

ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ БЕСКОНТАКТНОГО ЛАЗЕРНОГО ФЛОУМЕТРА И ИЗМЕРЕНИЕ ЕГО ОСНОВНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК

Мареев Г.О.¹, Мареев О.В.¹, Луцевич С.И.¹, Тучин В.В.², Федосов И.В.²

¹ГБОУ ВПО «Саратовский Государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, Россия, e-mail: dr-mareev@mail.ru

²ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского», Саратов, Россия

Статья описывает основные конструктивные особенности бесконтактного прибора для измерения микроциркуляторного кровотока в тканях – лазерного доплеровского флоуметра. Проведенные нами измерения параметров изготовленной нами установки доказали возможность применения этого флоуметра для измерений на биологических объектах. Были теоретически рассчитаны и затем экспериментально обоснованы такие важные технические параметры как зависимость показаний установки от скорости кровотока в капилляре, изменения концентрации раствора, температуры окружающей среды, от угла расположения объекта исследования, средняя глубина измерения. Проведенные опыты также показали зависимость точности показаний прибора от дистанции до объекта и возможность точно наводить установку на объект исследования по размеру пятна лазера на объекте и уровню сигнала, контролируемому на слух. Была также разработана методика калибровки данного лазерного доплеровского флоуметра, что обеспечивало высокую стабильность измерений.

Ключевые слова: лазерный доплеровский флоуметр, флоуметрия, микроциркуляторный кровоток.

FEATURES OF THE NON-CONTACT LASER DOPPLER FLOWMETER AND ASSESSMENT OF IT'S MAIN PARAMETERS

Mareev G.O.¹, Mareev O.V.¹, Lucevich S.I.¹, Tuchin V.V.², Fedosov I.V.²

¹Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, Russia, e-mail: dr-mareev@mail.ru

²Saratov State University, Saratov, Russia

Current article describes the main design features of non-contact instrument for measuring microcirculatory blood flow in the tissues - laser doppler flowmeter. Our investigations proved that our setup has the possibility of measurements on biological objects. We theoretically calculated and then experimentally proved important technical parameters such as the measuring the speed of blood flow in the capillary, the solution concentration change, the solution temperature, the angle of the object of study, the average depth of measurement. The experiments also showed the great dependence of the accuracy of the readings on the distance to the subject, and also the ability to precisely aim our setup on the object of study based on the size of the laser spot on the object and the level of the signal monitored by ear. We developed a method of calibration of laser doppler flowmeter, which ensures high stability of measurements.

Keywords: laser doppler flowmeter, flowmetry, microcirculation.

Лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ) - метод, использующийся для измерения объемной скорости кровотока и оценки состояния микроциркуляторного русла. Для исследования микроциркуляции крови применяется зондирование ткани лазерным излучением с регистрацией доплеровского сдвига частоты рассеянного когерентного лазерного излучения движущимися в ткани клетками крови. Первые экспериментальные исследования с использованием ЛДФ были выполнены в начале 70-х годов XX века [6, 8]. В эти годы различными авторами было построено значительное количество экспериментальных установок и заложены основы методологии обработки ЛДФ-сигнала [7]. В 1980-м году были представлены первые разработки с использованием гибкой волоконной

оптики для точечных измерений микроциркуляторного русла в контролируемом объеме ткани. В настоящий момент используются как системы на основе волоконной оптики, так и на основе CMOS-камер. Все описанные нами приборы для измерения кровотока методом лазерной доплеровской флоуметрии являются контактными или инвазивными, что уменьшает их ценность при исследовании богато иннервированных органов. В литературе описаны бесконтактные датчики для лазерной доплеровской флоуметрии специальной конструкции [4, 6, 7]. Однако эти приборы предназначены для измерения микроциркуляторного русла сетчатки глаза и не подходят для использования, например, в оториноларингологии [1, 2].

Цель исследования – разработка конструкции флоуметра для бесконтактного контроля микроциркуляторного кровотока методом ЛДФ.

Материалы и методы исследования

Нами был сконструирован оригинальный флоуметр собственной конструкции (рис. 1). Линзой-конденсором (4) испускаемое лазером (3) излучение фокусируется в плоскость промежуточного фокуса. При этом в плоскости промежуточного фокуса размещено специальное наклонное зеркало с отверстием (5), которое установлено таким образом, что лазерное излучение попадает в отверстие в наклонном зеркале (11) диаметром 0,5 мм и, проходя через него, фокусируется затем при помощи линзы-объектива (6) в плоскость исследуемого объекта (7). Фокусное расстояние объектива равно 250 мм, что достаточно для решения задачи по фокусировке лучей на небные миндалины, находящиеся в глотке человека. На устройство получен патент РФ [3].

