излучения,  $V$  — скорость движения форменных элементов,  $z/D$  — величина, обратная удвоенной числовой апертуре линзы. С физической точки зрения время декорреляции  $\tau$  — это время, за которое ансамбль форменных элементов пройдет расстояние, определяемое пространственным разрешением оптической системы. Например, если пространственное разрешение оптической системы есть величина, равная 10 мкм, а скорость потока 1 мм/с, время декорреляции приближенно будет равно 10 мс.

Как видно из рисунка 4.10 разница во времени декорреляции комплексной амплитуды сигнала лазерной спекл-визуализации в контрольной группе и спустя 4 часа после открытия гематоэнцефалического барьера минимальна, а ее значение для обеих групп составляет порядка 2.5 мс, в то время как по прошествии 24 часов время декорреляции составляет  $\approx 3.5$  мс, что свидетельствует снижении микроциркуляционной компоненты мозгового кровообращения на  $\approx 30\%$ , что

согласуется с данными, полученными при анализе свойств двумерной функции фазовой модуляции комплексного сигнала лазерной спекл-визуализации.

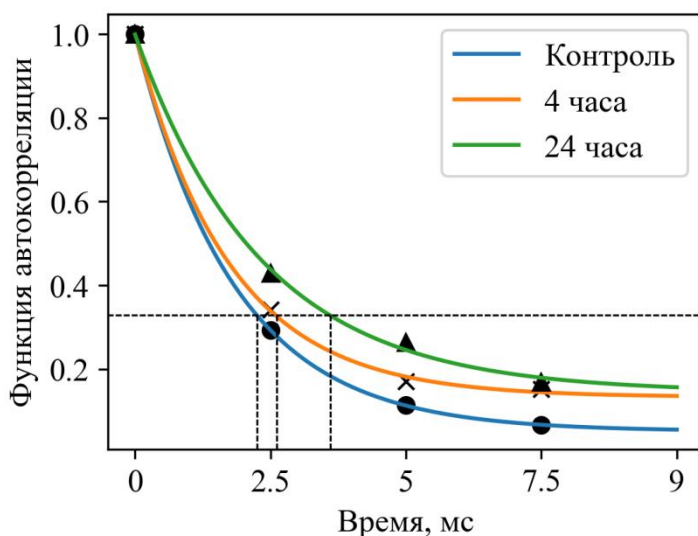


Рисунок 4.10 — Нормированные значения функций автокорреляции комплексной амплитуды сигнала лазерной спекл-визуализации, полученного при анализе микроциркуляционной составляющей церебрального кровотока в первые 24 часа после открытия гематоэнцефалического барьера.

На рисунке 4.11 представлена скорость изменения фазы функции автокорреляции комплексной амплитуды спекл-картины, отражающую динамику микроциркуляционной компоненты скорости мозгового кровотока. Коэффициент наклона кривых для контрольной группы и группы спустя 4 часа после отмены акустического воздействия практически идентичны и составляют 0.73 и 0.79 соответственно, что указывает на незначительные изменения в русле микроциркуляции. Однако, спустя 24 часа после отмены стрессорного воздействия угловой коэффициент падает до значения  $\approx 0.4$ , что указывает на снижение кровотока. Результаты, полученные путем анализа фазы комплексной функции автокорреляции согласуются с данными, основанными на анализе двумерной функции фазовой модуляции.



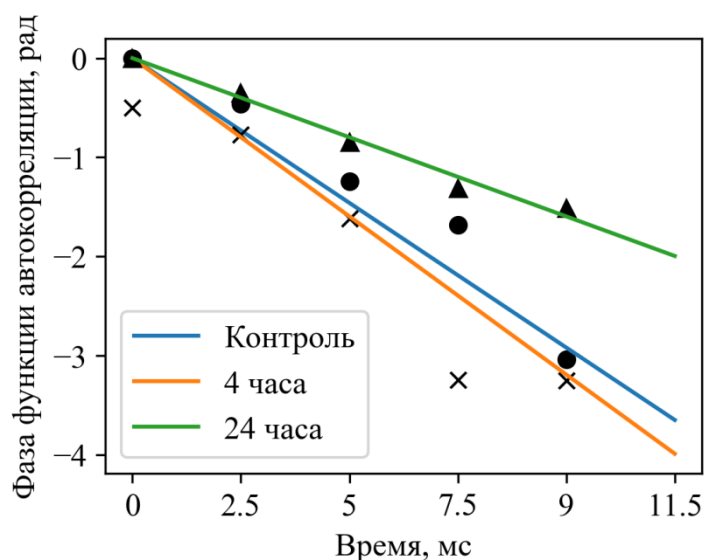


Рисунок 4.11 — График изменения фазы автокорреляционной функции комплексной амплитуды сигнала лазерной спекл-визуализации в зависимости от временной задержки. Отрицательные коэффициенты наклона прямых указывает на затухание автокорреляционной функции вида  $\exp\{-i\pi\}$ , что согласуется с обще принятыми соображениями.

Время декорреляции спекл-картин, сформированной магистральным сосудом существенно меньше единиц микросекунд [164], что в силу ограниченности частоты кадров матричного фотоприемника делает невозможным оценку затухания автокорреляционной функции комплексной амплитуды спекл-картины для таких объектов при данных параметрах оптической системы, изложенных в таблице 2.

#### 4.7 Выводы

В данной главе была детально рассмотрена проектировка и сборка экспериментальной установки, учитывающей все аспекты теоретических выкладок, изложенных в предыдущих главах. Калибровка установки голографической лазерной спекл-визуализации была выполнена на динамическом фантоме сосуда - силиконовом медицинском катетере, для подтверждения

возможности использования свойств функции фазовой модуляции предметного волнового фронта для характеристики скорости и направления потока. Были определены границы применимости фазового метода голографической лазерной спекл-визуализации, а также произведен расчет динамического диапазона для данной установки.

В связи со сравнительно низкой частотой временной дискретизации, в отличие от Доплеровских методик, использующих точечные измерения и систему сканирования [165; 166], данный метод обладает большой чувствительностью к малым скоростям и не позволяет производить оценки скорости и направления в магистральных сосудах, однако дает возможность получать данные со сравнительно большой площади образца без продольного и поперечного сканирований. Необходимо отметить тот факт, что глубина проникновения баллистических фотонов (длина свободного пробега) в цельной крови не превышает величину в 300 мкм [131]. Исходя из данного факта в формирование результирующего волнового фронта основной вклад вносят поверхностные (простеночные) слои крови, обладающие сравнительно малыми скоростями, что делает невозможным корректное восстановление профиля скорости движения форменных элементов в магистральных сосудах с нормальным гематокритом.

При условии проникновения однократно рассеянного излучения на всю глубину сосуда существует ограничение на максимально-детектируемую скорость форменных элементов. Это утверждение связано на прямую с уравнением 2.13 и свойствами функции  $\arctan$  для восстановления фазы волнового фронта, а именно, если разность фаз, вносимая эффектом Доплера локально превышает  $2\pi$ , то имеет место заворачивание фазы, например фаза  $2.1\pi$  будет интерпретирована как  $0.1\pi$ , что приведет к неоднозначности проекции функции фазовой модуляции и ее статистических свойств.

