

УДК 681.786

О. П. Максименко, І. Я. Коцюмбас, В. І. Ткаченко, М. І. Березюк,
Л. І. Муравський, О. М. Щербентовська

ВИКОРИСТАННЯ ДИНАМІЧНИХ СПЕКЛ-ПОЛІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ IN VITRO У М'ЯЗОВІЙ ТКАНИНІ

The spatial-temporal correlation method for research the speckled dynamic fields of the skeletal muscular tissue is proposed. Experimental device and results for investigation of the skeletal muscular tissue samples are represented and discussed.

Keywords: *digital image correlation, skeletal muscular tissue I, dynamic speckles.*

Запропоновано використовувати метод просторово-часової кореляції для дослідження динамічних спекл-полів скелетної м'язової тканини. Описано експериментальну установку та наведено результати досліджень зрізів м'язової тканин.

Ключові слова: *цифрова кореляція зображень, скелетна м'язова тканина, динамічні спекли.*

Під час взаємодії світла з біооб'єктами, які проявляють життєдіяльність, простежуються складні процеси відбивання, розсіювання і поглинання випромінювання [1]. В результаті випадкової зміни фази відбитих та заломлених хвиль на структурних елементах біооб'єкта спостерігається багатопроменева інтерференція і формуються просторові динамічні поля – біоспекли. Зміни у структурних елементах поверхні або приповерхневих шарів біооб'єктів призводять до зміни умов розсіювання і заломлення променів, що відображається у просторово-часовій зміні інтерференційного поля, яке візуально проявляється у вигляді мерехтіння біоспеклів [6].

Структурні елементи біотканини мають різні показники заломлення, форму, а їх розміри знаходяться в межах від десятків нанометрів до декількох сотень мікрометрів, що ускладнює створення єдиної математичної моделі, яка б описувала поширення світла у біооб'єктах. Проведені експерименти свідчать, що для зондування приповерхневих шарів біотканин доцільно використовувати джерела світла з довжиною хвилі випромінювання від 600 до 1500 nm, на яких спостерігається мінімум поглинання [1]. Під час дослідження властивостей біотканин використовують звичайно малопотужні джерела випромінювання, щоб уникнути додаткових збурень у процеси, які є предметом вивчення.

Методи дослідження динамічних спеклів. Відомий метод дослідження біотканин на основі оцінки статистичних моментів зміни у часі інтенсивності спекл-полів, які виникають у процесі взаємодії лазерного випромінювання з об'єктом – LASCA (laser speckle contrast analysis) [7]. Цей метод розроблено для моніторингу мікроциркуляції крові в кровоносних судинах у нормі та при патології [5, 8]. При цьому припускають просторову статистичну однорідність спекл-полів на невеликих (локальних) ділянках. Розбиваючи зображення біооб'єкта на фрагменти невеликих розмірів, розраховують для кожного фрагмента коефіцієнт контрасту спекл-полів, при фіксованій тривалості експозиції T [7]

$$LASCA = \frac{\sigma_{x,y}(T)}{\bar{I}}, \quad (1)$$

де $\sigma_{x,y}(T)$ – просторова дисперсія інтенсивності у фрагменті зображення;
 \bar{I} – середня інтенсивність у фрагменті.

© О. П. Максименко, І. Я. Коцюмбас, В. І. Ткаченко, М. І. Березюк,
Л. І. Муравський, О. М. Щербентовська, 2013

Підбираючи певний час експозиції T за цим методом, отримують просторовий розподіл зміни коефіцієнта контрасту у вигляді зображення, за яким оцінюють швидкість кровообігу у судинах.

В останній час, враховуючи високу чутливість спекл-полів до зміни параметрів середовища і безконтактність оптичних методів, значну зацікавленість викликає застосування динамічних спекл-полів для оцінки властивостей харчових продуктів – стиглість, механічні параметри (твердість, еластичність), пошкодженість, захворювання та ін.

