

УДК 535.36

## ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ И ГАЗОВОГО СОСТАВА ГЕМОГЛОБИНА



**С.А. Лысенко<sup>1</sup>**

Заместитель директора ГНУ «Институт природопользования НАН Беларуси», д-р физ.-мат. наук, доцент



**В.А. Фираго<sup>2</sup>**

Доцент кафедры квантовой радиофизики и оптоэлектроники Белорусского государственного университета, канд. физ.-мат. наук, доцент



**А.И. Кубарко<sup>3</sup>**

Профессор кафедры нормальной физиологии Белорусского государственного медицинского университета, д-р мед. наук, профессор



**Э.С. Кашицкий<sup>4</sup>**

Ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии питания и спорта Института физиологии НАН Беларуси, канд. мед. наук., доцент

<sup>1</sup>Институт природопользования НАН Беларуси, Минск, Беларусь;

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь;

<sup>3</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь;

<sup>4</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

E-mail: lysenkorfe@gmail.com

### **С.А. Лысенко**

Специалист в области оптики рассеивающих сред, биомедицинской оптики, методов решения прямых и обратных задач оптического зондирования, аэрокосмических технологий исследования окружающей среды и климата.

### **В.А. Фираго**

Специалист по созданию оптико-электронных систем для диагностики природных сред и биологических объектов, а также в области статистической радиофизики, информационных и электронных технологий.

### **А.И. Кубарко**

Специалист в области нормальной физиологии человека. Заслуженный деятель науки Республики Беларусь. Автор более чем 360 публикаций, в т. ч. 7 авторских свидетельств на изобретения, 8 монографий, серии учебников для студентов медицинских вузов «Основы физиологии человека» 1994, 2009, 2010, 2014, 12 учебных пособий. Под его руководством выполнено 2 докторских и 8 кандидатских диссертаций.

### **Э.С. Кашицкий**

Врач-физиотерапевт. Лауреат Государственной премии Республики Беларусь (1998). Академик Белорусской инженерной академии (1996). Научные интересы: природные курортные факторы Беларуси; проблемы восстановительного лечения больных; физико-химические и биологические свойства минеральных вод и использовании их месторождений в Беларуси.

**Аннотация.** В статье дается обзор разработанных авторами оптических методов и систем для исследования кровеносных сосудов и определения газового состава гемоглобина. Для уменьшения затрат машинного времени при анализе данных оптических измерений с сохранением точности решения, присущей численным

методам теории переноса излучения, используются регрессионно-аналитические методы расчета характеристик многократного рассеяния тканей и крови человека.

**Ключевые слова:** биоткань, кровеносные сосуды, биомедицинская оптика, перенос излучения.

Заболевания сердечно – сосудистой системы являются основной причиной преждевременной смерти в Беларуси и во всем мире. Неинвазивные методы диагностики состояния сосудов, используемые в настоящее время в медицинской практике, не обладают необходимой чувствительностью к ранним проявлениям патологических процессов и носят в основном вспомогательный характер. Применение же инвазивных методов, травмирующих пациента, не всегда оправдано на ранней стадии заболевания.

Большие перспективы для ранней диагностики сосудистых заболеваний открывают исследования сосудистой сети глаза. Известно, что глаз тесно связан со многими органами и системами организма человека, поэтому часто при системных заболеваниях в нем также возникают функциональные или морфологические изменения.

В настоящее время наиболее эффективным средством диагностики глазного дна (ГД) является фундус-камера. Современные фундус-камеры обладают возможностью мультиспектральной съемки и корректируют динамические аберрации оптической системы глаза за счет использования адаптивной оптики. Однако визуальное обследование ГД далеко не всегда обеспечивает объективность диагноза заболевания. ГД состоит из нескольких слоев с различными структурными и морфологическими характеристиками. Результирующее фотоизображение ГД складывается из световых потоков, многократно рассеянных всеми его слоями, вследствие чего возможны существенные различия в трактовке результатов осмотра.

Важным параметром сосудистого русла сетчатки и конъюнктивы глаза, предоставляющим ценную информацию о состоянии в них обменных процессов, является соотношение между окисленным и восстановленным гемоглобином в единице объема ткани. Известен ряд работ по определению степени оксигенации крови в сосудах сетчатки и конъюнктивы спектроскопическими методами, в которых для интерпретации результатов измерений используются упрощенные подходы к описанию процесса взаимодействия света с тканью, не учитывающие многократное рассеяние света в среде и ее неоднородную структуру. Приближения, лежащие в основе данных методов, позволяют получить удовлетворительное согласие с экспериментом на выборочных длинах волн, характерных для спектров поглощения анализируемых хромофоров ткани, однако оценке могут подлежать только соотношения между концентрациями хромофоров, а не их абсолютные величины. Выполнять количественный анализ рассеянных тканью световых потоков в любых спектральных интервалах с учетом всех факторов, влияющих на световой режим в среде, можно только с использованием численных методов теории переноса излучения. Однако большие вычислительные затраты этих методов делают их непригодными для использования в повседневной клинической практике.