Наряду с этим, в силу особенности регистрации распределения интенсивности, а именно, сравнительно малых временах экспозиции, данные,

полученные экспериментальным комплексом, могут быть использованы в классических алгоритмах оценки пространственного и/или временного спекл-контраста, что делает данный протокол регистрации универсальным и позволяющим разносторонне подойти к анализу экспериментальных данных, в том числе осуществлять прямые измерения времени декорреляции комплексной амплитуды, информация о которой является одним из важнейших параметров при выборе математической модели для перехода от качественных к количественным измерениям в классических методиках лазерной спекл-визуализации, основанных на анализе пространственно-временных свойств спекл-картины.

Были проведены *in vivo* эксперименты по применению методов численной фокусировки к сигналу лазерной спекл-визуализации, которые использовались для коррекции положения наилучшего фокуса при механических движениях объекта или при наличии существенной кривизны поверхности органов визуализации, например органов брюшной полости или легких, а также для повышения резкости границ сосудов для более точного измерения их диаметров. Были выполнены *in vivo* эксперименты на новорожденных лабораторных крысах по визуализации церебрального кровотока методами голографической лазерной спекл-визуализации в условиях развития стресс-индуцированного неонатального инсульта. Метод оценки скорости и направления движения форменных элементов крови, основанный на анализе свойств функции фазовой модуляции предметного волнового фронта показал результаты, превосходящие в плане чувствительности, методики, базирующиеся на анализе распределения интенсивности спекл-картины, а также в предоставлении более полного набора диагностических параметров.

Представлены данные анализа амплитуды и фазы комплексной функции автокорреляции спекл-картин, зарегистрированных от поверхности мозга мыши методом цифровой голографической лазерной спекл-визуализации, которые отражают характер динамики мозгового кровотока, согласующийся с таковым, полученным путем анализа как двумерной функции фазовой модуляции, так и

классическим алгоритмом оценки пространственно-временных свойств интенсивности спекл-картин. В силу аппаратного ограничения частоты временной дискретизации матричного фотоприемника, данную методику удалось применить только к исследованию микроциркуляционной компоненты скорости мозгового кровотока, однако, существенных теоретических и технических ограничений на ее применимость к исследованию крупных сосудов нет, единственным требованием является малость времени между оцифровкой интенсивности в плоскости матричного фотоприемника в сравнении с характерным времени декорреляции спекл-картины от крупного сосуда.

Основные результаты опубликованы:

- 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.
- Optical monitoring of stress-related changes in the brain tissues and vessels associated with hemorrhagic stroke in newborn rats / O. Semyachkina-Glushkovskaya [и др.] // Biomedical Optics Express. — 2015. — Т. 6, № 10. — С. 4088—4097.
- 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.
- Changes in the cerebral blood flow in newborn rats assessed by LSCI and DOCT before and after the hemorrhagic stroke / O. Semyachkina-Glushkovskaya [и др.] // Optical Techniques in Neurosurgery, Neurophotonics, and Optogenetics II. Т. 9305. — International Society for Optics, Photonics. 2015. — С. 93051D.
- Cerebral venous circulatory disturbance as an informative prognostic marker for neonatal hemorrhagic stroke / O. Semyachkina-Glushkovskaya [и др.] //

Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care V. T. 9887. — International Society for Optics, Photonics. 2016. — C. 98872I.

- 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.
- Abdurashitov, A. Photodynamic therapy of brain tumors and novel optical coherence tomography strategies for in vivo monitoring of cerebral fluid dynamics / A. Abdurashitov, V. Tuchin, Semyachkina-Glushkovskaya // Journal of Innovative Optical Health Sciences. — 2019. — т. 13, No 2. — с. 2030004.
- Effect of a Controlled Release of Epinephrine Hydrochloride from PLGA Microchamber Array: In Vivo Studies / O. A. Sindeeva [и др.] // ACS applied materials & interfaces. — 2018. — т. 10, No 44. — с. 37855—37864.

## Заключение

В данной диссертационной работе развиты теоретические основы формирования сигнала, а также принципы его регистрации в методе лазерной спекл-визуализации, разработаны новые подходы к анализу экспериментальных данных. Проведены *in vivo* исследования церебральных сосудов в условиях развития стресс-индуцированного неонатального инсульта 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 частой кадров в единицы или десятки кГц для расширения динамического диапазона измеряемых скоростей и снижения чувствительности метода к артефактам движения, 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 элементарных рассеивателей, их пространственную локализацию, так и профиль скорости движения, способная описывать известные явления, как трансляция или «кипение» спеклов, так и предсказать новые методы анализа экспериментальных данных, основанный на численном анализе двумерной функции фазовой модуляции предметного волнового фронта.

2. В методологию лазерной спекл-визуализации введено понятие двумерной функции фазовой модуляции, аналитически продемонстрирована ее связь с динамическими параметрами исследуемого объекта, такими как скорость движения рассеивающих центров и их направление.
3. Согласно предложенным математическим выражениям проведено численное моделирование сигнала лазерной спекл-визуализации, зарегистрированного в интерференционном микроскопе с вне-осевой конфигурацией опорного поля. Численное моделирование производилось без учета аберраций оптической системы, однако, учитывалось пространственное распределение рассеивающих центров, их концентрация, а также распределение скоростей их движения в поперечном сечении сосуда. Процесс регистрации интерференционной картины был выполнен с учетом эффектов, вызванных конечным размером пикселя фоточувствительной матрицы, а также ограниченной апертуры объектива. Эффект числовой апертуры освещения на результирующее распределение интенсивности в интерференционной картине не рассматривался в данной работе, в связи с тем, что освещение объекта производилось плоской монохроматической волной, падающей на поверхность объекта под малыми углами, исходя из чего, эффектами апертуры освещения можно пренебречь и положить ее (апертуру освещения) равной нулю. Несмотря на такое количество приближений, теоретическая модель, предложенная в главе 2, с достаточной степенью точности описывает динамику субъективной спекл-картины, сформированной динамическим объектом, а также позволяет выявить свойства функции фазовой модуляции волнового фронта и их связь с количественной характеристикой кровотока.
4. Показана возможность предложенного метода, а именно, анализа двумерной функции фазовой модуляции к предоставлению информации о скорости и направлении движения рассеивающих центров при соблюдении условия достаточной частоты временной дискретизации

мгновенных реализаций спекл-модулированных интерференционных картин.

5. Для экспериментальной проверки выдвинутых предположений и результатов численного моделирования был собран интерференционный микроскоп Маха-Цендера в отраженном свете 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 направления движения рассеивающих центров.
6. *In vivo* подтверждена возможность использования численной фокусировки в методе лазерной спекл-визуализации для коррекции положения наилучшего фокуса при визуализации динамических объектов, или объектов, имеющих существенную кривизну поверхности в пределах поля зрения установки. Показана зависимость сигнала лазерной спекл-контрастной визуализации от величины расфокусировки оптической системы, формирующей изображение, а также ее связь с функцией фазовой модуляции в поперечном сечении сосуда, вызванная эффектом Доплера.
7. Проведены *in vivo* исследования кровотока коры головного мозга новорожденной крысы в условиях развития стресс-индуцированного инсульта 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.
8. Показано, что в латентный период протекания стресс-индуцированного неонатального инсульта существенно изменяется венозная гемодинамика, в то время как артериальное и микро-циркуляционное русло сохраняют свою нормальную функциональную активность. В последующие 24 часа



после моделирования инсульта сохраняется негативная тенденция к деградации венозного кровообращения, на фоне которого происходят патологические процессы снижения артериального кровотока в микроциркуляционном русле.