Відомо спосіб [9] виявлення грибкових захворювань плодів квасолі, де за спекл-зображеннями розраховують момент інерції IM . Для розрахунку IM спочатку будують матрицю $M_{i,j}$ на основі підрахунку числа подій N , що відповідають зміні у часі інтенсивності до величини i , яка відбувається відразу після величини j , у кожному пікселі серії послідовних зображень

$$M_{i,j} = \frac{N_{i,j}}{\sum_j N_{i,j}}. \quad (2)$$

За відсутності біоактивності об'єкта матриця $M_{i,j}$ має тільки діагональні елементи. Збільшення біоактивності викликає появу інших елементів матриці. Для кількісної оцінки змін у структурі матриці розраховують її момент інерції IM за аналогією з механічним моментом інерції, тобто

$$IM = \sum_{i,j} M_{i,j} (i - j)^2. \quad (3)$$

Відомо також інші методи кількісної оцінки динамічних спекл-полів із піксельною різницею інтенсивності у серії послідовних зображень – узагальнена різниця [4] та метод Фуїї [11].

Специфічні особливості функціонування різних біологічних об'єктів зумовлюють необхідність побудови для кожного з них спеціальних алгоритмів обробки динамічних спекл-полів. Так, у процесі дослідження параметрів хліба різних сортів [10] для кількісної оцінки параметрів об'єкта будують спеціальну часову структурну функцію, щоб зменшити вплив варіацій інтенсивності зображення.

Відомі дослідження параметрів фруктів та овочів на основі просторово-часової кореляції динамічних спекл-полів [12]. Модифікований метод просторово-часової кореляції використовували для оцінки ступеня якості і свіжості овочів [2]. Метод полягає у реєстрації серії послідовних спекл-зображень поверхні біооб'єкта та нагромадженні зображень у комп'ютер для подальшої обробки. Під час обробки всі зображення розбивають на прямокутні фрагменти, для яких розраховуються коефіцієнти крос-кореляції

$$C_{m,n}^{k+l} = \frac{\left| \left\langle \left(S_{ij}^k - \langle S_{ij}^k \rangle \right) \cdot \left(S_{ij}^{k+l} - \langle S_{ij}^{k+l} \rangle \right) \right\rangle \right|}{\sigma_{ij}^k \cdot \sigma_{ij}^{k+l}}, \quad (4)$$

де i, j – номер пікселя у m, n -му фрагменті цифрового спекл-зображення ($i = 1 \dots I$; $j = 1 \dots J$; $m = 1 \dots M$; $n = 1 \dots N$); S_{ij} – інтенсивність i, j -го пікселя; k – номер відповідного спекл-зображення, $k+l$ – номер наступного спекл-зображення;

$\sigma_{ij} = \sqrt{\left\langle \left(S_{ij} - \langle S_{ij} \rangle \right)^2 \right\rangle}$ – с.к.в. інтенсивності; $\langle \rangle$ – операція усереднення значень за кількістю пікселів у фрагменті зображення.

У результаті обробки спекл-зображень за виразом (4) формується поле кореляційних коефіцієнтів, значення кожного з яких характеризує рівень кореляції між двома відповідними фрагментами зображень. Чим більша подібність фрагментів, тим ближче значення коефіцієнта кореляції наближається до одиниці. Якщо властивості біоспеклів не змінюються по усьому полю спекл-зображення, то амплітудні значення усіх кореляційних піків приблизно однакові і їх можна усереднювати. За результатами досліджень було встановлено часові залежності середніх значень коефіцієнтів кореляції від ступеня свіжості різних зразків овочів [2].

У процесі застосування цього підходу до зрізів м'язової тканини виявлено відмінність умов формування динамічних спекл-полів, у зв'язку з чим виникла потреба модифікувати схему реєстрації зображень та алгоритм їх обробки.

Експериментальна установка. За методом [2] зразки освітлювались розширеним лазерним променем і кут спостереження приблизно відповідав куту падіння лазерного променя. У випадку м'язової тканини така схема освітлення і реєстрації не забезпечує формування розвинутих спекл-полів, оскільки на зображенні наявні яскраві ділянки, зумовлені появою дзеркальної складової відбитого від поверхні зразка світла. Тому для проведення експериментальних досліджень м'язової тканини запропоновано іншу оптичну схему реєстрації спекл-зображень. За новою схемою змінено кут освітлення, щоб уникнути впливу дзеркальної складової. При цьому для збільшення інтенсивності розсіяного випромінювання зразок освітлювали вузьким лазерним променем діаметром приблизно 1 mm. На основі запропонованої схеми було створено нову експериментальну установку для дослідження біоспеклів м'язової тканини. Щоб зменшити вплив вібрацій на результати вимірювань, установку зібрано на оптичній лаві (рис. 1).

