

Визуализация кровеносных и лимфатических сосудов при увеличенном времени экспозиции детектора

В.В.Кальченко, Ю.Л.Кузнецов, И.В.Меглинский

Описана лазерная спекл-контрастная методика для одновременной неинвазивной визуализации кровеносных и лимфатических сосудов живых организмов, основанная на увеличении времени экспозиции детектора. В отличие от стандартных методов флуоресцентной ангиографии в данной методике получение изображения сосудистого русла и демаркация лимфатических и кровеносных сосудов осуществляется без применения токсичных флуоресцентных маркеров. Методика представляется особенно перспективной применительно к физиологии сердечно-сосудистой системы в условиях in vivo.

Ключевые слова: спекл-контраст, время экспозиции, «белые» сосуды, кровеносные сосуды, лимфатические сосуды.

1. Введение

Особое место в задачах оптической диагностики на протяжении вот уже нескольких десятков лет занимает разработка неинвазивных методов визуализации и количественной оценки микроциркуляции кровотока и лимфотока in vivo [1–5]. Понятие микроциркуляции объединяет ряд физиологических процессов, происходящих в периферическом сосудистом русле кровеносной и лимфатической систем, а также в межклеточном пространстве организма [6–12]. Отклонения в показателях микроциркуляции кровотока и лимфотока могут быть признаками различных патологических процессов, тесно связанных с различными заболеваниями, включая диабет [13], атеросклероз [14], варикозное расширение вен [15], анемию [16], ишемическую болезнь [17] и др.

Система лимфатических сосудов играет ключевую роль в человеческом организме и функционирует совместно с системой кровеносных сосудов, обеспечивая нормальную циркуляцию межклеточной жидкости. Лимфатическая система является неотъемлемой частью гомеостаза тканевой жидкости, абсорбции жиров в тонком кишечнике и иммунного ответа при различных патологических состояниях, включая воспаление, лимфедему и метастазирование опухоли. Сама лимфа представляет собой жидкость, состоящую из макромолекул, лейкоцитов и активированных антигенпрезентирующих клеток, которые передвигаются из слепозаканчивающихся лимфатических капилляров в коллекторные лимфатические сосуды и возвращаются в кровотока через лимфатические венозные переходы [6, 12].

V.V.Kalchenko, Yu.L.Kuznetsov. Department of Veterinary Resources, Weizmann Institute of Science, Rehovot, 76100, Israel; e-mail: a.kalchenko@weizmann.ac.il, yursmit@gmail.com

И.В.Меглинский. Department of Physics, University of Otago, PO Box 56, Dunedin 9054, New Zealand; Научно-образовательный институт по оптике и биофотонике, Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; e-mail: igor@physics.otago.ac.nz

Поступила в редакцию 6 августа 2012 г., после доработки – 4 декабря 2012 г.

На сегодняшний день существует довольно большое количество методов, специально разработанных для визуализации сосудистого русла и активно используемых в клинической практике, включая рентгеновское исследование и компьютерную томографию [17], магнитно-резонансную томографию [18], ультразвуковой метод с применением эффекта Доплера [19], лазерную доплеровскую флоуметрию (ЛДФ) [5], сканирующую конфокальную микроскопию [20], оптическую когерентную томографию (ОКТ) [21, 22], капилляроскопию [23], флуоресцентную интравитальную микроскопию (ФИМ) [24] и др. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в развитии методов диагностики сердечно-сосудистой системы, окончательное понимание особенностей функционирования лимфатической системы, тем не менее, до настоящего времени представляется неполным из-за отсутствия подходящих неинвазивных методов визуализации лимфотока и лимфатических микроструктур в условиях in vivo.

Ультразвуковой метод с использованием эффекта Доплера обеспечивает необходимое разрешение при измерении скорости кровотока в сосудах различных тканей, но длина акустической волны, требующаяся для проникновения в глубоко расположенные ткани, ограничена пространственным разрешением до 200 мкм. Использование капилляроскопии требует, чтобы ткани были достаточно тонкими (менее 400 мкм). Магнитно-резонансная ангиография предоставляет в основном информацию о больших кровеносных сосудах, таких как коронарные артерии. Недостатки ОКТ – высокая чувствительность к произвольным движениям объекта исследования и невозможность регистрации параметров потока в лимфатических и кровеносных сосудах диаметром менее 50 мкм при скорости течения в них менее 100 мкм/с. Сильное оптическое рассеивание зондирующего лазерного излучения в биологических тканях существенно ограничивает пространственное разрешение при измерениях скорости кровотока методом ЛДФ.