9. Исследования прижизненной гемодинамики у новорожденных крыс в условиях развития неонатального инсульта показали, что изменение венозного кровотока на ранней стадии развития патологии является важным и ключевым фактором, который необходимо учитывать при дальнейшем, детальном анализе физиологических механизмов, лежащих в основе формирования и скрытого протекания неонатального инсульта, а также разработке превентивных мер для исключения стресс-индуцированных внутричерепных геморрагий в первые дни жизни новорожденных, которые могут приводить к локальной гипоксии и серьезным когнитивным расстройствам.
10. Исследования мозговой гемодинамики в условиях абнормальной работы гематоэнцефалического барьера показали существенное падение венозной составляющей мозгового кровотока в первые 24 часа после нарушения ГЭБ (в 2 раза в сравнении с показателями контрольной группы). Микроциркуляционная компонента скорости продемонстрировала незначительное снижение кровотока ( $\approx 30\%$  в сравнении с контрольной группой). Скрытые механизмы, лежащие в основе таких патологических нарушений мозгового кровообращения в условиях повреждения ГЭБа до конца не изучены и являются предметом споров и активных научных исследований в настоящее время.

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.

## Список литературы

1. Jordan, L. C. Hemorrhagic stroke in children / L. C. Jordan, A. E. Hillis // *Pediatric neurology*. — 2007. — Т. 36, № 2. — С. 73—80.
2. Epidemiology of stroke in Innherred, Norway, 1994 to 1996: incidence and 30-day case-fatality rate / H. Ellekjaer [и др.] // *Stroke*. — 1997. — Т. 28, № 11. — С. 2180—2184.
3. Focal cerebral ischemic or hemorrhagic lesions in the term newborn. Review of the last decade / S. Ruiz-Escusol [и др.] // *Revista de neurologia*. — 2001. — Т. 32, № 9. — С. 801—805.
4. Gupta, S. N. Intracranial hemorrhage in term newborns: management and outcomes / S. N. Gupta, A. M. Kechli, U. S. Kanamalla // *Pediatric neurology*. — 2009. — Т. 40, № 1. — С. 1—12.
5. Haemorrhagic stroke in term and late preterm neonates / C. J. Bruno [и др.] // *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*. — 2014. — Т. 99, № 1. — F48—F53.
6. Changing pattern of perinatal brain injury in term infants in recent years / T. Takenouchi [и др.] // *Pediatric neurology*. — 2012. — Т. 46, № 2. — С. 106—110.
7. Improved survival rates with increased neurodevelopmental disability for extremely low birth weight infants in the 1990s / D. Wilson-Costello [и др.] // *Pediatrics*. — 2005. — Т. 115, № 4. — С. 997—1003.
8. Frequency and natural history of subdural haemorrhages in babies and relation to obstetric factors / E. Whitby [и др.] // *The Lancet*. — 2004. — Т. 363, № 9412. — С. 846—851.
9. Intracranial hemorrhage in asymptomatic neonates: prevalence on MR images and relationship to obstetric and neonatal risk factors / C. B. Looney [и др.] // *Radiology*. — 2007. — Т. 242, № 2. — С. 535—541.

10. Lynch, J. K. Pediatric stroke: what do we know and what do we need to know? / J. K. Lynch, C. J. Han // *Seminars in neurology*. Т. 25. — Published 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New. 2005. — С. 410—423.
11. Intracranial hemorrhage in full-term newborns: a hospital-based cohort study / A. J. Brouwer [идр.] // *Neuroradiology*. — 2010. — Т. 52, № 6. — С. 567—576.
12. Kirton, A. Life after perinatal stroke / A. Kirton, G. deVeber // *Stroke*. — 2013. — Т. 44, № 11. — С. 3265—3271.
13. School-age outcomes of very low birth weight infants in the indomethacin intraventricular hemorrhage prevention trial / B. R. Vohr [идр.] // *Pediatrics*. — 2003. — Т. 111, № 4. — e340—e346.
14. 3.6 million neonatal deaths—what is progressing and what is not? / J. E. Lawn [идр.] // *Seminars in perinatology*. Т. 34. — Elsevier. 2010. — С. 371—386.
15. Paul, V. K. The current state of newborn health in low income countries and the way forward / V. K. Paul // *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. Т. 11. — Elsevier. 2006. — С. 7—14.
16. Broman, T. The possibilities of the passage of substances from the blood to the central nervous system (Is there a Blood-Brain-Barrier and a Blood-Cerebrospinal Fluid-Barrier?) / T. Broman // *Acta Psychiatrica Scandinavica*. — 1941. — Т. 16, № 1. — С. 1—25.
17. Friedemann, U. Blood-brain barrier / U. Friedemann // *Physiological Reviews*. — 1942. — Т. 22, № 2. — С. 125—145.
18. Pardridge, W. M. CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery / W. M. Pardridge // *Expert opinion on drug delivery*. — 2016. — Т. 13, № 7. — С. 963—975.
19. A balanced view of choroid plexus structure and function: focus on adult humans / R. Spector [идр.] // *Experimental neurology*. — 2015. — Т. 267. — С. 78—86.

20. Brain barrier properties and cerebral blood flow in neonatal mice exposed to cerebral hypoxia-ischemia / C. J. Ek [и др.] // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. — 2015. — Т. 35, № 5. — С. 818—827.
21. Blood–brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex / O. Tomkins [и др.] // *Neurobiology of disease*. — 2007. — Т. 25, № 2. — С. 367—377.
22. Abbott, N. J. Overview and introduction: the blood–brain barrier in health and disease / N. J. Abbott, A. Friedman // *Epilepsia*. — 2012. — Т. 53. — С. 1—6.
23. Neuwelt, E. A. Mechanisms of disease: the blood-brain barrier / E. A. Neuwelt // *Neurosurgery*. — 2004. — Т. 54, № 1. — С. 131—142.
24. Blood–brain barrier permeability is increased after acute adult stroke but not neonatal stroke in the rat / D. Fernandez-Lopez [и др.] // *Journal of Neuroscience*. — 2012. — Т. 32, № 28. — С. 9588—9600.
25. Goodman, J. W. Some fundamental properties of speckle / J. W. Goodman // *JOSA*. — 1976. — Т. 66, № 11. — С. 1145—1150.
26. Dainty, J. C. Laser speckle and related phenomena. Т. 9 / J. C. Dainty. — Springer science & business Media, 2013.
27. Fercher, A. Flow visualization by means of single-exposure speckle photography / A. Fercher, J. D. Briers // *Optics communications*. — 1981. — Т. 37, № 5. — С. 326—330.
28. Briers, J. D. Laser Doppler and time-varying speckle: a reconciliation / J. D. Briers // *JOSA A*. — 1996. — Т. 13, № 2. — С. 345—350.
29. Briers, J. D. Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow. / J. D. Briers // *Optica Applicata*. — 2007. — Т. 37.
30. Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion / M. Draijer [и др.] // *Lasers in medical science*. — 2009. — Т. 24, № 4. — С. 639.
31. Laser Speckle Contrast Imaging for Intraoperative Quantitative Assessment of Intestinal Blood Perfusion During Colorectal Surgery: A Prospective Pilot

