PACS 42.62.Be; 87.19.U–; 87.64.Cc

Метод анализа сигнала лазерного доплеровского анемометра для измерения скорости течения крови

М.А.Бороздова, И.В.Федосов, В.В.Тучин

Предложен новый метод анализа сигнала лазерного доплеровского анемометра на основе дифференциальной схемы, обеспечивающий измерение скорости течения сильно рассеивающих жидкостей, в частности крови. Разработан лазерный доплеровский анемометр, предназначенный для измерения абсолютной скорости течения крови в поверхностных артериолах и венулах животных и человека. Экспериментально исследована структура сигнала лазерного доплеровского анемометра при измерении скорости течения оптически неоднородных сред, таких как кровь и суспензии рассеивающих частиц. Представлены результаты измерения скорости течения цельной и разбавленной крови в каналах прямоугольного сечения.

Ключевые слова: *лазерный доплеровский анемометр, кровь, микроциркуляция, рассеяние света, цифровая обработка сигналов.*

1. Введение

Лазерные доплеровские анемометры (ЛДА) [1 – 5] и доплеровские оптические когерентные томографы (ДОКТ) [6 – 9] находят широкое применение в медицинской диагностике и физиологических исследованиях. В отличие от большинства оптических методов исследования микроциркуляции, таких как прижизненная микроскопия [10, 11], когерентно-оптическая [12] и флуоресцентная [13] ангиография, сканирующая лазерная доплеровская флоуметрия [14] и анализ контраста лазерных спеклов [15, 16], ориентированный на визуализацию сети кровеносных сосудов и оценку относительных изменений объема циркулирующей крови, ЛДА и ДОКТ позволяют измерять скорость течения крови и точно оценивать ее объемный расход через отдельные артериолы и венулы. Возможность подобных измерений критически важна для ранней диагностики атрофии зрительного нерва при глаукоме и диабетической ретинопатии [1 – 3, 9], а также необходима для понимания фундаментальных механизмов регуляции местного кровотока в органах и тканях, например при инсульте головного мозга [16] или ишемии сердечной мышцы [17].

Принцип действия ЛДА и ДОКТ основан на измерении величины доплеровского сдвига частоты (ДСЧ) оптического излучения, однократно рассеянного движущимися клетками. Величина ДСЧ прямо пропорциональна проекции вектора скорости на направление вектора рассеяния света, который определяется как разность волновых векторов падающего и рассеянного излучения [4, 18, 19]. Абсолютная величина скорости течения может быть определена, если известен угол между вектором скорости и вектором рассеяния. Так как в измерениях in vivo данный угол не может быть найден непосредственно, то абсолютную величину и направление вектора скорости кровотока определяют, измеряя ДСЧ излучения, рассеянного одновременно по двум или трем различным направлениям, как, например, в офтальмологических ЛДА, предназначенных для диагностики нарушений микроциркуляции в сосудах сетчатки глаза [1 – 4]. Применение аналогичного подхода в ДОКТ связано со значительными техническими трудностями [20], поэтому для ДОКТ были предложены методы определения пространственного положения кровеносного сосуда путем сканирования двух близко расположенных сечений одного или того же сосуда [21] или путем исключения неопределенности в оценке объемного расхода крови интегрированием скорости потока по сечению сосуда [22]. Осуществление ДОКТ для измерения in vivo трех компонентов вектора скорости путем регистрации излучения, рассеянного по нескольким направлениям, стало возможным только в последнее время в связи с развитием фурье-методов ДОКТ, обеспечивающих необходимое быстродействие [8, 9].

ЛДА и ДОКТ применяют в основном для исследования сосудов, расположенных на небольшой глубине параллельно поверхности сильно рассеивающих свет тканей. Сосуды освещают ткань перпендикулярно ее поверхности и регистрируют излучение, рассеянное в обратном направлении. При этом вектор рассеяния практически перпендикулярен оси исследуемого сосуда, величина ДСЧ сильно зависит от угла между векторами скорости потока и рассеяния света и обращается в нуль, когда этот угол равен 90°. С другой стороны, если вектор скорости составляет небольшой угол с вектором рассеяния, то зависимостью ДСЧ от угла можно пренебречь. Например, при изменении угла от –10° до +10° погрешность измерения скорости не превышает 1.5%.

В экспериментальной аэро- и гидродинамике получил широкое распространение ЛДА на основе дифференциальной схемы (дифференциальный ЛДА), в которой дви-

М.А.Бороздова, И.В.Федосов. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; e-mail: mariabor@mail.ru
В.В.Тучин. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83, Институт проблем точной механики и управления РАН, Россия, 410028 Саратов, ул. Рабочая, 24; e-mail: tuchinvv@mail.ru

Поступила в редакцию 29 августа 2014 г., после доработки – 28 октября 2014 г.

жущаяся частица освещается одновременно двумя лазерными пучками, пересекающимися под небольшим углом [18, 19]. В результате излучение, рассеянное частицей в любом направлении, промодулировано с частотой, пропорциональной проекции вектора скорости на так называемый вектор чувствительности ЛДА. Вектор чувствительности, определяемый как разность волновых векторов лазерных пучков, ориентирован перпендикулярно оптической оси ЛДА. Кроме того, частота модуляции не зависит от направления рассеяния света частицей и от показателя преломления среды [19], окружающей движущуюся частицу, что немаловажно при измерении скорости течения крови, показатель преломления которой в конкретном сосуде, как правило, неизвестен. Несмотря на очевидное преимущество перед существующими методами, дифференциальный ЛДА до настоящего времени не нашел применения в исследованиях микроциркуляции крови, за исключением ограниченного числа работ в области лазерной доплеровской микроскопии [23, 24].

Ограничение применения дифференциального ЛДА для измерения скорости течения крови и других сильно рассеивающих жидкостей обусловлено, прежде всего, трудностью измерения доплеровского сдвига частоты на фоне флуктуаций интенсивности света, рассеянного движущимися вне измерительного объема ЛДА частицами. Основным методом решения данной проблемы в настоящее время является предварительный взаимный сдвиг частоты лазерных пучков дифференциального ЛДА при помощи акустооптических модуляторов [23] или перестраиваемых оптических линий задержки [24].