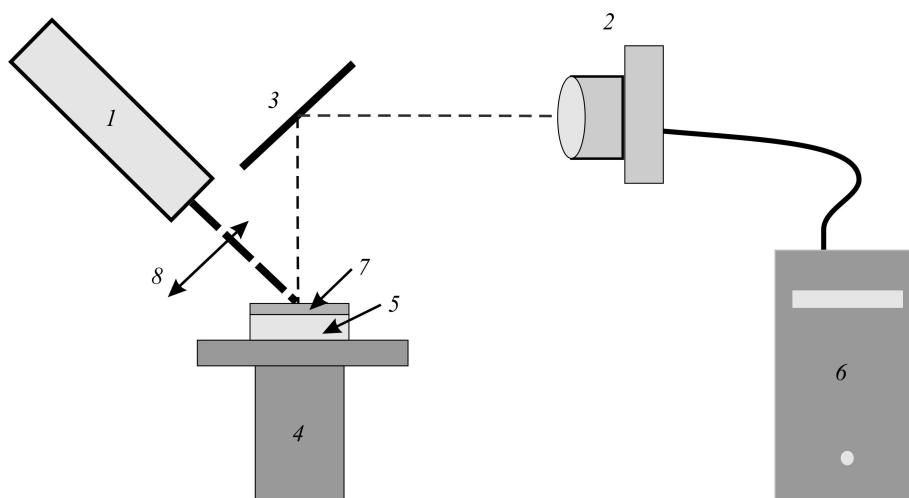


Рис. 1. Схема установки для проведення досліджень біоспеклів м'язової тканини: 1 – лазер; 2 – цифрова відеокамера з об'єктивом; 3 – дзеркало; 4 – предметний столик; 5 – зріз м'язової тканини в кюветі; 6 – персональний комп'ютер з програмним забезпеченням; 7 – предметне скло; 8 – штorkа.

Під час експерименту спеціально підготовлені зрізи м'язової тканини у кюветі 5, які зберігали у холодильнику, встановлювали на предметний столик 4. Зверху зрізи накривали предметним скельцем 7, яке щільно прилягало без утворення повітряних проміжків. Перед вимірюваннями зрізи витримували деякий час, щоб їх температура вирівнялась із кімнатною температурою. Зрізи освітлювали сфокусованим лазерним променем, який спрямовували під кутом 45° до напрямку спостереження. За допомогою дзеркала 3 і об'єктива на чутливій матриці

відеокамери 2 формували зображення поверхні взірця в околі взаємодії лазерного випромінювання з об'єктом (рис. 2).

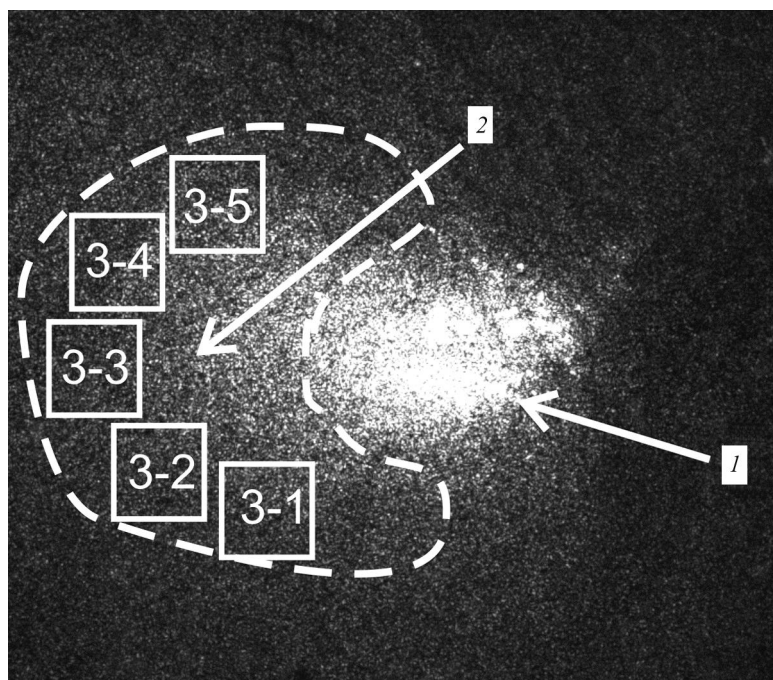


Рис. 2. Зображення поверхні взірця м'язової тканини, освітленого вузьким лазерним променем:
 1 – місце падіння лазерного променя; 2 – область формування розвинутих біоспеклів;
 3-1...3-5 – фрагменти, які використовували для розрахунку значень коефіцієнта крос-кореляції.