Визуализация лимфатических сосудов и лимфатических узлов, объединенных между собой в сложную сеть, по которым лимфа движется в сторону сердца, традиционно осуществляется методом ФИМ с использованием инъ-

екций контрастного флуоресцентного вещества [24–26]. Несмотря на качество получаемых изображений и их высокое разрешение, данный метод существенно зависит от биохимических особенностей и токсичности вводимой флуоресцентной субстанции, что приводит к ограничению его применимости.

В настоящей работе представлена лазерная спекл-контрастная (ЛСК) методика одновременной неинвазивной визуализации кровеносных и лимфатических сосудов живых организмов при увеличенном времени экспозиции детектора. ЛСК-методика базируется на принципах динамического рассеяния света (ДРС) [27]. Многочисленные вариации метода ДРС хорошо зарекомендовали себя в различных биомедицинских приложениях диагностического характера, например для контроля изменений капиллярного кровотока [28], работы с изображениями свертывания крови [29], картирования перфузии крови [30] и др. Применительно к задачам чрескожной визуализации кровотока и измерения перфузии ЛСК является альтернативой ЛДФ [5], диффузно-волновой спектроскопии [31–34] или диффузионной ЛДФ [35]. При использовании ЛСК получение изображения сосудистого русла и демаркация лимфатических и кровеносных сосудов осуществляются без применения флуоресцентных маркеров, что снимает ограничения в отношении применимости метода, связанные с токсичностью.

2. Методика проведения эксперимента

На рис.1 представлена схема экспериментальной установки, используемой в настоящей работе для визуализации кровеносных и лимфатических сосудов *in vivo*. Установка сочетает возможность одновременного и поочередного применения методов ФИМ и ЛСК [24–26]. В режиме ФИМ в качестве источника света используется ртутная лампа, свет от которой проходит через оптический фильтр

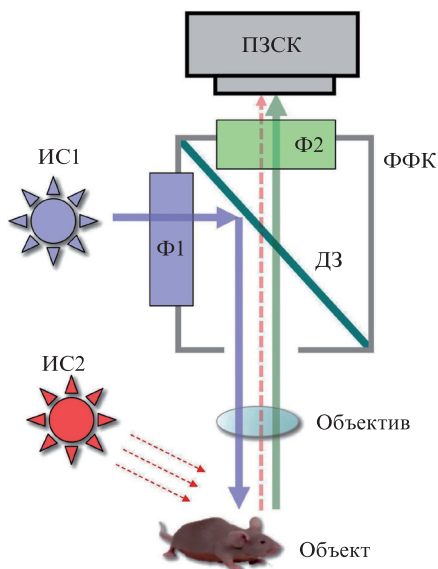


Рис.1. Схема бимодальной экспериментальной установки ЛСК-ФИМ, используемой для визуализации сосудистого русла и микроциркуляции кровотока и лимфатока *in vivo*: ИС1 и ФФК – ртутная газоразрядная лампа и флуоресцентный фильтровый куб, являющиеся частью стандартного флуоресцентного осветителя стереомикроскопа SZX 12 RFL2 (Olympus, Япония); ИС2 – источник рассеянного когерентного лазерного излучения мощностью 10 мВт с длиной волны 670 нм (ELFI-C, Израиль); ПЗСК – ПЗС-камера.

Ф1 (460–490 нм) и с помощью дихроичного зеркала ДЗ проецируется на объект исследования (в нашем случае – ухо мыши, находящейся в состоянии анестезии). Регистрируемый флуоресцентный сигнал детектируется ПЗС-камерой (Pixelfly QE, PCO, Германия) в спектральном диапазоне 510–550 нм (фильтр Ф2).