В настоящей работе предложен новый метод выделения компонентов спектра флуктуаций мощности лазерного излучения, обусловленных движением рассеивающих частиц в пределах измерительного объема и несущих информацию о скорости течения. Предложенный метод основан на модуляции интенсивности лазерных пучков и не требует применения каких-либо устройств для предварительного сдвига частоты лазерного излучения. Экспериментальная проверка предложенного метода, а также детальное исследование структуры сигнала ЛДА при измерении скорости течения сильно рассеивающих жидкостей выполнены с использованием разработанного авторами дифференциального ЛДА. Представлены результаты измерения скорости течения рассеивающей жидкости, а также крови в каналах прямоугольного сечения.

2. Материалы и методы

2.1. Лазерный доплеровский анемометр

Схема разработанного ЛДА представлена на рис.1. В качестве источника излучения использован полупроводниковый лазерный модуль МЛ-09 (Скат-Р, Россия) с длиной волны излучения 650 нм и мощностью 15 мВт. Пучок лазерного излучения с помощью призмы-ромба разделялся на два параллельных пучка, которые фокусировались в исследуемой области потока жидкости объективом 1 с фокусным расстоянием 100 мм и апертурой 30 мм. Между лазером и призмой-ромбом установлены поляризационный светофильтр и четвертьволновая пластинка, которые исключают попадание в резонатор полупроводникового лазера излучения, зеркально отраженного исследуемым объектом в сторону объектива ЛДА.

Измерительный объем ЛДА образован пересечением взаимно когерентных пучков лазерного излучения, при этом в измерительном объеме формируется система интерференционных полос, ориентированных поперек направления потока. Излучение, рассеянное на взвешенных в жидкости частицах, проходит через объектив 1 в обратном направлении и отражается зеркалом в сторону объектива 2. Объектив 2, идентичный объективу 1, формирует изображение измерительного объема в плоскости круглой полевой диафрагмы диаметром 50 мкм, установленной перед фотодиодом ФД-256. Электрический сигнал

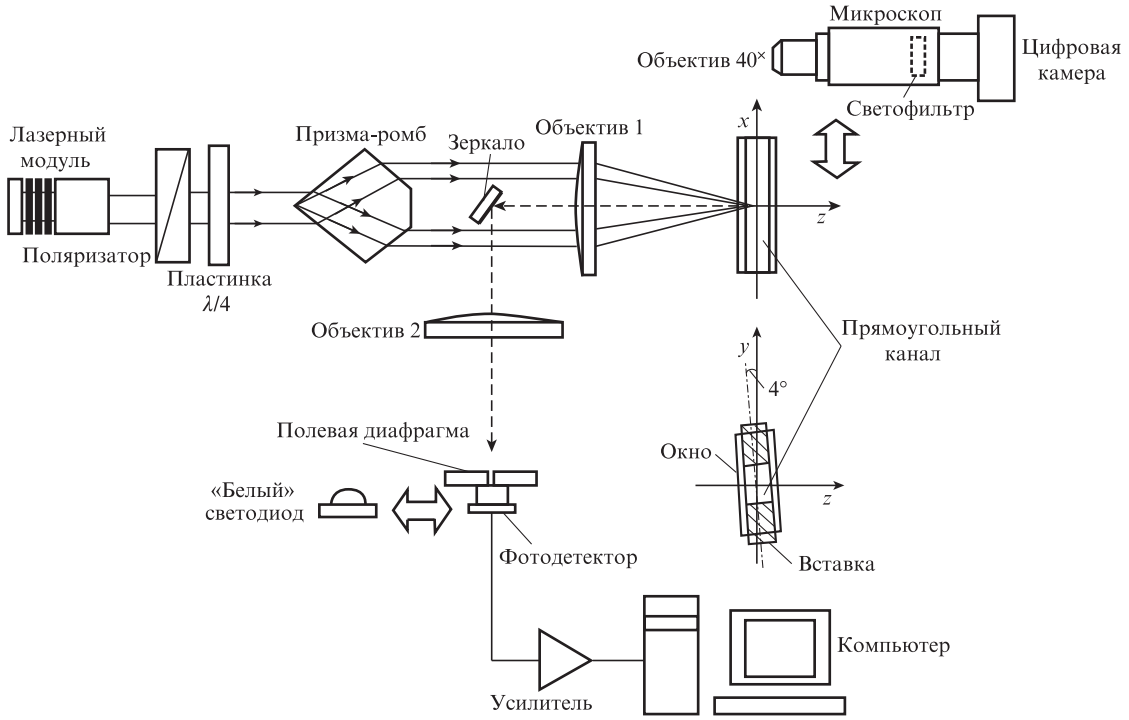

Рис.1. Схема экспериментальной установки.

фотодетектора поступает на усилитель и регистрируется при помощи звуковой карты персонального компьютера.

Оптическая система ЛДА смонтирована на горизонтальном основании таким образом, что лазерные пучки, формирующие измерительный объем, расположены в горизонтальной плоскости xz, а ось y направлена вертикально вверх.

2.2. Оценка величины измерительного объема и юстировка ЛДА

Использовавшийся многочастотный полупроводниковый лазер имеет одну поперечную моду. Встроенный коллиматор лазерного модуля формирует лазерный пучок расходимостью 6 мрад. Поперечное сечение пучка лазерного модуля по форме близко к прямоугольнику со скругленными углами размером 2 × 5 мм. Этот пучок разделяется призмой-ромбом на два параллельных пучка сечением 2 × 2 мм, которые фокусируются в передней фокальной плоскости объектива 1 (рис.1), пересекаясь в области перетяжек под углом 14°. Точность совмещения пучков определяется юстировкой оптической системы ЛДА и точностью изготовления призмы.

Юстировка ЛДА и оценка фактической формы и размера измерительного объема осуществлялись при помощи микроскопа, состоящего из тубуса длиной 137 мм, объектива (40×, 0.65) и цифровой камеры DSB-C320 (D-link, Тайвань). Внутри тубуса микроскопа установлен синий светофильтр, который ограничивает интенсивность лазерного излучения, поступающего на датчик изображения цифровой камеры. Микроскоп установлен соосно с объективом 1 ЛДА на магнитном основании, взаимозаменяемом с основанием держателя исследуемого объекта. Перемещение микроскопа вдоль оптической оси ЛДА осуществляется при помощи устройства с микрометрическим винтом. Масштаб изображения в предметной плоскости микроскопа находился при помощи объект-микрометра. Размеры измерительного объема определялись в воздухе по уровню интенсивности e^{-2} от максимальной при постоянной длительности экспозиции цифровой камеры.