- Study / S. Kojima [идр.] // Surgical innovation. — 2019. — С. 1553350618823426.
32. Dynamic laser speckle imaging: beyond the contrast (Conference Presentation) / D. D. Postnov [идр.] // Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics XVI. Т. 10877. — International Society for Optics, Photonics. 2019. — 108770A
33. Combined laser speckle imaging and fluorescent intravital microscopy for monitoring acute vascular permeability reaction / V. Kalchenko [идр.] // Journal of biomedical optics. — 2019. — Т. 24, № 6. — С. 060501.
34. Imaging cerebral blood flow through the intact rat skull with temporal laser speckle imaging / P. Li [идр.] // Optics letters. — 2006. — Т. 31, № 12. — С. 1824—1826.
35. Bi, R. Multi-channel deep tissue flowmetry based on temporal diffuse speckle contrast analysis / R. Bi, J. Dong, K. Lee // Optics express. — 2013. — Т. 21, № 19. — С. 22854—22861.
36. TP1-6 Pathological patterns of spinal cord blood flow after injury visualised with laser speckle contrast imaging / M. Gallagher [идр.]. — 2019.
37. Cheng, H. Temporal statistical analysis of laser speckle images and its application to retinal blood-flow imaging / H. Cheng, Y. Yan, T. Q. Duong // Optics express. — 2008. — Т. 16, № 14. — С. 10214—10219.
38. Spatiotemporal laser speckle contrast analysis for blood flow imaging with maximized speckle contrast / J. Qiu [идр.] // Journal of biomedical optics. — 2010. — Т. 15, № 1. — С. 016003.
39. Quantitative temporal speckle contrast imaging for tissue mechanics / S. J. Kirkpatrick [идр.] // JOSA A. — 2007. — Т. 24, № 12. — С. 3728—3734.
40. Multiexposure laser speckle contrast imaging of the angiogenic microenvironment / A. Rege [идр.] // Journal of biomedical optics. — 2011. — Т. 16, № 5. — С. 056006.

41. Comparison between laser speckle contrast imaging and laser Doppler imaging to assess skin blood flow in humans / C. Millet [и др.] // *Microvascular research*. — 2011. — Т. 82, № 2. — С. 147—151.
42. Briers, J. D. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow / J. D. Briers, S. Webster // *Journal of biomedical optics*. — 1996. — Т. 1, № 2. — С. 174—180.
43. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle / A. K. Dunn [и др.] // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. — 2001. — Т. 21, № 3. — С. 195—201.
44. Dunn, A. K. Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow / A. K. Dunn // *Annals of biomedical engineering*. — 2012. — Т. 40, № 2. — С. 367—377.
45. Briers, J. D. Capillary blood flow monitoring using laser speckle contrast analysis (LASCA) / J. D. Briers, G. J. Richards, X.-W. He // *Journal of biomedical optics*. — 1999. — Т. 4, № 1. — С. 164—176.
46. Laser speckle contrast imaging of collateral blood flow during acute ischemic stroke / G. A. Armitage [и др.] // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. — 2010. — Т. 30, № 8. — С. 1432—1436.
47. Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow in humans during neurosurgery: a pilot clinical study / A. B. Parthasarathy [и др.] // *Journal of biomedical optics*. — 2010. — Т. 15, № 6. — С. 066030.
48. Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow in freely moving animals / P. Miao [и др.] // *Journal of biomedical optics*. — 2011. — Т. 16, № 9. — С. 090502.
49. Cheng, H. Simplified laser-speckle-imaging analysis method and its application to retinal blood flow imaging / H. Cheng, T. Q. Duong // *Optics letters*. — 2007. — Т. 32, № 15. — С. 2188—2190.
50. Low-cost laser speckle contrast imaging of blood flow using a webcam / L. M. Richards [и др.] // *Biomedical optics express*. — 2013. — Т. 4, № 10. — С. 2269—2283.

51. Dynamic laser speckle imaging of cerebral blood flow / P. Zakharov [идр.] // Optics express. — 2009. — Т. 17, № 16. — С. 13904—13917.
52. Simultaneous imaging of total cerebral hemoglobin concentration, oxygenation, and blood flow during functional activation / A. K. Dunn [идр.] // Optics letters. — 2003. — Т. 28, № 1. — С. 28—30.
53. Кальченко, В. В. Визуализация кровеносных и лимфатических сосудов при увеличенном времени экспозиции детектора / В. В. Кальченко, Ю. Л. Кузнецов, И. В. Меглинский // Квантовая электроника. — 2013. — Т. 43, № 7. — С. 679—682.
54. Laser speckle contrast imaging of cerebral autoregulation in rats at a macro- and microcirculation level / O. V. Semyachkina-Glushkovskaya [идр.] // Quantum Electronics. — 2016. — Т. 46, № 6. — С. 496.
55. Label free in vivo laser speckle imaging of blood and lymph vessels / V. Kalchenko [идр.] // Journal of Biomedical Optics. — 2012. — Т. 17, № 5. — С. 050502.
56. Investigation of statistical properties of lymph-flow dynamics using speckle microscopy / A. A. Bednov [идр.] // Coherence Domain Optical Methods in Biomedical Science and Clinical Applications. Т. 2981. — International Society for Optics, Photonics. 1997. — С. 181—191.
57. Laser speckle contrast imaging: theoretical and practical limitations / D. Briers [идр.] // Journal of biomedical optics. — 2013. — Т. 18, № 6. — С. 066018.
58. Davis, M. A. Imaging depth and multiple scattering in laser speckle contrast imaging / M. A. Davis, S. S. Kazmi, A. K. Dunn // Journal of biomedical optics. — 2014. — Т. 19, № 8. — С. 086001.
59. Accessing to arteriovenous blood flow dynamics response using combined laser speckle contrast imaging and skin optical clearing / R. Shi [идр.] // Biomedical optics express. — 2015. — Т. 6, № 6. — С. 1977—1989.
60. Assessment of optical clearing induced improvement of laser speckle contrast imaging / J. Wang [идр.] // Journal of Innovative Optical Health Sciences. — 2010. — Т. 3, № 03. — С. 159—167.



61. Tuchin, V. V. Optical clearing of tissues and blood / V. V. Tuchin // — Spie Bellingham, Washington. 2006.
62. Laser speckle contrast imaging: theory, instrumentation and applications / J. Senarathna [и др.] // IEEE reviews in biomedical engineering. — 2013. — Т. 6. — С. 99—110.
63. Yoshimura, T. Rotational and boiling motion of speckles in a two-lens imaging system / T. Yoshimura, K. Nakagawa, N. Wakabayashi // JOSA A. — 1986. — Т. 3, № 7. — С. 1018—1022.
64. Numerical model for simulation of dynamic speckle reference patterns / G. Sendra [и др.] // Optics Communications. — 2009. — Т. 282, № 18. — С. 3693—3700.
65. Yoshimura, T. Statistical properties of dynamic speckles / T. Yoshimura // JOSA A. — 1986. — Т. 3, № 7. — С. 1032—1054.
66. Duncan, D. D. Can laser speckle flowmetry be made a quantitative tool? / D. D. Duncan, S. J. Kirkpatrick // JOSA A. — 2008. — Т. 25, № 8. — С. 2088—2094.
67. Boas, D. A. Laser speckle contrast imaging in biomedical optics / D. A. Boas, A. K. Dunn // Journal of biomedical optics. — 2010. — Т. 15, № 1. — С. 011109.
68. Laser speckle contrast analysis: a new method to evaluate peripheral blood perfusion in systemic sclerosis patients / B. Ruaro [и др.] // Annals of the rheumatic diseases. — 2014. — Т. 73, № 6. — С. 1181—1185.
69. Intraoperative monitoring of cerebral blood flow by laser speckle contrast analysis / N. Hecht [и др.] // Neurosurgical focus. — 2009. — Т. 27, № 4. — E11.
70. Assessment of cerebral hemodynamics during neurosurgical procedures using laser speckle image analysis / K. Venugopal [и др.] // Journal of biophotonics. — 2019. — e201800408.