В режиме ЛСК лазерный модуль (Roithen Lasertechnik, Австрия; длина волны 808 нм, мощность выходящего лазерного излучения 10 мВт) диффузно освещает ту же область уха мыши. Вследствие движения в тканях рассеивающих свет форменных элементов крови, таких как эритроциты и лимфоциты, интенсивность детектируемого обратно рассеянного лазерного излучения флуктуирует, образуя меняющиеся во времени спекл-картины. Интенсивность спекл-картины $I(x, y)$ регистрируется последовательно через равные промежутки времени T , определяемые временем экспозиции ПЗС-камеры (см. рис.1). Полученный видеоряд из N кадров разбивается на группы по n изображений в каждом (в нашем случае $N = 300$ и $n = 10$), после чего осуществляется расчет усредненного по времени спекл-контраста

$$K(x, y) = \frac{1}{\gamma} \sum \frac{\sigma(x, y)}{\langle I(x, y) \rangle_n}. \quad (1)$$

Здесь σ – стандартное отклонение и $\langle I \rangle$ – среднее значение интенсивности в заданной точке (x, y) (пикселе) спекл-картины $I(x, y)$; $\langle \dots \rangle_n$ означает усреднение по выборке из n изображений детектируемого видеоряда; $\gamma = N/n$. Процесс детектирования видеоряда и расчет усредненного по времени спекл-контраста $K(x, y)$ полностью автоматизированы посредством специально разработанного программного обеспечения, созданного на базе графического редактора ImageJ (НИН, США) с возможностью последующего анализа, статистической и цветовой обработки получаемых изображений. Управление ПЗС-камерой осуществлялось с помощью программы CamWare (PCO, Германия).

Все экспериментальные процедуры проводились в полном соответствии с международными стандартами работы с лабораторными животными и в соответствии с внутренними этическими стандартами Института Вейцмана. Анестезия подопытных животных осуществлялась интраперитонеально путем инъекции смеси 10 мг кетамина (Fort Dodge, Iowa, США) и 100 мг ксалазина (Kerpo, Deventer, Голландия) из расчета на 1 кг массы животного для самки голыи мыши CD1 Nude в возрасте 6–8 недель, взятой из лаборатории Харлан (Реховот, Израиль). Животное находилось в условиях температурного комфорта.

3. Результаты и обсуждение

На рис.2 представлено изображение типичной спекл-картины $I(x, y)$, получаемой ПЗС-камерой с поверхности уха мыши *in vivo*. Полученные в результате обработки изображения спекл-контраста $K(x, y)$ при коротком (33 мс) и длинном (650 мс) времени экспозиции детектора T приведены на рис.3. В случае более длительного времени экспозиции на изображении отчетливо проявляются «белые» сосуды (рис.3,б). Данный факт объясняется изменением чувствительности метода ЛСК, определяемой согласно [36] как

$$S = \tau_c \frac{r}{2K} \left[\frac{1}{2r^2} - \frac{2r+1}{2r^2} \exp(-2r) \right], \quad (2)$$

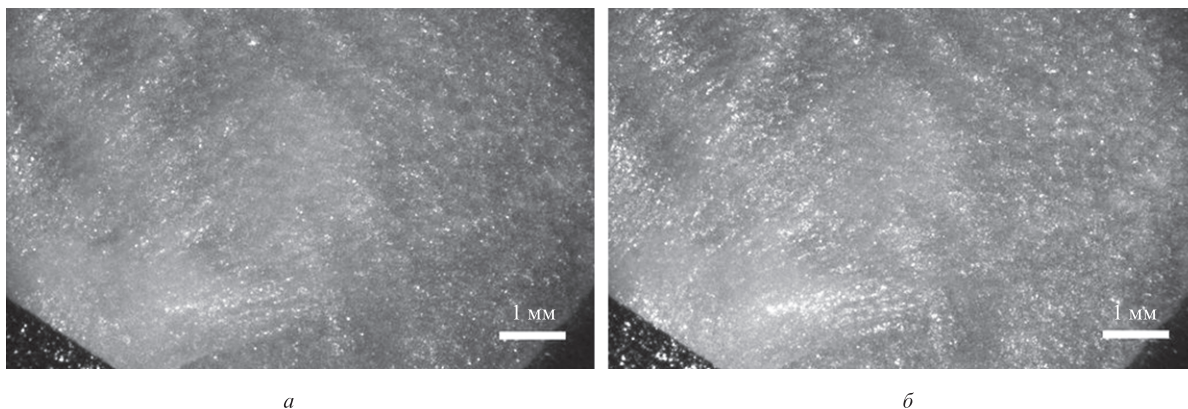


Рис.2. Типичные изображения спекл-картин $I(x, y)$, наблюдаемых на поверхности уха мыши *in vivo*, при коротком ($T = 33$ мс) (а) и длительном ($T = 650$ мс) (б) времени экспозиции ПЗС-камеры.