В докладе дается обзор разработанных авторами оптических методов и систем для исследования кровеносных сосудов и определения газового состава гемоглобина. Для уменьшения затрат машинного времени при анализе данных оптических измерений с сохранением точности решения, присущей численным методам теории переноса излучения, используются регрессионно-аналитические методы расчета характеристик многократного рассеяния тканей и крови человека.

### **Методы и результаты исследований конъюнктивы глаза**

Для бесконтактных исследований периферийных тканей глаза (конъюнктивы и

склеры) разработан оптико-электронный комплекс, состоящий из двух персональных компьютеров, высокочувствительного оптоволоконного спектрофотометра AvaSpec-2048, монохромной цифровой видеокамеры Imperx Bobcat IGV-B1410M, блока импульсной и непрерывной подсветки на основе светодиодной и оптоволоконной техники. Спектрофотометр и цифровая видеокамера имеют USB интерфейс, что позволяет управлять ими через соответствующее программное обеспечение. Монохромная камера IGV-B1410M формирует 10-ти разрядное цифровое изображение, состоящее из 1040 строк и 1392 столбцов с пространственным разрешением 2 мкм. При регистрации спектров обратного рассеяния (ОР) конъюнктивы используется оптоволоконный зонд. Излучение галогенной лампы передается по шести внешним волокнам жгута зонда и фокусируется объективом на поверхности глаза в виде кольца. Рассеянное тканями конъюнктивы излучение из неосвещаемой центральной области этого кольца собирается объективом и через центральное волокно жгута передается на входную щель спектрометра. Это позволяет фиксировать только излучение, многократно рассеянное тканями конъюнктивы, без вклада излучения, отраженного от ее поверхности. Наводка поля зрения камеры на интересующий участок конъюнктивы и фокусировка изображения осуществляются путем сведения двух пучков лазерного излучения, направленных под углом друг к другу, в одно пятно в плоскости резкого изображения.

Созданный комплекс использовался для измерения спектров обратного рассеяния конъюнктивы нескольких человек разного возраста, добровольно согласившихся на обследование, и предпринята попытка количественного анализа спектров ОР с целью определения структурно-морфологических параметров тканей глаза. Для анализа возможностей разработанных методов анализа выполнен численный расчет спектров ОР среды с кровеносными сосудами [1]. Кровь моделировалась в виде суспензии гемоглобино-содержащих эритроцитов в плазме. Оптические характеристики обескровленной ткани, используемые в расчетах, соответствовали данным лабораторных измерений образцов склеры *in vitro*. Для моделирования оптических характеристик эритроцитов использовалась теория рассеяния света несферическими частицами.

При интерпретации тестовых (модельных) спектров использовалось аналитическое выражение, аппроксимирующее зависимость сигнала ОР, получаемого при пространственном разнесении трактов посылки и регистрации излучения, от оптических параметров среды [1]. Исходными данными служили результаты моделирования переноса излучения в среде методом Монте-Карло. Погрешность их аппроксимации полученным выражением не превышает 2 % во всей области вариаций оптических параметров среды, характерной для биотканей.

Результаты обращения тестовых спектров ОР конъюнктивы с использованием разработанной модели показывают, что при измерении спектров с точностью до некоторого постоянного множителя (что исключает необходимость абсолютной калибровки устройства) из них можно восстановить объемную концентрацию кровеносных сосудов, средний диаметр сосудов и степень оксигенации крови. При этом учет эффекта локализации гемоглобина в эритроцитах не сказывается на точности решения обратной задачи, а эффект локализации эритроцитов в сосудах может быть с высокой точностью описан в рамках простой коррекции поглощательной способности среды. Спектральная зависимость параметра анизотропии рассеяния и показателя преломления ткани также не оказывают значимого влияния на воспроизводимость и результаты обработки тестовых спектров в рамках их модели.

Сопоставление теоретических спектров ОР конъюнктивы с данными измерений для группы добровольцев, показало необходимость учета поглощения света билирубином, содержащимся в плазме крови. Впервые выявлено присутствие нейроглобина или нейроглобиноподобных белков в склере глаза человека, основная функция которых заключается в защите нейронов мозга от повреждений, вызванных недостатком кислорода. Полосы поглощения нейроглобина (425 и 560 нм) проявляются в экспериментальных спектрах ОР

склеры, а их анализ в рамках разработанной модели позволяет обнаруживать концентрации нейтроглобина  $\sim 1$  мкмоль/л.