Лазерное излучение, рассеянное движущимися частицами, содержащимися в исследуемом объекте (7), проходя через объектив (6), попадает на наклонное зеркало (5) и, отражаясь от него, на фотоприемник (8). При этом непосредственно отраженное с поверхности ткани лазерное излучение не попадает на фотоприемник, а уходит через отверстие в наклонном зеркале, что позволяет исключить засветку фотодиода сильным постоянным излучением. Таким образом, с помощью наклонного зеркала с отверстием в данной конструкции флоуметра решается проблема оптического разделения излучения, отраженного с поверхности объекта, и рассеянного движущимися частицами. Фотоприемник (8) преобразует рассеянное излучение в электрический сигнал, пропорциональный интенсивности излучения, который затем поступает на вход усилителя тока фотодиода (9), где происходит его усиление. Прибор смонтирован на основании щелевой лампы (2), жестко закрепленном на лабораторном столе (13). Исследуемый объект (7) жестко закрепляется на подголовнике щелевой лампы, установленном на заданном расстоянии от установки (12). За счет жесткой связи всех элементов оптической системы, включая исследуемый объект,

обеспечивается необходимая стабильность оптической системы при выполнении измерений. После усиления сигнала усилителем тока фотодиода (8) сигнал превращается АЦП в цифровую форму, и он попадает в персональный компьютер - устройство для регистрации и обработки сигнала (9). Дальнейшая обработка цифрового сигнала проводилась специально разработанной авторами для этой цели программой. Программа осуществляет в реальном времени анализ данных, поступающих со звуковой карты по описанным выше методикам математической обработки, позволяя определять спектральные моменты M_0 , M_1 , M_{1n} , отражая их в виде ЛДФ-граммы. Также программа ведет расчет различных статистических параметров кривой ЛДФ-граммы – максимальные, минимальные, средние значения, коэффициент вариации K_v , и др.

Для калибровки флоуметра нами был применен способ с использованием броуновского движения взвеси или эмульсии стандартных микрочастиц. В качестве стандарта (1,0 tpu – tissue perfusion units, относительная единица измерения, обозначающая объемный кровоток) использовали стерильную 10%-ную жировую эмульсию «Липовеноз» (фирма «Fresenius Kabi», Австрия).

Результаты исследований и их обсуждение

Важнейшим параметром бесконтактного лазерного доплеровского флоуметра является зависимость его показаний от расстояния до объекта исследования, так как в нашем случае объект исследования – небные миндалины - из-за вариабельности размеров глотки, рта, челюстей, и самих миндалин сложно точно поместить в точку фокуса объектива установки.

Наведение осуществляется по размеру пятна лазера, фокусируемому на объекте, а также по максимальному уровню сигнала, контролируемому на слух через громкоговорители. Для того, чтобы определить правильность выбранных нами методов контроля расстояния от установки до объекта – размеров лазерного пятна на объекте и уровня сигнала, который контролируется на слух нами была выполнена серия из 150 экспериментов, в которых проводилось точное наведение на исследуемый объект. При этом проводили калибровку флоуметра по обычной методике. Флакон с эмульсией оставался закрепленным на оголовье и являлся объектом исследования. Затем проводилось наведение на объект в 50 экспериментах с использованием только размеров лазерного пятна на объекте исследования (динамики выключались), в 50 экспериментах с использованием только наведения на слух по уровню сигнала и в 50 экспериментах – с использованием обеих методов наведения. После выбора расстояния до объекта проводилась запись параметров в течение 2 минут в каждом случае. При анализе результатов можно сделать вывод, что совокупность двух используемых методов наведения на объект является наилучшим

методом контроля расстояния от установки до объекта исследования (92% попаданий в зону 5%-ной погрешности прибора, при среднем отклонении от расчетной точки 1,1 мм). В дальнейшем для выбора расстояния до объекта всегда использовались оба метода.

Максимально допустимый угол расположения плоскости исследуемого объекта к оптической оси прибора был определен нами экспериментально при помощи плоской емкости размерами 5x4x1,5 см, заполненной эмульсией «Липовенос», закрытая сверху прозрачной пленкой толщиной 20 мкм. Угол отклонения плоскости исследуемого объекта от оптической оси прибора фиксировался при помощи угломера (тип 1-2 ГОСТ 5378-88). Анализируя полученные результаты, следует отметить, что при расположении плоскости объекта под небольшими углами (до 20°) показания прибора практически не меняются. Что вполне объяснимо, так как практически не изменяется объем исследуемого объекта, захватываемый при исследовании. Изменяется лишь наличие отраженной от поверхности составляющей сигнала. Только при углах расположения плоскости объекта больше 20°, показания флоуметра начинают уменьшаться. Область 5%-ной погрешности флоуметра лежит в диапазоне значений углов от 0° до 26°. Это позволяет использовать данный прибор для измерений на небных миндалинах, так как вполне возможно обеспечить такие углы расположения поверхностей исследуемых объектов при наведении прибора.