Під час дослідження взірців м'язової тканини використовували He-Ne лазер ЛГН 207 ($P = 1,5 \text{ mW}$, $\lambda = 630 \text{ nm}$). Щоб зменшити вплив лазерного випромінювання, об'єкт досліджень освітлювали тільки під час реєстрації зображень. Для цього використовували шторку 8, яка відкривалась синхронно з моментом початку реєстрації зображень. Після температурної і механічної стабілізації взірця реєстрували серію зображень його поверхні у місці падіння лазерного променя. Зображення реєстрували послідовно одне за одним протягом 30 s з інтервалом $\approx 1 \text{ s}$ і записували їх на жорсткий диск комп'ютера. В подальшому зображення обробляли спеціально розробленою програмою, блок-схема якої зображена на рис. 3.

Алгоритм обробки спекл-зображень. Як видно з рис. 2, в місці падіння 1 лазерного променя завдяки значній інтенсивності розсіяного випромінювання і фіксованого часу експозиції відеокамери спекл-картина не спостерігається. В цьому місці інтенсивність зображення перевищує динамічний діапазон відеокамери. На невеликій відстані від місця попадання променя в області 2, окресленій пунктирною лінією, більш чітко спостерігається розвинута спекл-картина, яка поступово зникає вдяки значному розсіюванню випромінювання. Цю область використовували для розрахунку значень коефіцієнтів крос-кореляції між першим і всіма наступними зображеннями. При цьому вибирали п'ять прямокутних фрагментів, рівномірно розподілених у цій області і отримані результати усереднювали.

Вибираючи фрагменти $m, n = (3-1 \dots 3-5)$, керувались тим, що для отримання статистично достовірних результатів розміри фрагментів повинні бути достатньо великими, в межах від 100×100 до 200×200 пікселів. У фрагментах не повинно знаходитись багато перенасичених пікселів з інтенсивністю, яка перевищує дина-

мічний діапазон відеокамери. При обробці зареєстрованих спекл-зображень користувач сам вибирав положення і розміри фрагментів на першому зображенні, керуючись зазначеними критеріями. В подальшому програма автоматично знаходила місце розташування відповідних фрагменти на всіх зареєстрованих спекл-зображеннях і розраховувала значення коефіцієнтів крос-кореляції між першим (вихідним) зображенням k та всіма наступними $l = 1...30$ за виразом (4), для кожної пари відповідних фрагментів m, n . При цьому для кожної пари відповідних фрагментів отримували послідовність значень $C_{m,n}^{k+l}$, які характеризують зміни коефіцієнта крос-кореляції $C(t)$ за час вимірювання $t = l \cdot dt$, де dt – інтервал часу між двома зареєстрованими зображеннями.



Рис. 3. Блок схема програми обробки спекл-зображень.

За результатами обробки спекл-зображень автоматично будувалась залежність зміни значень коефіцієнтів крос-кореляції від часу вимірювання і формувался файл результатів. Типова залежність зміни значень коефіцієнтів крос-кореляції, яку отримували під час досліджень взірців м'язової тканини, зображена на рис. 4. Як видно з наведеного графіка, метод виявився дуже чутливим до проце-

сів, які відбуваються у м'язовій тканині. Навіть протягом декількох секунд спостерігаються значні зміни значень коефіцієнта крос-кореляції.

Обробка експериментальних даних. Аналізуючи отримані залежності зміни коефіцієнтів крос-кореляції в часі, для різних взірців м'язової тканини свині визначено параметри, які змінюються залежно від часу зберігання взірців. Цими параметрами є величина зміни коефіцієнта крос-кореляції $C(t)$ від максимального значення до деякого постійного рівня, інтервал часу τ_0 , за який відбуваються ці зміни, залишкове значення коефіцієнта крос-кореляції $C(\tau_0)$ та значення коефіцієнта крос-кореляції після першої секунди $C(t_1)$ (рис. 4). Використовуючи ці параметри, ми запропонували для інтегральної оцінки змін, які проходять під час зберігання м'язової тканини, розраховувати величину (розмірністю s^{-1}), яку умовно назвали коефіцієнтом активності біоспеклів (КАБ):

$$\text{КАБ} = \frac{C(t_1) - C(\tau_0)}{\int_{t_1}^{\tau_0} C(t) dt}, \quad (5)$$

де $C(t_1)$ – значення коефіцієнта крос-кореляції через інтервал часу dt (під час наших експериментів з м'язовою тканиною $dt = 1$ s); $C(\tau_0)$ – коефіцієнт крос-кореляції вихідного спекл-зображення із зображенням, зареєстрованим через інтервал часу τ_0 .