71. Non-contact photoacoustic imaging using laser speckle contrast analysis / M. Benyamin [идр.] // Optics Letters. — 2019. — Т. 44, № 12. — С. 3110—3113.
72. Machine learning in multiexposure laser speckle contrast imaging can replace conventional laser Doppler flowmetry / I. Fredriksson [идр.] // Journal of biomedical optics. — 2019. — Т. 24, № 1. — С. 016001.
73. Speckle contrast at deviations from best focus in microfluidic and in vivo / Y. Atchia [идр.] // Biomedical Optics and 3-D Imaging. — Optical Society of America, 2012. — BTu3A.49. — URL: <http://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=BIOMED-2012-BTu3A.49>.
74. Reducing misfocus-related motion artefacts in laser speckle contrast imaging / D. Ringuette [идр.] // Biomedical optics express. — 2015. — Т. 6, № 1. — С. 266—276.
75. Enhancing vascular visualization in laser speckle contrast imaging of blood flow using multi-focus image fusion / W. Lv [идр.] // Journal of biophotonics. — 2019. — Т. 12, № 1. — e201800100.
76. Goodman, J. W. Statistical properties of laser speckle patterns / J. W. Goodman // Laser speckle and related phenomena. — Springer, 1975. — С. 9—75.
77. Duncan, D. D. Statistics of local speckle contrast / D. D. Duncan, S. J. Kirkpatrick, R. K. Wang // JOSA A. — 2008. — Т. 25, № 1. — С. 9—15.
78. Kirkpatrick, S. J. Detrimental effects of speckle-pixel size matching in laser speckle contrast imaging / S. J. Kirkpatrick, D. D. Duncan, E. M. Wells-Gray // Optics letters. — 2008. — Т. 33, № 24. — С. 2886—2888.
79. Ohtsubo, J. Statistical properties of laser speckle produced in the diffraction field / J. Ohtsubo, T. Asakura // Applied optics. — 1977. — Т. 16, № 6. — С. 1742—1753.
80. Duncan, D. D. What is the proper statistical model for laser speckle flowmetry? / D. D. Duncan, S. J. Kirkpatrick, J. C. Gladish // Complex

- Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics V. T. 6855. — International Society for Optics, Photonics. 2008. — C. 685502.
81. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. — Accessed: 2019-10-07. <https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals.pdf>.
82. Briers, J. Quasi real-time digital version of single-exposure speckle photography for full-field monitoring of velocity or flow fields / J. Briers, S. Webster // Optics communications. — 1995. — Т. 116, № 1—3. — С. 36—42.
83. Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution / H. Cheng [идр.] // Journal of biomedical optics. — 2003. — Т. 8, № 3. — С. 559—565.
84. Grousseau, R. Study of flow pattern in a fluid by scattered laser light / R. Grousseau, S. Mallick // Applied Optics. — 1977. — Т. 16, № 9. — С. 2334—2336.
85. Comparison of laser speckle and laser Doppler perfusion imaging: measurement in human skin and rabbit articular tissue / K. Forrester [идр.] // Medical and Biological Engineering and Computing. — 2002. — Т. 40, № 6. — С. 687—697.
86. A laser speckle imaging technique for measuring tissue perfusion / K. R. Forrester [идр.] // IEEE transactions on biomedical engineering. — 2004. — Т. 51, № 11. — С. 2074—2084.
87. Robust flow measurement with multi-exposure speckle imaging / A. B. Parthasarathy [идр.] // Optics express. — 2008. — Т. 16, № 3. — С. 1975—1989.
88. Effect of unoprostone on topographic and blood flow changes in the ischemic optic nerve head of rabbits / T. Sugiyama [идр.] // Archives of Ophthalmology. — 2009. — Т. 127, № 4. — С. 454—459.
89. A placebo-controlled 3-year study of a calcium blocker on visual field and ocular circulation in glaucoma with low-normal pressure / N. Koseki [идр.] // Ophthalmology. — 2008. — Т. 115, № 11. — С. 2049—2057.

90. Measurement of microcirculation in the optic nerve head by laser speckle flowgraphy and scanning laser Doppler flowmetry / K. Yaeoda [и др.] // American journal of ophthalmology. — 2000. — Т. 129, № 6. — С. 734—739.
91. Noninvasive blood flow imaging for real-time feedback during laser therapy of port wine stain birthmarks / Y.-C. Huang [и др.] // Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery. — 2008. — Т. 40, № 3. — С. 167—173.
92. Alteration of microcirculation is a hallmark of very early systemic sclerosis patients: a laser speckle contrast analysis / A. Della Rossa [и др.] // Clin Exp Rheumatol. — 2013. — Т. 31, 2 Suppl 76. — С. 109—114.
93. Reproducibility of non-invasive assessment of skin endothelial function using laser Doppler flowmetry and laser speckle contrast imaging / C. Puissant [и др.] // PloS one. — 2013. — Т. 8, № 4. — e61320.
94. Spatiotemporal quantification of cerebral blood flow during functional activation in rat somatosensory cortex using laser-speckle flowmetry / T. Durduran [и др.] // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. — 2004. — Т. 24, № 5. — С. 518—525.
95. Simultaneous imaging of cerebral partial pressure of oxygen and blood flow during functional activation and cortical spreading depression / S. Sakadžić [и др.] // Applied optics. — 2009. — Т. 48, № 10. — С. D169—D177.
96. Functional laser speckle imaging of cerebral blood flow under hypothermia / M. Li [и др.] // Journal of biomedical optics. — 2011. — Т. 16, № 8. — С. 086011.
97. Evaluation of laser speckle flowmetry for imaging cortical perfusion in experimental stroke studies: quantitation of perfusion and detection of peri-infarct depolarisations / A. J. Strong [и др.] // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. — 2006. — Т. 26, № 5. — С. 645—653.

98. Zhang, S. Imaging the impact of cortical microcirculation on synaptic structure and sensory-evoked hemodynamic responses in vivo / S. Zhang, T. H. Murphy // *PLoS biology*. — 2007. — Т. 5, № 5. — e119.
99. Changes in the cerebral blood flow in newborn rats assessed by LSCI and DOCT before and after the hemorrhagic stroke / O. Semyachkina-Glushkovskaya [и др.] // *Optical Techniques in Neurosurgery, Neurophotonics, and Optogenetics II*. Т. 9305. — International Society for Optics, Photonics. 2015. — С. 93051D.
100. Optical monitoring of stress-related changes in the brain tissues and vessels associated with hemorrhagic stroke in newborn rats / O. Semyachkina-Glushkovskaya [и др.] // *Biomedical optics express*. — 2015. — Т. 6, № 10. — С. 4088—4097.
101. Blood-brain barrier and cerebral blood flow: age differences in hemorrhagic stroke / S.-G. Oхana [и др.] // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2015. — Т. 8, № 06. — С. 1550045.
102. Fast synchronized dual-wavelength laser speckle imaging system for monitoring hemodynamic changes in a stroke mouse model / J. Qin [и др.] // *Optics letters*. — 2012. — Т. 37, № 19. — С. 4005—4007.
103. Effect of a Controlled Release of Epinephrine Hydrochloride from PLGA Microchamber Array: In Vivo Studies / O. A. Sindeeva [и др.] // *ACS Appl Mater Interfaces*. — 2018. — Ноябрь. — Т. 10, № 44. — С. 37855—37864.
104. Postnov, D. D. Laser speckle imaging of intra organ drug distribution / D. D. Postnov, N.-H. Holstein-Rathlou, O. Sosnovtseva // *Biomedical optics express*. — 2015. — Т. 6, № 12. — С. 5055—5062.
105. Ульянова, О. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ РОСТА КОЛОНИЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ LASCA / О. Ульянова, О. Ребеза, С. Ульянов // *Оптика и спектроскопия*. — 2016. — Т. 120, № 1. — С. 88—93.
106. Application of laser speckle interferometry for monitoring the dynamics of lymph flow / H. Cheng [и др.] // *International Workshop on Photonics and*