Наблюдение измерительного объема показало, что лазерные пучки перекрываются практически полностью в области их наименьшего сечения. Измерительный объем в области полного перекрытия лазерных пучков имеет практически круглое сечение диаметром 60 мкм. Контраст интерференционных полос в этом сечении близок к 1, период интерференционных полос равен ~2.7 мкм. Длина измерительного объема составляет 110 мкм.

Для юстировки положения полевой диафрагмы фотодетектора фотодиод заменялся белый светодиодом мощностью 3 Вт. При этом с помощью микроскопа одновременно велось наблюдение за измерительным объемом и круглой полевой диафрагмой диаметром 50 мкм. С помощью юстировочных приспособлений полевая диафрагма перемещалась по трем координатным осям таким образом, чтобы ее изображение совместилось с наименьшим сечением измерительного объема.

2.3. Анализ сигнала ЛДА

Измерительный объем ЛДА образован двумя пучками лазерного излучения с одинаковой частотой ω_0, пересекающимися под углом $\alpha = 14°$ (рис.2). Вследствие эффекта Доплера излучение пучка 1, рассеянное движущейся частицей в направлении детектора, имеет частоту [18, 19]

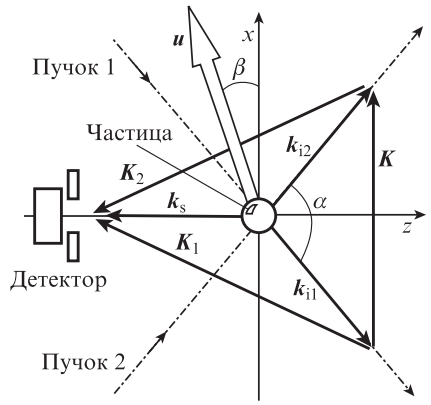

Рис.2. Рассеяние лазерного излучения частицей в измерительном объеме ЛДА.

$$\omega_1 = \omega_0 - (\boldsymbol{k}_s - \boldsymbol{k}_{i1})\boldsymbol{u} = \omega_0 - \boldsymbol{K}_1\boldsymbol{u}, \quad (1)$$

где $\boldsymbol{k}_{i1}$, $\boldsymbol{k}_s$ – волновые векторы падающего и рассеянного пучков; $\boldsymbol{u}$ – скорость движения рассеивающей частицы. Аналогично частота излучения пучка 2, рассеянного в направлении детектора,

$$\omega_2 = \omega_0 - (\boldsymbol{k}_s - \boldsymbol{k}_{i2})\boldsymbol{u} = \omega_0 - \boldsymbol{K}_2\boldsymbol{u}, \quad (2)$$

где $\boldsymbol{k}_{i2}$ – волновой вектор пучка 2. В результате интерференции полей с частотами ω_1 и ω_2 интенсивность излучения в каждой точке детектора изменяется по следующему закону [18]:

$$I_d(t) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2}\cos(\omega_d t + \delta), \quad (3)$$

где I_1, I_2 – интенсивности излучения с частотами ω_1 и ω_2 соответственно; δ – некоторая постоянная разность фаз, обусловленная геометрией эксперимента. Частота модуляции интенсивности определяется из (1) и (2):

$$\omega_d = \omega_1 - \omega_2 = (\boldsymbol{k}_{i1} - \boldsymbol{k}_{i2})\boldsymbol{u} = \boldsymbol{K}\boldsymbol{u}, \quad (4)$$

где $\boldsymbol{K}$ – разностный волновой вектор, направленный перпендикулярно оптической оси ЛДА. Модуль вектора $\boldsymbol{K}$ определяется соотношением [18]

$$|\boldsymbol{K}| = \frac{4\pi}{\lambda}\sin\frac{\alpha}{2}, \quad (5)$$

где λ – длина волны излучения лазера. Основным методом определения частоты ω_d является спектральный анализ сигнала фотодетектора. В настоящей работе спектральный анализ осуществлялся при помощи программного обеспечения, разработанного в среде LabVIEW (National Instruments, США). Сигнал фотодетектора регистрировался АЦП звукового адаптера персонального компьютера с частотой 44100 кГц и разрешением 16 бит. Оценка спектра сигнала находилась как среднее по неперекрывающимся модифицированным периодограммам с окном данных Ханнинга [25].

В случае, когда концентрация рассеивателей в потоке невелика, спектр сигнала ЛДА состоит из двух компонен-

тов [18, 19], один из которых сосредоточен в области низких частот, а другой – вблизи высоких частот

$$f_{\rm d} = \frac{|\omega_{\rm d}|}{2\pi} = \frac{1}{2\pi}|\boldsymbol{Ku}|. \quad (6)$$

Знак модуля показывает, что изменения интенсивности света в каждой точке детектора не зависят от знака $\omega_{\rm d}$ в случае, если δ не зависит от времени (см. (3)). Используя выражения (3) и (4), можно получить формулу для модуля скорости движения частицы:

$$u = \frac{\lambda_0}{2n\sin(\alpha/2)\cos\beta} f_{\rm d}, \quad (7)$$

где λ_0 – длина волны излучения в пустом пространстве; n – показатель преломления среды, в которой измерен угол между пучками; β – угол между направлениями скорости частицы $\boldsymbol{u}$ и вектора $\boldsymbol{K}$ (рис.2). Коэффициент пропорциональности между u и $f_{\rm d}$ остается постоянным при переносе измерительного объема через плоскую границу двух сред с различными показателями преломления в случае, если граница перпендикулярна оптической оси ЛДА. При этом фактическое положение измерительного объема смещается относительно точки пересечения продолжений лазерных лучей в первой среде. Положение измерительного объема относительно границы раздела сред определяется соотношением [19]

$$\Delta z' \approx \Delta z(n'/n), \quad (8)$$

где Δz – положение точки пересечения продолжение лазерных пучков в первой среде относительно границы раздела сред; n, n' – показатели преломления первой и второй сред. Следует также отметить, что в рассеивающей среде контраст интерференционных полос снижается из-за флуктуаций фазы лазерного излучения, возникающих вследствие рассеяния.