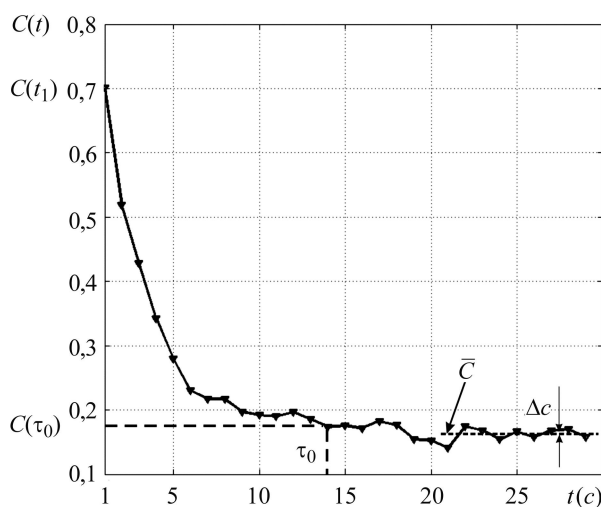


Рис. 4. Типова залежність зміни значень коефіцієнтів крос-кореляції.

Для кількісного оцінювання часу τ_0 і значення $C(\tau_0)$ потрібно визначити постійний залишковий рівень, коли змінами коефіцієнта крос-кореляції можна нехтувати (коли ці зміни знаходяться в межах похибки вимірювання). Для розрахунку цього рівня визначали середнє значення коефіцієнта крос-кореляції за останні 5 s вимірювання $\bar{C} = [C(26) + \dots + C(30)]/5$ і додавали до нього подвійне значення максимального відхилення Δc від цього середнього

$$C(\tau_0) = \bar{C} + 2 \cdot \Delta c. \quad (6)$$

Знаменник у виразі (5) розраховували, інтегруючи отримані числові значення коефіцієнта крос-кореляції за методом трапецій. Використовуючи вирази (4) і

(5), з врахуванням (6), було проведено розрахунки КАБ для взірців м'язової тканини свині, які наведено у табл. 1 і 2.

Таблиця 1. Значення КАБ взірців м'язової тканини свині, які зберігались в охолодженому стані

Розраховані значення КАБ в області 2					Середнє значення КАБ, s ⁻¹
Фрагмент	КАБ, s ⁻¹	τ_0	$C(\tau_0)$	$C(t_1)$	
Час зберігання 28 h при температурі +4°C					
3-1	0,683	5	0,355	0,831	0,505
3-2	0,526	6	0,418	0,861	
3-3	0,428	9	0,375	0,875	
3-4	0,398	21	0,394	0,875	
3-5	0,490	5	0,310	0,858	
Час зберігання 72 h при температурі +4°C					
3-1	0,372	8	0,355	0,828	0,382
3-2	0,300	12	0,383	0,850	
3-3	0,432	8	0,370	0,815	
3-4	0,469	8	0,332	0,797	
3-5	0,336	23	0,201	0,777	

Таблиця 2. Значення КАБ взірців м'язової тканини свині, які зберігались в замороженому стані

Розраховані значення КАБ в області 2					Середнє значення КАБ, s ⁻¹
Фрагмент	КАБ, s ⁻¹	τ_0	$C(\tau_0)$	$C(t_1)$	
Час зберігання 28 h при температурі -4°C					
3-1	0,682	5	0,461	0,817	0,679
3-2	0,577	11	0,411	0,798	
3-3	0,628	5	0,463	0,822	
3-4	0,720	4	0,427	0,794	
3-5	0,789	4	0,325	0,714	
Час зберігання 72 h при температурі -4°C					
3-1	0,375	23	0,383	0,885	0,394
3-2	0,409	8	0,366	0,872	
3-3	0,336	9	0,345	0,884	
3-4	0,394	7	0,365	0,884	
3-5	0,454	20	0,406	0,871	
Час зберігання 144 h при температурі -4°C					
3-1	0,292	10	0,299	0,872	0,296
3-2	0,262	12	0,376	0,889	
3-3	0,260	13	0,398	0,905	
3-4	0,305	13	0,379	0,883	
3-5	0,314	14	0,406	0,882	