- Imaging in Biology and Medicine. T. 4536. — International Society for Optics, Photonics. 2002. — C. 130—137.
107. Cheng, H.-y. Monitoring the Change of Lymph Flow Under the Drug's Influence by Laser Speckle Method / H.-y. Cheng, Q.-m. Luo, Z. Wang // JOURNAL OF OPTOELECTRONICS LASER. — 2002. — T. 13, № 3. — C. 300—304.
108. The application of zero-crossings of laser speckle for real-time monitoring of velocity of lymph flow / H.-y. Cheng [и др.] // RECON no. 20010097322.; Space Medicine and Medical Engineering. — 2001. — T. 14, № 3. — C. 187—191.
109. Ulyanov, S. Statistical properties of dynamic small-N speckles within highly scattering media / S. Ulyanov // JOSA A. — 2008. — T. 25, № 9. — C. 2207—2214.
110. Postnov, D. D. Dairy products viscosity estimated by laser speckle correlation / D. D. Postnov, F. Moller, O. Sosnovtseva // PloS one. — 2018. — T. 13, № 9. — e0203141.
111. Balamurugan, R. Study of drying process of paint by dynamic speckle with B/D pixel counting technique / R. Balamurugan, G. Rajarajan // Optics and Lasers in Engineering. — 2017. — T. 98. — C. 62—68.
112. Laser speckle imaging allows real-time intraoperative blood flow assessment during neurosurgical procedures / N. Hecht [и др.] // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. — 2013. — T. 33, № 7. — C. 1000—1007.
113. A combined autofluorescence and laser speckle contrast imaging system for parathyroid surgical guidance (Conference Presentation) / E. A. Mannoh [и др.] // Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic and Surgical Guidance Systems XVII. T. 10868. — International Society for Optics, Photonics. 2019. — 108680P.

114. Equis, S. Simulation of speckle complex amplitude: advocating the linear model / S. Equis, P. Jacquot // *Speckle06: Speckles, From Grains to Flowers*. T. 6341. — International Society for Optics, Photonics. 2006. — C. 634138.
115. Goodman, J. *Speckle phenomena in optics*. Roberts and Company Publishers / J. Goodman. — 2006.
116. Tom, W. J. Efficient processing of laser speckle contrast images / W. J. Tom, A. Ponticorvo, A. K. Dunn // *IEEE transactions on medical imaging*. — 2008. — T. 27, № 12. — C. 1728—1738.
117. New insights into image processing of cortical blood flow monitors using laser speckle imaging / T. M. Le [и др.] // *IEEE transactions on medical imaging*. — 2007. — T. 26, № 6. — C. 833—842.
118. High resolution cerebral blood flow imaging by registered laser speckle contrast analysis / P. Miao [и др.] // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. — 2010. — T. 57, № 5. — C. 1152—1157.
119. Postnov, D. D. Improved detectability of microcirculatory dynamics by laser speckle flowmetry / D. D. Postnov, O. Sosnovtseva, V. V. Tuchin // *Journal of biophotonics*. — 2015. — T. 8, № 10. — C. 790—794.
120. Postnov, D. D. Estimation of vessel diameter and blood flow dynamics from laser speckle images / D. D. Postnov, V. V. Tuchin, O. Sosnovtseva // *Biomedical optics express*. — 2016. — T. 7, № 7. — C. 2759—2768.
121. Contrast-enhanced imaging of cerebral vasculature with laser speckle / K. Murari [и др.] // *Applied optics*. — 2007. — T. 46, № 22. — C. 5340—5346.
122. Flux or speed? Examining speckle contrast imaging of vascular flows / S. S. Kazmi [и др.] // *Biomedical optics express*. — 2015. — T. 6, № 7. — C. 2588—2608.
123. Khaksari, K. Laser speckle contrast imaging is sensitive to advective flux / K. Khaksari, S. J. Kirkpatrick // *Journal of Biomedical Optics*. — 2016. — T. 21, № 7. — C. 076001.
124. Expanding applications, accuracy, and interpretation of laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow / S. S. Kazmi [и др.] // *Journal of*

- Cerebral Blood Flow & Metabolism. — 2015. — T. 35, № 7. — С. 1076—1084.
125. Relation between the contrast in time integrated dynamic speckle patterns and the power spectral density of their temporal intensity fluctuations / M. J. Draijer [и др.] // Optics express. — 2010. — Т. 18, № 21. — С. 21883—21891.
126. Goodman, J. W. Introduction to Fourier optics / J. W. Goodman. — Roberts, Company Publishers, 2005.
127. Duncan, D. D. Algorithms for simulation of speckle (laser and otherwise) / D. D. Duncan, S. J. Kirkpatrick // Complex Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics V. Т. 6855. — International Society for Optics, Photonics. 2008. — С. 685505.
128. Roddier, F. On the origin of speckle boiling and its effects in stellar speckle interferometry / F. Roddier, J. Gilli, G. Lund // Journal of Optics. — 1982. — Т. 13, № 5. — С. 263.
129. Francon, M. Laser speckle and applications in optics / M. Francon. — Elsevier, 2012.
130. Liu, G. Phase-resolved Doppler optical coherence tomography / G. Liu, Z. Chen // Selected Topics in Optical Coherence Tomography. — IntechOpen, 2012.
131. Drexler, W. Optical coherence tomography: technology and applications / W. Drexler, J. G. Fujimoto. — Springer Science & Business Media, 2008.
132. Investigation of speckle pattern dynamics by laser speckle contrast imaging / A. Sdobnov [и др.] // Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI. Т. 10685. — International Society for Optics, Photonics. 2018. — С. 1068509.
133. A hybrid de-noising method on LASCA images of blood vessels / C. Wu [и др.] // Journal of Signal and Information Processing. — 2012. — Т. 3, № 01. — С. 92.