2.4. Поток рассеивающей жидкости

В работе использованы каналы прямоугольного сечения, образованные двумя предметными стеклами с размером 26 × 76 мм и толщиной 1.0 мм (AG00000102E, Menzel Glaser, Германия), между которыми вклеены вставки заданной толщины, изготовленные из текстолита или стекла (см. рис.1). Полученные каналы имели сечения 3 × 6, 1 × 2 и 0.25 × 1 мм (со вставками толщиной 3, 1 и 0.25 мм соответственно). В торцы каналов вклеены металлические трубки соответствующего диаметра, которые при помощи гибких шлангов с внутренним диаметром 3 мм соединялись с системой, обеспечивающей протекание рассеивающей жидкости с постоянной скоростью. Каналы устанавливались в держатель, оснащенный механизмом микрометрического перемещения вдоль осей y и z (рис.1). Продольная ось канала ориентировалась вдоль оси x. Для того чтобы исключить попадание в объектив ЛДА лазерного излучения, зеркально отраженного от поверхности окна канала, канал поворачивался вокруг продольной оси так, чтобы плоскость его окна составляла угол 4° с осью y.

В качестве рассеивающей жидкости использовалась суспензия частиц каолина в воде, а также кровь крысы. Средний размер частиц каолина составлял 1 мкм, размер определялся по изображениям суспензии, полученным методом раздавленной капли в проходящем свете при помощи микроскопа Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия), с объективом 100×, 0.7. В экспериментах использовались растворы с коэффициентом экстинкции до 2.7 мм$^{-1}$. Для создания потока суспензии канал соединялся шлангами с двумя цилиндрическими емкостями диаметром 200 мм, установленными с перепадом высот 700 мм. Точная регулировка скорости течения осуществлялась при помощи винтового зажима, установленного на отводящем шланге. При использовании 0.5 л суспензии система обеспечивает постоянную скорость потока в течение 10 мин.

Образец крови объемом около 2 мл был получен путем забора из аорты анестезированной крысы. Количество эритроцитов в образце, определенное с использованием камеры Горяева, составило 7.5 × 10^6 мкл$^{-1}$, что соответствует норме для здорового животного [26, 27]. Кровь пропускалась через канал сечением 0.25 × 1 мм при помощи шприца емкостью 20 мл, установленного в устройстве для дозированного введения лекарственных средств.

Коэффициент экстинкции $\mu_{\rm t}$ растворов определялся методом измерения коллимированного пропускания при помощи установки, состоящей из полупроводникового лазерного модуля (ФТИ-Оптроник, Россия) (длина волны 650 нм, мощность 5 мВт, расходимость пучка 6 мрад), держателя для кюветы, двух диафрагм с круговыми апертурами диаметром 6 мм и измерителя мощности лазерного излучения Laser Power Meter 815C (Newport, США). Компоненты установки расположены относительно лазерного модуля на следующих расстояниях: держатель кюветы – 90 мм, первая диафрагма – 190 мм, вторая диафрагма – 360 мм, датчик измерителя мощности – 460 мм. Для измерения коллимированного пропускания раствора проводилось последовательно два измерения: с кюветой, заполненной чистой водой, и с кюветой, заполненной исследуемым раствором. Для измерения коэффициентов экстинкции $\mu_1 < 0.5$ мм$^{-1}$ использовалась кювета толщиной 1 мм, а для более оптически плотных суспензий – кювета толщиной 340 мкм. Коэффициент экстинкции цельной крови, определенный при помощи данной установки, составил 11 мм$^{-1}$.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Профиль распределения скорости в канале прямоугольного сечения

Для проверки работоспособности ЛДА был использован прямоугольный канал сечением 3 × 6 мм. Через канал пропускалась суспензия с коэффициентом экстинкции 0.3 мм$^{-1}$. На рис.3,*а* показан спектр флуктуаций мощности сигнала фотодетектора, соответствующий положению измерительного объема на оси потока в канале. Оценка спектра мощности находилась как среднее по 20 периодограммам с окном данных 2048 отсчетов. Максимум высокочастотного компонента спектра соответствует частоте $f_{\rm d}$. На рис.3,*б* показан профиль распределения скорости потока в канале на середине его высоты. Профиль получен при перемещении канала относительно ЛДА с шагом 100 мкм. Фактическое положение измерительного объема вычислено по формуле (8). Точками на рис.3,*б* показаны результаты измерений. Профиль распределения скорости ламинарного потока на половине высоты канала близок к параболическому [28]. Сплошной кривой *3* показана регрессия полиномом второго порядка, выпол-

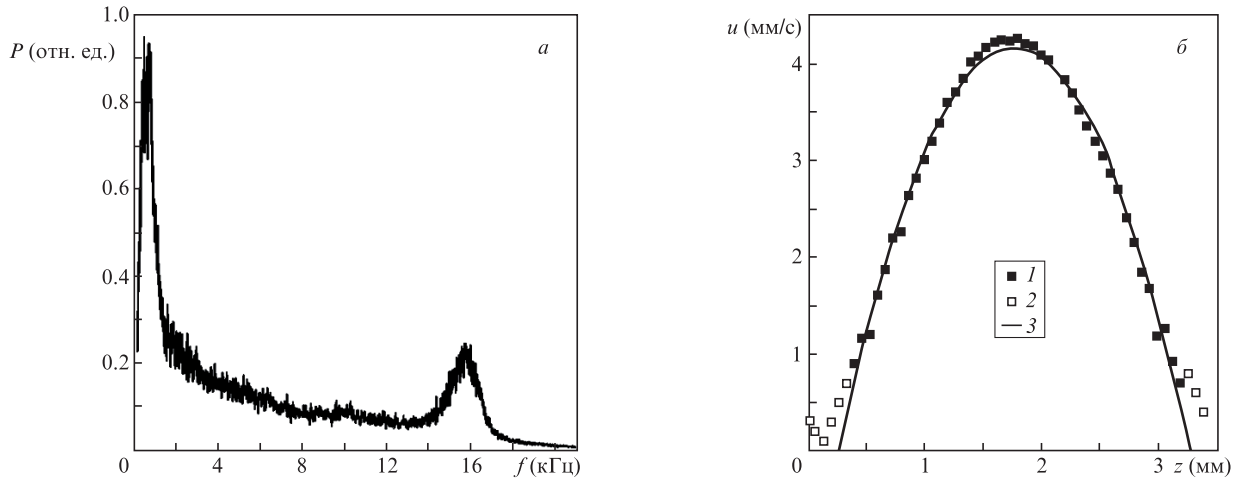

Рис.3. Спектр мощности сигнала фотодетектора (*а*) и профиль распределения скорости (*б*) потока *u* в канале прямоугольного сечения 3 × 6 мм; *1*, *2* – экспериментальные данные, *3* – линия регрессии полиномом второго порядка, вычисленная по данным *1*.