Як видно з наведених таблиць, розраховані значення КАБ для різних фрагментів дещо відрізняються, що свідчить про просторову неоднорідність біологічних процесів, які відбуваються у взірцях м'язової тканини. Враховуючи високу просторову чутливість методу, для інтегрального оцінювання зміни властивостей взірців від часу зберігання усереднювали значення КАБ, розраховані для кожного фрагмента. Середні значення наведено у останній колонці кожної таблиці. З отриманих даних чітко видно падіння середнього значення КАБ з часом, що відображає процеси руйнування м'язового волокна (автоліз, руйнування клітинних мембран, порушення їх проникності тощо), які характеризують його старіння.

ВИСНОВКИ

Проведені дослідження виявили існування оберненої залежності оптичної активності взірців м'язової тканини від часу τ_0 , за який значення крос-кореляційного коефіцієнта змінюється від максимального $C(t_1)$ до деякого постійного рівня $C(\tau_0)$, і пряму залежність від величини різниці крос-кореляційних коефіцієнтів $C(t_1) - C(\tau_0)$. Отже, загальним кількісним показником фізико-хімічних процесів, які відбуваються у взірцях м'язової тканини, може слугувати величина КАБ. Чим інтенсивніше відбуваються процеси в біооб'єкті, тим більше значення КАБ. Зменшення біологічної активності досліджуваних взірців м'язової тканини відповідає зменшенню середнього значення КАБ.

1. *Тучин В. В.* Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях: 2-е изд., испр. и доп. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2010. – 488 с.
2. *Франкевич Л. Ф., Максименко О. П., Муравський Л. І.* Дослідження біоспеклів методом просторово-часової спекл-кореляції // Відбір і обробка інформації. – 2005. – Вип. 23(99). – С. 117–121.
3. *Aizu Y., Asakura T.* Bio-speckle phenomena and their application to the evaluation of blood flow // *Optics & Laser Technology*. – 1991. – **23**, № 4. – P. 205–219.
4. *Arizaga R. Cap., N. Rabal H., Trivi M.* Display of local activity using dynamical speckle patterns // *Optical Engineering*. – 2002. – **41**, № 2. – P. 287–294.
5. *Boas D. A., Dunn A. K.* Laser speckle contrast imaging in biomedical optics // *J. of Biomedical Optics*. – 2010. – **15**, № 1. – P. 109–112.
6. *Briers J. D.* The statistics of fluctuation speckle patterns produced by a mixture of moving and stationary scatters // *Optical and Quantum Electronics*. – 1978. – № 10. – P. 364–366.
7. *Briers J. D., Richards R., He X. W.* Capillary blood flow monitoring using laser speckle contrast analysis (LASCA) // *J. of Biomedical Optics*. – 1999. – **4**, № 1. – P. 164–175.
8. *Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion / M. Draijer, E. Hondebrink, T. van Leeuwen, W. Steenbergen // Lasers Med. Sci.* – 2009. – **24**, № 4. – P. 639–651.
9. *Frequency response of biospeckle laser images of bean seeds contaminated by fungi / G. F. Rabelo, A. M. Enes, R. A. Braga, I. M. Fabbro // Biosystems Engineering.* – 2011. – **110**, № 3. – P. 297–301.
10. *Dynamic laser speckle for non-destructive quality evaluation of bread / E. Stoykova, B. Ivanov, M. Shopova et al. // 16th Int. School on Quantum Electronics: Laser Physics and Applications, edited by Tanja Dreischuh, Dimitar Slavov, Proceedings of SPIE.* – 2011. – **7747**. – P. 77470L1–77470L8.
11. *Evaluation of blood flow by laser speckle imaging sensing. Part I / H. Fujii, K. Nohira, Y. Yamamoto et al. // Applied Optics.* – 1987. – **26**. – P. 5321–5325.
12. *Xu Z., Joenathan C., Khorana B. M.* Temporal and spatial properties of the time-varying speckles of botanical specimens // *Optical Engng.* – 1995. – **34**, № 5. – P. 1487–1502.

Фізико-механічний інститут ім. Г. В. Карпенка
НАН України, Львів;
Державний науково-дослідний контрольний
інститут ветеринарних препаратів і кормових добавок

Одержано
21.12.2012