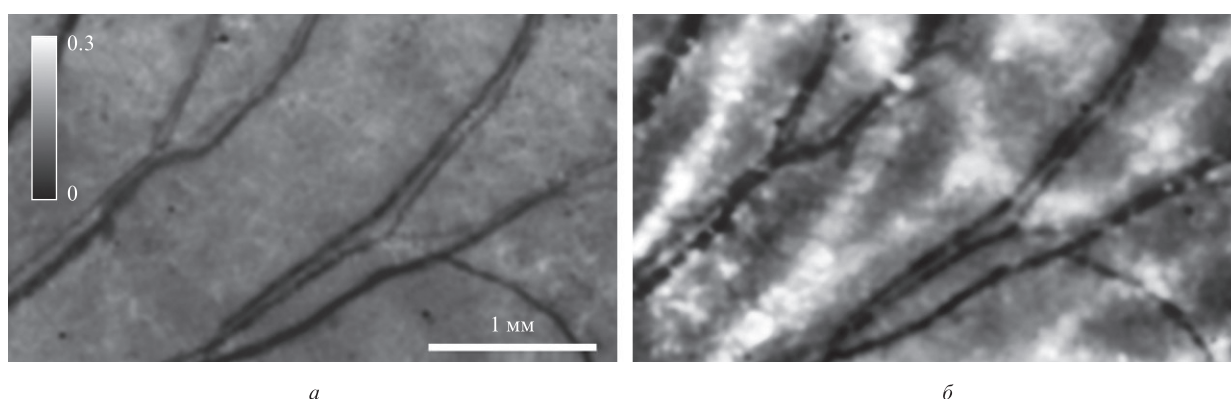


Рис.3. Фрагмент изображения спекл-контраста $K(x, y)$ после усреднения спекл-картин $I(x, y)$, наблюдаемых на поверхности наружного уха мыши, при коротком ($T = 33$ мс) (а) и длительном ($T = 650$ мс) (б) времени экспозиции детектора.

где $r = T/\tau_c$ – отношение времени экспозиции детектора T ко времени корреляции флуктуаций интенсивности рассеянного лазерного излучения τ_c , которое определяется характерным временем пространственного смещения форменных элементов крови (эритроцитов и лимфоцитов) на расстояние порядка длины волны λ зондирующего излучения и обратно пропорционально средней скорости движения $\langle v \rangle$ последних ($\tau_c \sim \lambda/\langle v \rangle$). Спекл-контраст K согласно [36] также является функцией времени экспозиции детектора T и времени корреляции τ_c и с приемлемой точностью может быть представлен как

$$K = \left\{ \frac{\tau_c}{2T} \left[1 - \exp\left(-\frac{2T}{\tau_c}\right) \right] \right\}^{1/2}. \tag{3}$$

На рис.4,а показана зависимость чувствительности метода ЛСК как функции времени экспозиции детектора $S(T)$. Легко видеть, что максимальная чувствительность достигается, когда время экспозиции детектора оказывается сравнимым с временем корреляции ($T \sim \tau_c$), тогда как при $T \gg \tau_c$ и $T \ll \tau_c$ чувствительность метода минимальна ($S \rightarrow 0$).

На рис.4,б представлена зависимость чувствительности метода как функции времени корреляции $S(\tau_c)$ при фиксированном времени экспозиции детектора, используемом в эксперименте ($T = 33$ и 650 мс). Из рисунка видно, что при длительном времени экспозиции детектора ($T = 650$ мс), чувствительность S для времен корреляции $\tau_c \sim 10^2$ мс и более существенно возрастает. Следует отметить, что диапазон значений $\tau_c > 10^2$ мс соответствует