Зависимость показаний флоуметра от скорости протекающей перед ним жидкости в определенном объеме сосуда определена нами в эксперименте с использованием капилляра, по которому протекает жидкость, содержащая частицы, рассеивающие свет. Экспериментальная установка состояла из водяного манометра, шприца для создания необходимого давления в системе, и трубок, соединяющих исследуемый капилляр через тройник с манометром и шприцем. Такая установка позволяет создавать ламинарное течение жидкости с определенной скоростью, определяемой по высоте водяного столба в водяном манометре. В качестве жидкости использовалась вода с разведенной в ней акварельной краской красного цвета. В результате экспериментов (рис. 2) получено, что зависимость показаний флоуметра от скорости тока жидкости через капилляр носит линейный характер на начальном участке графика (0 – 5,5 мм/с). При этом при скорости тока жидкости через капилляр в 3,6-3,9 (60 мм вод. ст. - разность давления в системе), возникает насыщение флоуметра; кривая принимает пологий характер. Это связано с тем, что при таких скоростях тока жидкости, содержащей рассеивающие частицы, доплеровский сдвиг начинает выходить за пределы полосы пропускания частот звуковой карты (22,2 кГц), и, таким образом, измерения, становятся невозможны. Скорость кровотока в системе микроциркуляции составляет около 0,5 – 0,7 мм/с в капиллярах диаметром 0,001 – 0,005 мм, в венах калибра 0,2 – 2,0 мм - около 1 – 10 мм/с, в артериолах и малых артериях калибра

0,2-1,0 мм - около 2 – 100 мм/с. Таким образом, сконструированный нами флоуметр вполне пригоден для измерения кровотока в капиллярной сети небных миндалин, так как скорости тока крови в них находятся в пределах интервала насыщения флоуметра.

Для определения границ области применения флоуметра, кроме зависимости показаний от скорости тока жидкости через исследуемый объект, мы также экспериментально определяли зависимость показаний прибора от концентрации движущихся рассеивающих частиц в исследуемом объекте. Эксперимент произведен при помощи шприца объемом 20 мл, заполненного водой, в которой взвешены частицы акварельной краски. При этом можно контролировать разведение исследуемого раствора в шприце. При проведении эксперимента, изменялось разведение исследуемой жидкости в шприце от исходной концентрации краски, принятой условно за 1,0, до разведения в 25 раз. Начальная калибровка прибора проводилась по раствору с исходной концентрацией краски, установка нуля прибора осуществлялась обычным способом. После каждого разведения в течение 4 минут снимались показания флоуметра. Для оценки разведения из показателей флоуметра использовался первый нормированный спектральный момент. Результаты этого эксперимента (рис. 3) позволили сделать вывод о том, что показания прибора находятся в линейной зависимости от концентрации частиц в исследуемом объекте.

Теоретически глубина проникновения в ткани определяется расстоянием между источником лазерного излучения и детектором рассеянного излучения, а также оптическими свойствами исследуемой среды и длиной волны используемого источника лазерного излучения. Таким образом, глубина зондирования тканей сконструированного нами флоуметра, должна быть равна 1,5 – 2,0 мм, что соответствует приблизительно половине расстояния излучатель-детектор в нашей системе [5]. Эти значения были подтверждены экспериментом, в котором исследовалось проникновение лазерного излучения в ткань миндалин. Для эксперимента использовалась ткань миндалин, полученная в результате тонзиллэктомии, фиксированная в 10%-ном растворе формалина и затем в парафиновом блоке, после чего нарезанная при помощи микротомы слоями толщиной 30 мкм. Перед исследованием проводилась калибровка флоуметра по стандартной методике. Затем на калибровочную емкость накладывался слой ткани небной миндалин и снимались показания флоуметра, с периодическим наращиванием толщины слоя.

Для вычисления «биологического нуля» ткани небных миндалин нами использовался свежий препарат небных миндалин, полученный в ходе тонзиллэктомии. Среднее значение «биологического нуля», определенное таким образом в эксперименте для ткани небной миндалин, составляет $0,070 \pm 0,014$ тпу.