ненная методом наименьших квадратов. Кривая регрессии вычислялась по точкам, соответствующим положению измерительного объема внутри канала (черные квадраты на рис.3,*б*).

3.2. Структура сигнала ЛДА при измерении скорости потока сильно рассеивающей жидкости

Для исследования структуры сигнала ЛДА при измерении скорости потока сильно рассеивающих суспензий был использован канал сечением 1 × 2 мм. Измерительный объем ЛДА располагался на оси потока в канале, на расстоянии 0.5 мм от его переднего окна. Спектры получены по записи сигнала продолжительностью 10 с как среднее по 861 периодограмме с окном данных 512 точек. На рис.4,*а* (кривая *1*) показан спектр, полученный при коэффициенте экстинкции суспензии $\mu_1 = 1.5$ мм$^{-1}$. По мере увеличения μ_1 высокочастотная составляющая спектра мощности, соответствующая модуляции рассеянного излучения, уменьшается на фоне низкочастотной составляющей.

Присутствие в спектре сигнала ЛДА максимума на частоте f_d обусловлено интерференцией на детекторе излучения первого и второго пучков, рассеянных частицами, движущимися в области пересечения пучков. Однако при высокой концентрации рассеивателей излучение, рассеянное частицами, находящимися в других частях потока и освещенными только одним из двух зондирующих пучков, также достигает детектора. Частота излучения, рассеянного отдельной частицей, определяется выражениями (1) и (2). В различных точках канала частицы движутся с различными скоростями. В результате интерференции волн, рассеянных различными частицами, в спектре сигнала ЛДА появляются компоненты с частотами, распределенными в интервале от нуля до некоторой максимальной частоты (так называемой частоты отсечки) [4]. Частота отсечки равна разности частоты излучения, рассеянного частицей с минимально возможной скоростью (неподвижной), и частоты излучения, рассеянного частицей, движущейся с максимально возможной скоростью на оси потока. Эти компоненты можно наблюдать в случае, если канал освещается только одним из двух пучков. На рис.4,*а* показан спектр $P_{12}(f)$ (кривая *1*) сигнала, полученного при освещении потока двумя пучками, и спектры $P_1(f)$ (кривая *2*) и $P_2(f)$ (кривая *3*), полученные при освещении канала левым и правым пучками в отдельности (пучок 1 и пучок 3 на рис.2).

Спектры $P_1(f)$ и $P_2(f)$ составляют, по-видимому, низкочастотный пьедестал, который скрывает пик на часто-

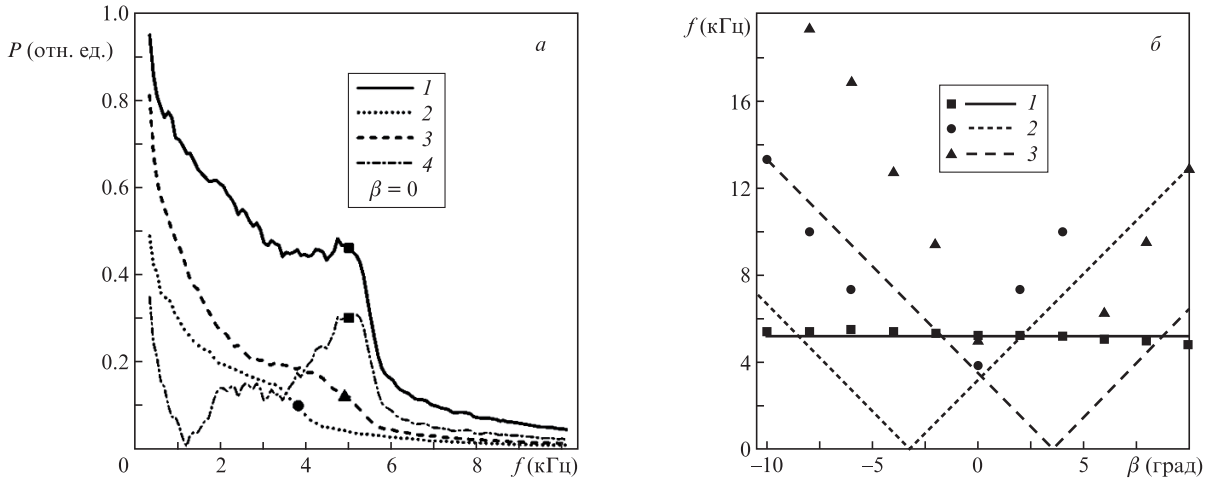

Рис.4. Спектры мощности сигнала ЛДА $P_{12}(f)$ (*1*), $P_1(f)$ (*2*), $P_2(f)$ (*3*) и $|P'_{12}(f)|$ (*4*); точки – значения f_d (*1*, *4*), f_1 (*2*) и f_2 (*3*) (*а*), а также зависимости частот f_d (*1*), f_1 (*2*) и f_2 (*3*) от угла β; точки – измеренные значения, линии – расчет (*б*).

те f_d в спектре $P_{12}(f)$. Пренебрегая интерференцией полей, рассеянных разными частицами, можно выделить частотные компоненты, которые соответствуют рассеянию света на частицах, освещенных одновременно двумя пучками *4* (рис.4,*а*):

$$P'_{12}(f) = P_{12}(f) - P_1(f) - P_2(f). \quad (9)$$

Спектр $P'_{12}(f)$ имеет выраженный максимум на частоте f_d, совпадающий с максимумом $P_{12}(f)$ (рис.4,*а*). Разностный спектр имеет выраженный максимум, соответствующий частоте f_d. Таким образом, вычисление $P'_{12}(f)$ позволяет определить частоту f_d при измерении скорости потока сильно рассеивающей жидкости даже в том случае, когда выраженный максимум в спектре мощности сигнала ЛДА отсутствует.