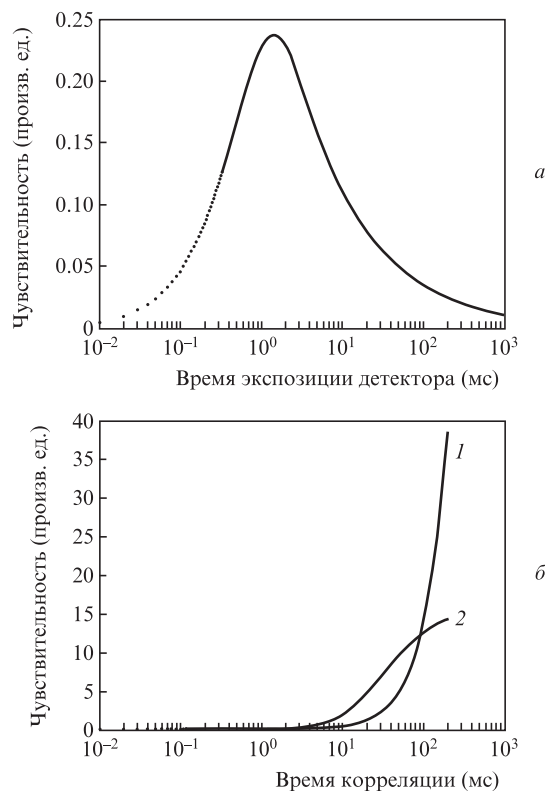


Рис.4. Чувствительность метода ЛСК в зависимости от времени экспозиции детектора T (а) и времени корреляции τ_c при временах экспозиции детектора 650 (1) и 33 мс (2) (б).

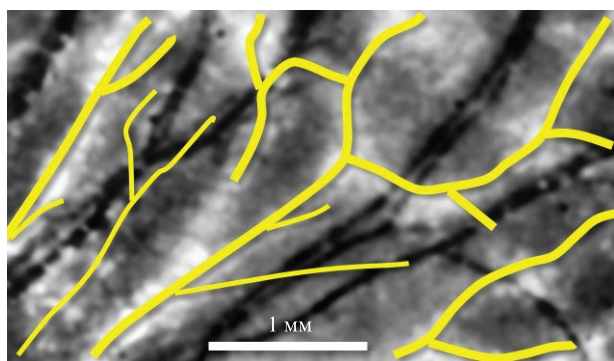


Рис.5. Фрагмент изображения сосудистого русла наружного уха мыши, полученного методом ЛСК в случае длительного ($T = 650$ мс) времени экспозиции детектора (см. рис.2,б), с наложенным поверх изображением контуров лимфатических сосудов, воспроизведенных методом ФИМ [24–26].

чрезвычайно медленному движению рассеивающих частиц, скорость которых сравнима со скоростями движения лимфотока.

Для подтверждения или опровержения данного факта/предположения мы использовали метод ФИМ [24–26], специально разработанный для прямой визуализации сосудов лимфатической системы. На рис.5 приведено изображение сосудистого русла наружного уха мыши *in vivo*, полученное методом ЛСК, с наложенным поверх изображением контуров лимфатических сосудов, полученных методом ФИМ. Визуализации лимфатических сосудов в режиме ФИМ предшествовала интрадермальная инъекция 2 мкл декстрана FITC с концентрацией 10 мг/мл в ухо мыши. Видимый узор лимфатических сосудов, полученный ФИМ, не всегда полностью повторяет профиль «белых» сосудов, получаемый методом ЛСК. По нашему мнению, это объясняется сложным нестационарным пространственно неравномерным характером движения лимфотока. Движение лимфы внутри системы лимфатических сосудов обычно имеет осцилляторный характер, при этом частота пульсаций варьируется в диапазоне 1–11 мин⁻¹ [37]. В случае низких интенсивностей облучения и частоты пульсаций лимфотока не все лимфатические сосуды можно видеть методом ЛСК. Кроме того, не всегда концентрация флуоресцентного контрастного вещества на участке отдельно взятого сосуда оказывается достаточной для возбуждения флуоресцентного сигнала, способного преодолеть порог чувствительности ФИМ. Тем не менее, результаты представленных здесь экспериментов (см. рис.5) позволяют утверждать, что контуры лимфатических сосудов, наблюдаемые методом ЛСК в случае достаточно длительного времени экспозиции детектора и полученные прямым измерением методом ФИМ, хорошо согласуются между собой и повторяют друг друга.

4. Заключение

Таким образом, в настоящей работе показано, что в случае более длительного времени экспозиции детектора метод ЛСК позволяет одновременно визуализировать не только кровеносные, но и лимфатические сосуды. Данная методика одновременного получения изображения лимфатических и кровеносных сосудов и их демаркации, осу-

ществляемая без применения токсичных флуоресцентных маркеров, представляется весьма перспективной в приложениях к физиологии сердечно-сосудистой системы, в том числе для изучения лимфатической системы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Вейцмановского института наук (Weizmann Institute of Science, Israel) и Королевского научного общества Новой Зеландии (The Royal Society, New Zealand).