134. Local scattering property scales flow speed estimation in laser speckle contrast imaging / P. Miao [и др.] // Laser Physics Letters. — 2015. — Т. 12, № 7. — С. 075601.
135. Simultaneous viscosity and elasticity measurement using laser speckle contrast imaging / X. Chen [и др.] // Optics letters. — 2018. — Т. 43, № 7. — С. 1582—1585.
136. Multiple speckle exposure imaging for the study of blood flow changes induced by functional activation of barrel cortex and olfactory bulb in mice / H. Soleimanzad [и др.] // Neurophotonics. — 2019. — Т. 6, № 1. — С. 015008.
137. AUTOMATED NONINVASIVE EVALUATION OF BLOOD FLOW AND OXYGENATION IN RATS INTEGRATED WITH SYSTEMIC PHYSIOLOGICAL MONITORING. / I. F. Torres [и др.] // The journal of trauma and acute care surgery. — 2019.
138. Duncan, D. D. Spatio-temporal algorithms for processing laser speckle imaging data / D. D. Duncan, S. J. Kirkpatrick // Optics in Tissue Engineering and Regenerative Medicine II. Т. 6858. — International Society for Optics, Photonics. 2008. — С. 685802.
139. Choosing a laser for laser speckle contrast imaging / D. D. Postnov [и др.] // Scientific reports. — 2019. — Т. 9, № 1. — С. 2542.
140. Theoretical and Experimental Optimization of Laser Speckle Contrast Imaging for High Specificity to Brain Microcirculation / W. Zheng [и др.] // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. — 2007. — Т. 27, № 2. — С. 258—269.
141. Impact of experimental conditions on noncontact laser recordings in microvascular studies / G. Mahe [и др.] // Microcirculation. — 2012. — Т. 19, № 8. — С. 669—675.
142. Filtering for unwrapping noisy Doppler optical coherence tomography images for extended microscopic fluid velocity measurement range / Y. Xu [и др.] // Optics letters. — 2016. — Т. 41, № 17. — С. 4024—4027.

143. Module 5 : Lecture 1 VISCOUS INCOMPRESSIBLE FLOW (Fundamental Aspects). — Доступ: 2019-06-17. <https://nptel.ac.in/courses/101103004/pdf/mod5.pdf>.
144. Laser speckle imaging of brain blood flow through a transparent nanocrystalline yttria-stabilized-zirconia cranial implant / D. Nami [и др.] // Т. 10493. — 2018. — URL: <https://doi.org/10.1117/12.2285953>.
145. Effect of anodal direct-current stimulation on cortical hemodynamic responses with laser-speckle contrast imaging / S. Hu [и др.] // *Frontiers in Neuroscience*. — 2018. — Т. 12. — С. 503.
146. In vivo laser speckle imaging by adaptive contrast computation for microvasculature assessment / K. Basak [и др.] // *Optics and Lasers in Engineering*. — 2014. — Т. 62. — С. 87—94.
147. Improving temporal resolution and speed sensitivity of laser speckle contrast analysis imaging based on noise reduction with an anisotropic diffusion filter / L. Song [и др.] // *Journal of Optics*. — 2018. — Т. 20, № 7. — С. 075301.
148. Noise in laser speckle correlation and imaging techniques / S. E. Skipetrov [и др.] // *Optics Express*. — 2010. — Т. 18, № 14. — С. 14519—14534.
149. Improving the estimation of flow speed for laser speckle imaging with single exposure time / Y. Wang [и др.] // *Optics letters*. — 2017. — Т. 42, № 1. — С. 57—60.
150. Laser speckle rheology for evaluating the viscoelastic properties of hydrogel scaffolds / Z. Hajjarian [и др.] // *Scientific reports*. — 2016. — Т. 6. — С. 37949.
151. Measuring Viscoelasticity by Tracking Vibration Based on Laser Speckle Contrast Imaging / X. Chen [и др.] // *Asia Communications and Photonics Conference*. — Optical Society of America. 2016. — AF3A—7.
152. Laser speckle contrast imaging with extended depth of field for in-vivo tissue imaging / I. Sigal [и др.] // *Biomedical optics express*. — 2014. — Т. 5, № 1. — С. 123—135.

153. In vivo laser Doppler holography of the human retina / L. Puyo [и др.] // Biomedical optics express. — 2018. — Т. 9, № 9. — С. 4113—4129.
154. Choroidal vasculature imaging with laser Doppler holography / L. Puyo [и др.] // Biomedical optics express. — 2019. — Т. 10, № 2. — С. 995—1012.
155. Holographic laser Doppler retinal imaging / L. Puyo [и др.] // Investigative Ophthalmology & Visual Science. — 2018. — Т. 59, № 9. — С. 5861—5861.
156. High-speed holographic imaging of the retina / M. Atlan [и др.] // Investigative Ophthalmology & Visual Science. — 2017. — Т. 58, № 8. — С. 3126—3126.
157. Measuring cerebral blood flow using magnetic resonance imaging techniques / F. Calamante [и др.] // Journal of cerebral blood flow & metabolism. — 1999. — Т. 19, № 7. — С. 701—735.
158. Use and effect of vasopressors after pediatric traumatic brain injury / J. L. Di Gennaro [и др.] // Developmental neuroscience. — 2010. — Т. 32, № 5/6. — С. 420—430.
159. Vasopressor use and effect on blood pressure after severe adult traumatic brain injury / P. Sookplung [и др.] // Neurocritical care. — 2011. — Т. 15, № 1. — С. 46—54.
160. Bifrontal measurements of brain tissue PO<sub>2</sub> in comatose patients / K. L. Kiening [и др.] // Intracranial Pressure and Neuromonitoring in Brain Injury. — Springer, 1998. — С. 172—173.
161. 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.
162. Dynamic in vivo imaging of cerebral blood flow and blood–brain barrier permeability / O. Prager [и др.] // Neuroimage. — 2010. — Т. 49, № 1. — С. 337—344.

163. PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury / Н. Hagberg [и др.] // Journal of neurochemistry. — 2004. — Т. 90, № 5. — С. 1068—1075.
164. Dynamic Laser Speckle Imaging (Preprint). — Доступ: 2019-11-15. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/626515v2.article-metrics>.
165. Principle, validity, and reliability of scanning laser Doppler flowmetry. / G. Michelson [и др.] // Journal of glaucoma. — 1996. — Т. 5, № 2. — С. 99—105.
166. Scanning laser Doppler flowmeter study of retinal blood flow in macular area of healthy volunteers / I. Kimura [и др.] // British journal of ophthalmology. — 2003. — Т. 87, № 12. — С. 1469—1473.

## Приложение А

### Исходный код

А.1 Набор функций, выполняющих численной моделирование сигнала лазерной спекл-визуализации от сосуда произвольного диаметра, с произвольной концентрацией рассеивающих центров

```

1. def norm2d(array, mmax = None, mmin = None):
2.     if mmax is None:
3.         mmax = np.amax(array)
4.     if mmin is None:
5.         mmin = np.amin(array)
6.     array = (array - mmin)/(mmax-np.amin(array))
7.
8.     return (array*255).astype(np.float32)
9.
10. def norm_(a, maxx=1):
11.     a = np.interp(a, (a.min(), a.max()), (0, maxx))
12.     return (a).astype(np.float32)
13.
14. def circ_mask(l, r):
15.     c = np.int(l/2)
16.     mask = np.zeros([l, l], np.uint8)
17.     XX, YY = np.meshgrid(range(l), range(l))
18.     mask[(XX-c)**2+(YY-c)**2<=r**2] = 1
19.     return mask
20.
21. def ang_spec_propagator(l,z, fx, fy, wavelength):
22.     XX, YY = np.meshgrid(range(l), range(l))
23.     kk = np.zeros([l,l], np.complex64)
24.
25.     for i in range(l):