Для определения работоспособности флоуметра *in vivo* измерялся кровоток в подушечке пальца человека. По результатам этого исследования, проведенного у 167 человек, средний кровоток в коже пальца составил $0,443 \pm 0,020$ тпу, средний коэффициент вариации $Kv=5,22 \pm 1,26\%$. Кроме того, проводился окклюзионный тест, для чего палец обследуемого обвязывался у основания хлорвиниловым жгутом для сдавления *aa. digitales* и определения степени падения микроциркуляторного кровотока и биологического нуля ткани. График тканевой перфузии (ЛДФ-грамма), полученный при помощи флоуметра нашей конструкции, вполне соответствует аналогичным графикам, выполненным с помощью других приборов. Также прибор весьма чувствителен к изменениям регионарного кровотока, что подтверждает проведение нами окклюзионного теста.

Заключение

Проведенные эксперименты показывают, что разработанный нами флоуметр в целом пригоден для выполнения измерений на биологических объектах *in vivo*, а также для выполнения окклюзионных тестов, что является весьма важным в последующей разработке методик обследования больных.

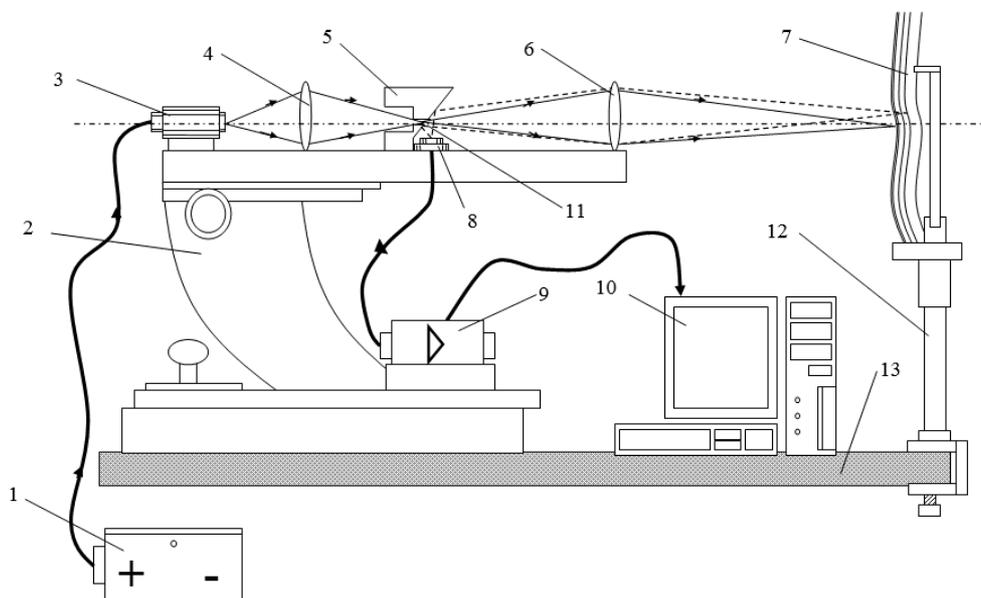


Рис. 1. Схема бесконтактного лазерного доплеровского флоуметра, ход лучей: 1 – блок питания лазера; 2 – основание щелевой лампы; 3 - источник лазерного излучения; 4 – конденсор; 5 – наклонное зеркало с отверстием; 6 – объектив; 7 – исследуемый объект; 8 – фотоприемник; 9 – усилитель тока фотодиода; 10 – устройство для регистрации и обработки сигнала фотоприемника (компьютер с АЦП); 11 – отверстие в наклонном зеркале 5; 12 – подголовник щелевой лампы; 13 - основание установки (лабораторный стол); сплошной линией изображены ход лазерного излучения и ход отраженных от поверхности лучей; пунктирной линией изображены ход рассеянных тканью и движущимися в ней частицами лучей.

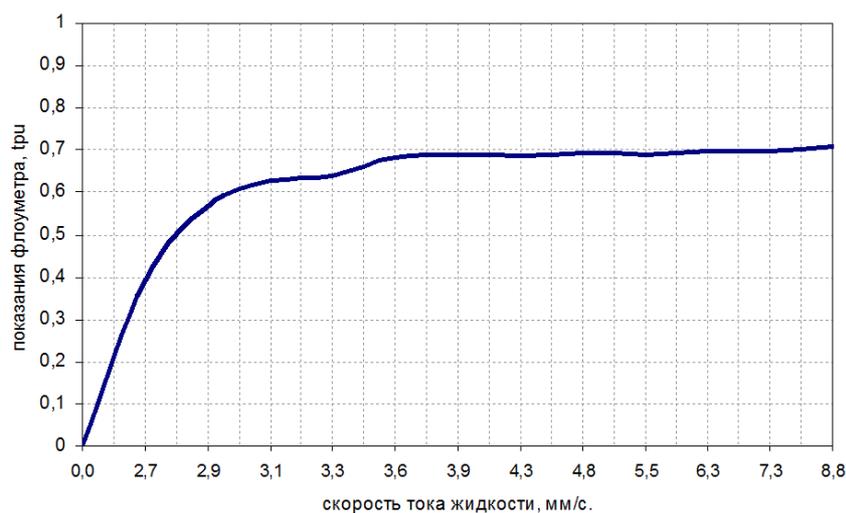


Рис. 2. Экспериментальная зависимость показаний флоуметра от скорости тока жидкости в капилляре.