1. Тучин В.В. *Оптическая биомедицинская диагностика* (М.: Физматлит, 2007).
2. Беднов А.А., Ульянов С.С., Тучин В.В., Бриль Г.Е., Захарова Е.И. *Изв. вузов. ПНД*, **4** (6), 45 (1996).
3. Priezhev A.V. in *Munich European Biomedical Optics, Short Course 101* (Bellingham, WA: SPIE Optical Engineering Press, 2001).
4. Сидоров В.В., Ронкин М.А., Максименко И.М., Щербанина В.Ю., Уколов И.А. *Биомедицинские технологии и радиоэлектроника*, **12**, 26 (2003).
5. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. *Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови* (М.: Медицина, 2005).
6. Куприянов В.В., Караганов Я.Л., Козлов В.И. *Микроциркуляторное русло* (М.: Медицина, 1975).
7. Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. *Микроциркуляция* (М.: Медицина, 1984).
8. Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрин Н.Х. *Реология крови* (М.: Медицина, 1982).
9. Мчедлишвили Г.И. *Капиллярное кровообращение* (Тбилиси: Изд. АН ГССР, 1958).
10. Шошенко К.А. *Кровеносные капилляры* (Новосибирск: Наука, 1975).
11. Мчедлишвили Г.И. *Микроциркуляция крови: Общие закономерности регулирования и нарушений* (Л.: Наука, 1989).
12. Козлов В.И. *Движение крови по микрососудам и транскапиллярный обмен* (Л.: Наука, 1984).
13. Rossini A.A., Chick W.L. in *Microcirculation* (Baltimore: University Park Press, 1980, Vol. III, p. 245).
14. Davis E. in *Microcirculation* (Baltimore: University Park Press, 1980, Vol. III, p. 223).
15. Coleridge-Smith P.D., et al. *Brit. Med. J.* **296**, 1726 (1988).
16. Hebert P.C., Qun Hu L., Biro G.P. *Can. Med. Assoc. J.*, **156**, S27 (1997).
17. Fagrell B. *Ann. Biomed. Eng.*, **14**, 163 (1986).
18. Metz S., et al. *J. Nucl. Med.*, **51**, 1691 (2010).
19. Manning W.J., Li W., Edelman R.R. *New Engl. J. Med.*, **328**, 828 (1993).
20. Rajadhyaksha M., et al. *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 946 (1995).
21. Bonesi M., et al. *Laser Phys.*, **20**, 891 (2010).
22. Bonesi M., et al. *Laser Phys.*, **20**, 1491 (2010).
23. Gurfinkel Y.I. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4241**, 467 (2001).
24. Кузнецов Ю.Л., Кальченко В.В., Меглинский И.В. *Квантовая электроника*, **41** (4), 308 (2011).
25. Kalchenko V., et al. *J. Biophoton.*, **4**, 645 (2011).
26. Kalchenko V., et al. *Laser Phys. Lett.*, **7**, 603 (2010).
27. Briers J.D. *Physiol. Meas.*, **22**, R35 (2001).
28. Briers J.D., Richards G., He X.W. *J. Biomed. Opt.*, **4**, 164 (1999).
29. Kalchenko V., Brill A., Bayewitch M., Fine I., Zharov V., Galanzha E., Tuchin V. *J. Biomed. Opt.*, **12**, 052002 (2007).
30. Serov A., Steinacher B., Lasser T. *Opt. Express*, **13**, 3681 (2005).
31. Меглинский И.В., Боас Д.А., Йод А.Г., Чанс Б., Тучин В.В. *Изв. вузов. ПНД*, **4**, 65 (1996).
32. Korolevich A.N., Meglinski I.V. *Bioelectrochemistry*, **52**, 223 (2000).
33. Meglinski I.V., Korolevich A.N., Tuchin V.V. *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, **29**, 535 (2001).
34. Meglinski I., Tuchin V.V. in *Coherent-Domain Optical Methods for Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science*. Ed. by V.V. Tuchin (New York: Kluwer Acad./Plenum Publ., 2012, p. 149).
35. Snabre P., Dufaux J., Brunel L. in *Waves and Imaging through Complex Media* (New York: Kluwer Acad. Publ., 2001, p. 369).
36. Boas D.A., Dunn A.K. *J. Biomed. Opt.*, **15**, 011109 (2010).
37. Kwon S., Sevik-Muraca E.M. *Lymphat. Res. Biol.*, **5**, 219 (2007).