Спектры $P_1(f)$ и $P_2(f)$ получены при освещении потока в канале при помощи одного пучка (как в схемах ЛДА, применяемых в офтальмологии [1–5]). Для измерения скорости потока в такой схеме используют значение частоты отсечки спектра сигнала фотодетектора, определяемой путем подгонки к спектру модели, заданной прямоугольной функцией [4]. Частота отсечки при использовании пучков 1 и 2 может приблизительно соответствовать максимально возможному доплеровскому сдвигу частоты (см. (1), (2)):

$$f_1 = \frac{|\omega_0 - \omega_1|}{2\pi} = \frac{1}{2\pi}|\boldsymbol{K}_1\boldsymbol{u}|,\ f_2 = \frac{|\omega_0 - \omega_2|}{2\pi} = \frac{1}{2\pi}|\boldsymbol{K}_2\boldsymbol{u}|, \quad (10)$$

где $\boldsymbol{K}_1$ и $\boldsymbol{K}_2$ – векторы рассеяния пучков 1 и 2 на движущихся частицах (см. рис.2). Частоты f_d, f_1 и f_2 зависят от угла, образованного оптической осью прибора и вектором скорости потока. Для исследования этой зависимости канал сечением 1 × 2 мм был установлен на поворотном столике, вращающемся в горизонтальной плоскости. За начало отсчета угла поворота столика β было принято направление, при котором ось канала перпендикулярна оптической оси ЛДА, а вектор скорости потока $\boldsymbol{u}$ параллелен разностному волновому вектору $\boldsymbol{K}$ (см. рис.2 и формулу (7)). Область пересечения лазерных пучков ЛДА находилась на оси потока суспензии с коэффициентом экстинкции 1.5 мм$^{-1}$. В каждом положении столика регистрировался сигнал ЛДА при освещении исследуемого потока двумя лазерными пучками и каждым из пучков в отдельности. Спектры, показанные на рис.4,*а*, соответствуют $\beta = 0$. Частота f_d определялась как положение максимума на спектре $P_{12}(f)$ (точки на кривых *1* и *4* на рис.4,*а*). Частоты f_1, f_2 определялись на половине высоты ступеньки на спектрах $P_1(f)$ и $P_2(f)$ (точки на кривых *2* и *3* соответственно на рис.4,*а*).

Зависимость $f_d(\beta)$ показана на рис.4,*б*. Точками отмечены измеренные значения, сплошная линия соответствует зависимости, вычисленной по формуле (7) при постоянной скорости потока 1.4 мм/с. Смещение экспериментальных точек относительно расчетной линии может быть объяснено несовпадением положения оси канала и оси вращения столика, а также смещением области пересечения лазерных пучков в результате преломления на поверхностях окна канала (линии и точки *2* и *3*). Аналогичным образом на рис.4,*б* представлена зависимость от угла β частот f_1 и f_2. Точками показаны измеренные значения, прерывистые линии соответствуют зависимостям, рассчитанным по формулам (10) при u = 1.4 мм/с.

Векторы рассеяния $\boldsymbol{K}_1$ и $\boldsymbol{K}_2$ составляют с вектором скорости потока углы, близкие к 90°, поэтому f_1 и f_2 сильно зависят от β и обращаются в нуль, если вектор скорости перпендикулярен соответствующему вектору рассеяния. Измеренные значения частоты отсечки значительно больше расчетных. Это может быть объяснено тем, что формулы (10) дают максимально возможную частоту доплеровского сдвига, а частота отсечки соответствует высокочастотной границе спектра, которая смещается в коротковолновую сторону в результате уширения спектра, связанного с рассеянием света в потоке, и использования детектора с широкой апертурой.

3.3. Измерение скорости течения крови

На рис.5 показаны спектры $P_{12}(f)$, полученные при измерении скорости потока на оси прямоугольного канала толщиной 250 мкм, через который пропускалась кровь, разбавленная физиологическим раствором, и цельная кровь. Спектры вычислены по записям продолжительностью 2 с, окно данных 512 точек. Максимум, соответствующий частоте f_d на этих спектрах, различим только при разведении крови в 50 раз. При меньших разведениях выраженные максимумы на спектрах не наблюдаются. Амплитуда сигнала ЛДА уменьшается по мере увеличения коэффициента экстинкции, поэтому для удобства сравнения спектры на рис.5 нормированы на полную мощность в полосе частот 0.4–20 кГц. На рис.5,*а–г* показаны спектры мощности $P_{12}(f)$ (кривые *1*) и соответствующие им положительные значения $P'_{12}(f)$ (кривые *2*). Наибольшие значения $P'_{12}(f)$ сгруппированы вокруг частоты f_d, соответствующей средней скорости движения клеток крови через измерительный объем ЛДА. Максимумы $P'_{12}(f)$ имеют значительную ширину, т.к. длина измерительного объема ЛДА в данном эксперименте сравнима с толщиной канала.

Можно заметить, что увеличение коэффициента экстинкции практически не влияет на ширину максимумов. Результаты, соответствующие потоку цельной крови, представлены на рис.6. Несмотря на высокий коэффициент экстинкции крови и значительную толщину канала, значения $P'_{12}(f)$ (кривая *3*) вблизи f_d составляют почти 20% от соответствующих значений $P_{12}(f)$ (кривая *1*). Зависимость $|P'_{12}(f)|$ *2*, аналогичная *4* на рис.4,*а*, позволяет оценить отрицательные значения $P'_{12}(f)$ в области низких частот. Там же приведена увеличенная в 10 раз зависимость положительных значений $P'_{12}(f)$, которая демонстрирует высокое отношение сигнал/шум при измерении скорости течения цельной крови.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования дифференциального ЛДА для измерения in vivo скорости течения крови в кровеносных сосудах диаметром до 250 мкм. Для этого может быть применен наиболее простой вариант ЛДА – без предварительного относительного сдвига частот лазерных пучков, используемого для определения знака f_d и для разделения высокочастотной и низкочастотной компонент спектра сигнала ЛДА [19, 23, 24,]. Мы показали, что наибольший вклад в низкочастотную составляющую спектра ЛДА при измерении скорости потока сильно рассеивающей жидкости вносит рассеяние лазерных пучков вне области измерительного объема. Эти составляющие могут быть исключены из спектра сигнала вычитанием спектров, полученных при освещении измерительного объема каждым из пучков по отдельности. Важнейшим преимуще-