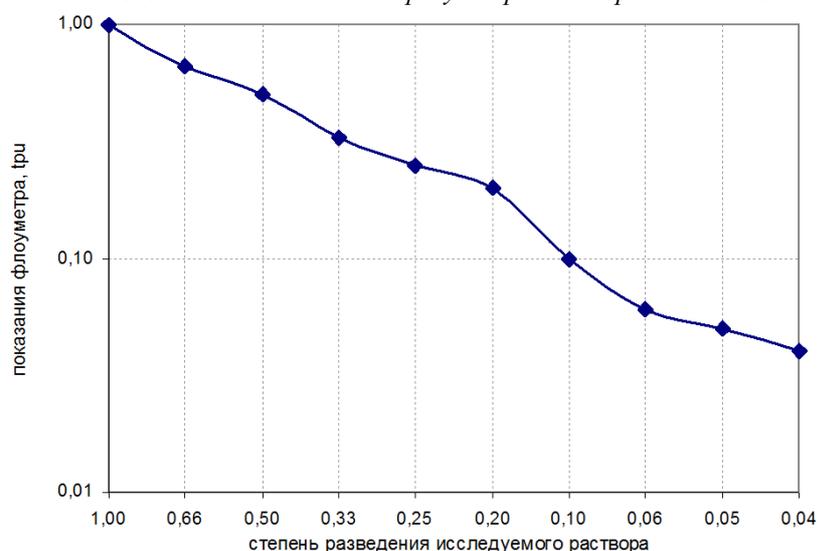


Рис. 3. Экспериментальная зависимость показаний прибора от концентрации движущихся рассеивающих частиц в исследуемом объекте.

Список литературы

1. Мареев Г.О. Лазерная доплеровская флоуметрия в диагностике хронического тонзиллита: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Оренбургская государственная медицинская академия. Оренбург, 2005. – 18 с.
2. Мареев О.В., Луцевич С.И., Мареев Г.О. Исследование микроциркуляции слизистой носа с помощью бесконтактной лазерной доплеровской флоуметрии // Российская ринология. - 2006. - № 2. - С. 23-24.
3. Тучин В.В., Мареев О.В., Федосов И.В., Мареев Г.О. Устройство для бесконтактного определения объемного кровотока // патент РФ №2238671. 2003.
4. Geiser M.H., Diermann U., Riva C.E. Compact Laser Doppler Choroidal Flowmeter // J. Biomed. Opt. - 1999. - Vol. 4. - №4. - p. 459-464.

5. Mareew G.O., Mareew O.V., Fedosov I.V., Tuchin V.V. Design of sensors for microcirculation investigation in pharyngeal mucosa. В сборнике: Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE Saratov Fall Meeting 2003 - Optical Technologies in Biophysics and Medicine V. Сер. "Saratov Fall Meeting 2003 - Optical Technologies in Biophysics and Medicine V" sponsors: SPIE Russia Chapter, CRDF- U.S. CRDF for the Indep. States of the Former S.U., Almus, Ltd. (Russia); editors: V.V. Tuchin, Saratov State University, Russia. Saratov, 2004. С. 291-295.
6. Riva C. E., Ross B., Benedek G. B. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries // Invest. Ophthalmol. - 1972. - Vol.11. - P.936-944.
7. Shepherd A. P. History of Laser Doppler blood Flowmetry // In: Laser Doppler blood flowmetry, A. P. Shepherd and P.A Oberg (Eds.). - Kluwer Academic Publishers, 1990. - P.1-16.
Stern M. D. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering // Nature. - 1975. - Vol.254. - P. 56-58.

Рецензенты:

Еремина Н.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры оториноларингологии ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» министерства Здравоохранения Российской Федерации, г.Санкт-Петербург;

Скрипаль А.В., д.ф.-м.н., заведующий кафедрой медицинской физики факультета нано- и биомедицинских технологий ФГБОУ ВПО «СГУ им. Н.Г. Чернышевского», г.Саратов.