```

```

26.         for j in range(1):
27.             kk[i,j] = np.sqrt(1-(wavelength*fy[i])**2-(wavelength*fx[j])**2)
28.
29.     propagator = np.exp(1j*z*kk)
30.     return propagator
31.
32. def get_phase2d(com_arr):
33.     phase = np.arctan2(np.imag(com_arr), np.real(com_arr))
34.     return phase
35.
36. def get_phase3d(com_arr):
37.     phase = np.zeros([com_arr.shape[0], com_arr.shape[1], com_arr.shape[2]], np.float32)
38.     for i in range(phase.shape[2]):
39.         phase[:, :, i] = np.arctan2(np.imag(com_arr[:, :, i]), np.real(com_arr[:, :, i]))
40.     return phase
41.
42. def lens4f(arrayIn, mask, propagator=None):
43.     if propagator is None:
44.         f_arrayIn = np.fft.fftshift(np.fft.fft2(arrayIn))*mask
45.     else:
46.         f_arrayIn = np.fft.fftshift(np.fft.fft2(arrayIn))*mask*propagator
47.     arrayOut = np.fft.ifft2(np.fft.ifftshift(f_arrayIn))
48.     return arrayOut
49.
50. def lens2f (arrayIn, propagator=None):
51.     if propagator is None:
52.         arrayOut = np.fft.fftshift(np.fft.fft2(arrayIn))
53.     else:
54.         arrayOut = np.fft.fftshift(np.fft.fft2(arrayIn*propagator))
55.     return arrayOut
56.
57. def viewer (arrayIn, vmin = 0, vmax = 1):
58.     img1 = None
59.     for i in range(arrayIn.shape[2]):
60.         if img1 is None:
61.             img1 = plt.imshow(arrayIn[:, :, i], vmin=vmin, vmax=vmax)
62.         else:
63.             img1.set_data(arrayIn[:, :, i])
64.             plt.draw()
65.             plt.pause(0.05)
66.     plt.close()
67.
68. def get_vessel_geometry(l, vessel_mask, fraction):
69.     complex_volume_3d = np.random.uniform(0, 1, [l, l, l])*np.exp(1j*2*3.14*np.random.unifor
70.     m(0, 1, [l, l, l]))
71.     vessel_mask_3d = np.repeat(vessel_mask[:, :, np.newaxis], l, axis=2)
72.     vessel_mask_3d = np.transpose(vessel_mask_3d, [2, 1, 0])
73.
74.     for i in progressbar.progressbar(range(1)):
75.         results = np.where(vessel_mask_3d[:, :, i] == 1)
76.
77.         rows = np.sort(results[0])
78.         cols = np.sort(results[1])
79.
80.         if rows.size != 0 and cols.size != 0:
81.             x0 = cols[0]
82.             y0 = rows[0]
83.
84.             if rows[0] == rows[-1]:
85.                 height = 1
86.             else:
87.                 height = rows[-1] - rows[0] + 1
88.
89.             if cols[0] == cols[-1]:
90.                 width = 1
91.             else:
92.                 width = cols[-1] - cols[0] + 1

```

```

93.         blank = np.zeros([height, width], np.int)
94.         k = np.int(np.round(fraction * height * width))
95.         indx_lin = (np.random.choice(np.random.permutation(width * height), k))
96.         indx_unv = np.unravel_index(indx_lin, [height, width])
97.         blank[indx_unv[0], indx_unv[1]] = 1
98.         vessel_mask_3d[y0: y0 + height, x0: x0 + width, i] = blank
99.
100.        complex_volume_3d = complex_volume_3d * vessel_mask_3d
101.        return complex_volume_3d, vessel_mask_3d
102.
103.    def get_parabolic_velocity_prof_3d(l, peak_vel, vessel_r):
104.        [XX, YY, ZZ] = np.meshgrid(range(1), range(1), range(peak_vel))
105.
106.        parab3d = (((XX - 1/2)/(vessel_r/np.sqrt(peak_vel)))**2 + \
107.                  ((YY - 1/2)/(vessel_r/np.sqrt(peak_vel)))**2 <= ZZ)
108.
109.        return parab3d
110.
111.    def get_parabolic_velocity_prof_2d(l, peak_vel, vessel_r):
112.        [XX, YY] = np.meshgrid(range(1), range(1))
113.        parab2d = peak_vel - (((XX - 1/2)/(vessel_r/np.sqrt(peak_vel)))**2 + \
114.                              ((YY - 1/2)/(vessel_r/np.sqrt(peak_vel)))**2)
115.        parab2d[parab2d < 0] = 0
116.
117.        return parab2d
118.
119.    def get_ref(l, k_ref, dx):
120.        [XX, YY] = np.meshgrid(range(1), range(1))
121.        ref = np.exp(1j*2*np.pi*(1/k_ref*(XX)*dx+1/k_ref*(YY)*dx))/100000
122.        return ref
123.    def find_nearest(array, value):
124.        array = np.asarray(array)
125.        idx = (np.abs(array - value)).argmin()
126.        return idx

```

Листинг А.2 Набор команд, выполняющий расчет комплексного сигнала лазерной спекл-визуализации в трехмерном пространстве от динамических рассеивателей, вносящих известный фазовый сдвиг, вызванный эффектом Доплера, его проекцию на двумерную плоскость, а также учет эффектов конечной числовой апертуры изображающей линзы.

```

1. %matplotlib inline
2. import numpy as np
3. import matplotlib.pyplot as plt
4. import progressbar
5.
6.
7. dim = 256
8. vessel_radius = dim/4
9. lens_radius = np.int(2*np.sqrt(2)*dim/(3+np.sqrt(2))/4)
10. print(lens_radius)
11. fraction = 0.5
12. shift = 1
13. realizations = 256
14. ww = vessel_radius
15. wavelength = 0.63
16. k_wave = 2 * 3.14 / wavelength
17.
18. dx = 1
19. F = 1/dx

```

```

20. fx = [-F/2 + F/dim*df for df in range(dim)]
21. fy = fx
22.
23. k_ref = np.sqrt(2)*3*F/(6+2*np.sqrt(2))
24. k_ref = (k_ref/2)
25. print(k_ref)
26. print (find_nearest(fx, k_ref))
27.
28. doppler_angle = np.deg2rad(85)
29. T = 1/390
30.
31. speckles = np.zeros([dim,dim,realizations], np.complex64)
32.
33. vessel_mask = circ_mask(dim, vessel_radius)
34. lens_mask = circ_mask(dim, lens_radius)
35.
36. vessel_geometry_3d, vessel_mask_3d = get_vessel_geometry(dim, vessel_mask, fraction)
37.
38. velocity_profile_3d = get_parabolic_velocity_prof_3d(dim, shift, vessel_radius)
39.
40. velocity_profile_2d = get_parabolic_velocity_prof_2d(dim, shift, vessel_radius)*500*4*np.cos
    (doppler_angle)*np.pi*T/wavelength
41.
42. speckles[:, :, 0] = lens4f(np.sum(vessel_geometry_3d[:, :, np.int(dim/2-
    ww/2):np.int(dim/2+ww/2-1)], axis=2), lens_mask)
43.
44. bar = progressbar.ProgressBar(max_value=realizations - 1)
45. for sh in range(realizations-1):
46.     for i in range(dim):
47.         for j in range(dim):
48.             if velocity_profile_2d[i, j] != 0:
49.                 vessel_geometry_3d[:, j, i] = (vessel_geometry_3d[:, j, i])*1\
50.                 *np.exp(1j*velocity_profile_2d[i,j])
51.     speckles[:, :, sh+1] = lens4f(np.sum(vessel_geometry_3d[:, :, np.int(dim/2-
    ww/2):np.int(dim/2+ww/2-1)],axis=2), lens_mask)
52.     bar.update(sh)

```