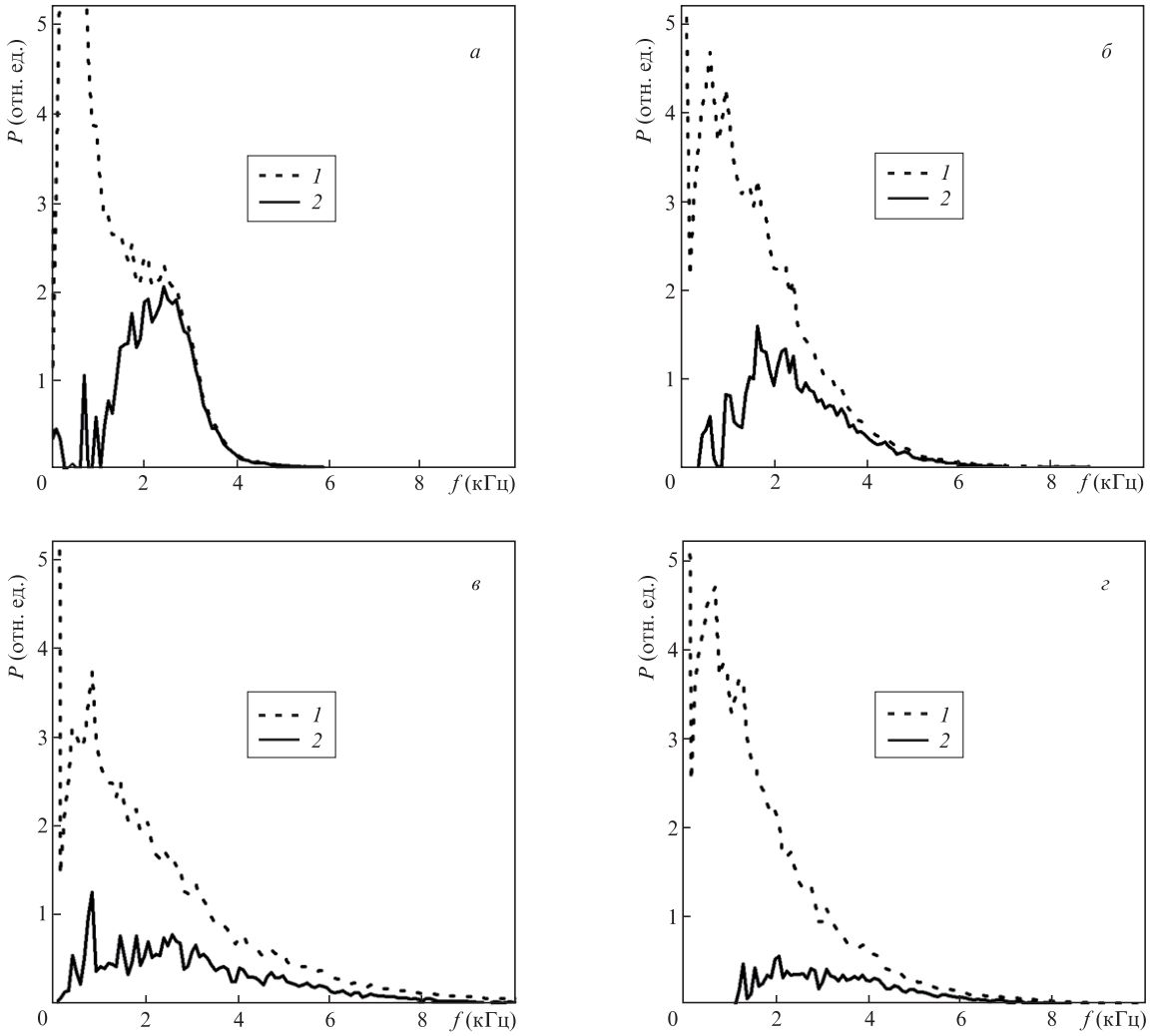

Рис.5. Нормированные спектры $P_{12}(f)$ (*1*) и положительные значения $P'_{12}(f)$ (*2*), полученные при измерении скорости потока разбавленной и цельной крови в канале толщиной 250 мкм для случаев разбавления 1 : 50 (*а*), 1 : 10 (*б*) и 1 : 3 (*в*), а также для цельной крови (*г*).

ством дифференциального ЛДА перед существующими ЛДА офтальмологического назначения [1–4] и системами ДОКТ [6–9] является слабая зависимость сигнала ЛДА от угла между осью оптического прибора и направлением скорости потока в наиболее распространенном случае, когда этот угол близок к 90°.

Важнейшими факторами, определяющими точность измерения скорости течения крови, является селекция излучения, сохранившего неизменное направление до и после рассеяния на движущейся частице, и пространственная локализация объема, в котором происходит рассеяние. В офтальмологических ЛДА, где для освещения измерительного объема используется один лазерный пучок, такая селекция осуществляется при помощи конфокальной полевой диафрагмы, оптически сопряженной с измерительным объемом [5]. Полевая диафрагма также обеспечивает локализацию измерительного объема в поперечном направлении, но поскольку числовая апертура объектива детектора такой системы невелика, измерительный объем имеет значительную протяженность вдоль оптической оси, что приводит к формированию характерного спектра ступенчатой формы [1–5]. Малая апертура детектора в офтальмологических ЛДА обусловлена не столько небольшим относительным отверстием глаза, сколько необходимостью однозначного определения вектора рассеянного света $\boldsymbol{k}_s$ (см. рис.2). Неопределенность направления этого вектора при использовании детектора с большой числовой апертурой приводит к сглаживанию ступеньки и затрудняет измерение частоты отсечки. Так, на рис.5,*а*, показаны спектры $P_1(f)$ и $P_2(f)$, зарегистрированные детектором с числовой апертурой 0.1. В системах ДОКТ [6–9] продольная локализация измерительного объема обеспечивается благодаря интерференционной селекции низкокогерентного излучения, рассеянного с

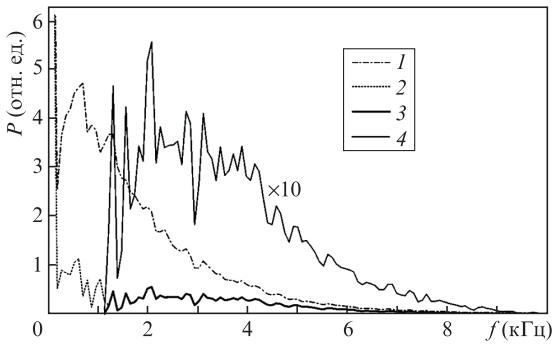

Рис.6. Спектры $P_{12}(f)$ (*1*), $|P'_{12}(f)|$ (*2*), положительных значений $P'_{12}(f)$ (*3*) и $P'_{12}(f) \times 10$ (*4*) в случае потока цельной крови на оси канала толщиной 250 мкм.

определенной глубины. Вследствие этого спектр сигнала ДОКТ имеет выраженный максимум, который соответствует ДСЧ света, рассеянного в определенной точке кровеносного сосуда.

В дифференциальном ЛДА продольная локализация измерительного объема определяется размером области перекрытия лазерных пучков. Несмотря на то что в нашем ЛДА область перекрытия лазерных пучков имеет длину около 100 мкм, наибольший вклад в сигнал ЛДА вносят частицы, пересекающие измерительный объем в ее среднем, наиболее широком сечении, сопряженном с полевой диафрагмой детектора, т.к. частицы, пересекающие пучок именно в этом сечении, остаются освещенными двумя пучками наиболее продолжительное время.

4. Заключение

Предложен новый метод анализа сигнала ЛДА на основе дифференциальной схемы, обеспечивающий высокое отношение сигнал/шум при измерении скорости течения сильно рассеивающих жидкостей, таких как цельная кровь в артериолах и венулах животных или человека. Продемонстрирована возможность измерения скорости течения цельной крови в канале толщиной 250 мкм.

Показано, что при зондировании кровеносного сосуда в направлении, перпендикулярном его оси, результат измерения скорости практически не зависит от угла между оптической осью ЛДА и осью сосуда при изменении угла в диапазоне $\pm 10°$. Таким образом, предложенный нами ЛДА, в отличие от существующих систем офтальмологического назначения [1–4] и систем ДОКТ [8, 9], обеспечивает точное измерение скорости потока при использовании одного канала регистрации ДСЧ.

Работа выполнена в рамках государственного задания в сфере научно-исследовательской деятельности № 2014/203 НИР №1490 «Разработка оптических методов и средств контроля структуры и динамики биологических сред».

1. Garhofer G., Werkmeister R., Dragostinoff N., Schmetterer L. *Inv. Opht. Vis. Sci.*, **53** (2), 698 (2012).
2. Cherecheanu P., Garhofer G., Schmidl D., Werkmeister R., Schmetterer L. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **13**, 36 (2013).
3. Pemp B., Polska E., Garhofer G., Bayerle-Eder M., Kautzky-Willer A., Schmetterer L. *Diabetes Care*, **33**, 2038 (2010).
4. Riva C.E., in *Ocular Blood Flow* (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2012).
5. Logean E., Schmetterer L., Riva C.E. *Laser Phys.*, **13** (1), 45 (2003).
6. Huang Y., Ibrahim Z., Tong D., Zhu S., Mao Q., Pang J., Lee W.P.A., Brandacher G., Kang J.U. *J. Biomed. Opt.*, **18** (11), 111404 (2013).
7. Mahmud M.S., Cadotte D.W., Vuong B., Sun C., Luk T.W.H., Mariampillai A., Yang V.X.D. *J. Biomed. Opt.*, **18** (5), 050901 (2013).
8. Trasischker W., Werkmeister R.M., Zotter S., Baumann B., Torzicky T., Pircher M., Hitzenberger C.K. *J. Biomed. Opt.*, **18** (11), 116010 (2013).
9. Doblhoff-Dier V., Schmetterer L., Vilser W., Garhöfer G., Gröschl M., Rainer A. L., Werkmeister R.M. *Biomed. Opt. Express*, **5** (2), 630 (2014).
10. Egawa G., Nakamizo S., Natsuaki Y., et al. *Sci. Rep.*, **3**, 1932 (2013).
11. Vieira de Moraes L., Tadokoro C.E., et al. *PLOS Pathogens*, **9** (1), e1003154 (2013).
12. Pinhas A., Dubow M., Shah N., Chui T.Y., Scoles D., Sulai Y.N., Weitz R., Walsh J.B., Carroll J., Dubra A., Rosen R.B. *Biomed. Opt. Express*, **4** (8), 1305 (2013).
13. Jia Y., Morrison J.C., Tokayer J., Tan O., Lombardi L., Baumann B., Lu C.D., Choi W.J., Fujimoto J.G., Huang D. *Biomed. Opt. Express*, **3** (12), 3127 (2012).
14. Leahy M.J. (Ed.) *Microcirculation Imaging* (Blackwell: Wiley, 2012, p. 411).
15. Briers D., Duncan D.D., Hirst E.R., et al. *J. Biomed. Opt.*, **18** (6), 066018 (2013).
16. Feuerstein D., Takagaki M., Gramer M., Manning A., Endepols H., Vollmar S., Yoshimine T., Strong A.J., Graf R., Backes H. *J. Cerebral Blood Flow Metabolism*, **53**, 10.1038 (2014).
17. Silvestre J.S., Smadja D.M., Lévy B.I. *Physiol. Rev.*, **93** (4), 1743 (2013).
18. Fedosov I.V., Tuchin V.V., in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science*. Ed. by V.V.Tuchin (Berlin, Heidelberg, NY: Springer-Verlag, 2013, p. 487–564).
19. Zhang Z. *LDA Application Methods* (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010, p. 274).
20. Pedersen C.J., Huang D., Shure M.A., Rollins A.M. *Opt. Lett.*, **32** (5), 506 (2007).
21. Wang Y., Bower B.A., Izatt J.A., Tan O., Huang D. *J. Biomed. Opt.*, **13** (6), 064003 (2008).
22. Srinivasan V. J., Sakadzić S., Gorczynska I., Ruvinskaya S., Wu W., Fujimoto J.G., Boas D.A. *Opt. Express*, **18** (3), 2477 (2010).
23. Левенко Б.А., Приезжев А.В., Проскурин С.Г., Савченко Н.Б. *Изв. РАН. Сер. Физич.*, **59** (6) (1995).
24. Nagai M., Matsuda K., Ohtsubo J., Homma K., Shimizu K. *Opt. Eng.*, **32** (1), 15 (1993).
25. Welch P.D. *IEEE Trans. Audio Electro Acoustics*, **AU-15** (2), 70 (1967).
26. Bernardi C., Moneta D., Brughera M., Di Salvo M., Lamparelli D., Mazu G., Iatropoulos M.J. *Comp. Haematol. Int.*, **6**, 160 (1996).
27. *Оптическая биомедицинская диагностика*. Под ред. В.В.Тучина (М.: Физматлит. 2007, т. 1).
28. Pozrikidis C. *Fluid Dynamics: Theory, Computation, and Numerical Simulation* (Springer Science + Business Media, LLC, 2009, p.763).