### Потенциальные возможности бесконтактной диагностики глазного дна

Измерения спектров диффузного отражения света от ГД при его освещении через зрачок, выполняются на базе фундус-камер, оснащенных устройством спектральной селекции оптического излучения (монохроматор, перестраиваемый оптический фильтр, катрографический спектрометр и др.). Для устранения бликов в изображении ГД пациента фундус-камера формирует освещение поверхности зрачка исследуемого глаза в виде краевого кольца. Изображение этого кольца полностью перекрывается в приемном канале фундус-камеры, а на фоторегистратор и входную апертуру спектрометрического устройства поступает только световой поток, диффузно отраженный от ГД. Наводка поля зрения камеры на интересующий участок ГД осуществляется путем фиксации взгляда пациента на светящейся метке, которая может перемещаться по полю зрения пациента.

После прохождения светового потока через оптическую систему глаза он попадает на глазное дно, состоящее из четырех слоев: сетчатки, пигментного эпителия, сосудистой оболочки и склеры. Здесь свет частично поглощается кровью и макулярным пигментом в сетчатке, меланином в эпителии и кровью в сосудистой оболочке, многократно рассеивается и переотражается между слоями ГД. В результате некоторый диффузный поток рассеянного излучения выходит из глаза и попадает на приемное устройство. Отношение полного выходящего из среды диффузного потока к падающему на нее направленному потоку есть коэффициент диффузного отражения (КДО) среды. Для его расчета разработан простой и быстрый метод, учитывающий многократное рассеяние света в слоях ГД и переотражения света между слоями [2]. В основе метода лежат формулы оптического «слоения» слоев среды, в которых оптические параметры слоев (коэффициенты поглощения и рассеяния) заменены некоторыми эффективными величинами, отличающимися для случаев направленного и диффузного освещения слоя. Коэффициенты связей эффективных оптических параметров слоев с фактическими установлены на основании результатов численного моделирования переноса излучения в среде методом Монте-Карло.

Метод определения параметров ГД заключается в минимизации невязки между экспериментальным и модельным спектром КДО. Результат подбора экспериментальных данных представлен на рисунок 1. Видно, что различия между теоретическим и экспериментальными спектрами находятся на уровне погрешности измерений.

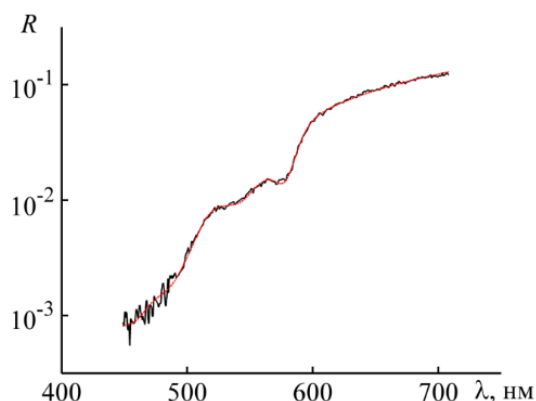


Рисунок 1. Результаты подбора экспериментального спектра диффузного отражения глазного дна в рамках разработанной аппроксимационной модели переноса излучения

Результаты теоретических оценок погрешностей решения соответствующей обратной задачи для модельных биологических сред с известными параметрами показывают, что разработанным методом получать оценки объемной концентрации кровеносных сосудов в сетчатке (коэффициент корреляции  $\rho$  между фактическими и восстановленными значениями – 0.97), объемную концентрацию кровеносных сосудов в сосудистой оболочке ( $\rho = 0.97$ ), степень оксигенации гемоглобина в крови ( $\rho = 0.99$ ), оптическую плотность макулярного пигмента в сетчатке ( $\rho = 0.99$ ), объемную концентрацию меланина в эпителии ( $\rho = 0.97$ ), структурный параметр сетчатки, характеризующий содержание в ней рассеивающих центров ( $\rho = 0.95$ ).

### Определение геометрических параметров сосудов

Для дифференциальной диагностики новообразований в тканях пищеварительного тракта и дыхательной системы человека при их эндоскопическом обследовании большое значение имеет анализ структуры микрососудистого рисунка, связанный с гистологическим строением ткани [3]. Поскольку гемоглобин является основным поглотителем видимого света в слизистых оболочках человека и локализован в сосудах, то, очевидно, что его двумерное распределение должно давать четкую и высококонтрастную картину кровеносной сети. В работе [4] показана возможность использования трехцветных (RGB) изображений биотканей для определения их гемоглобинового индекса  $HbI$ , под которым понимается отношение концентрации общего гемоглобина в ткани к ее транспортному показателю рассеяния на длине волны 632 нм. Анализ эффективности использования  $HbI$  для отображения кровеносной сети биоткани выполнен на основе синтезированных изображений многослойной многократно рассеивающей среды, имитирующей ткань бронхов. Модельная среда представлена тремя слоями: 1) эпителий, 2) слизистая оболочка и подслизистая основа; 3) фиброзно-хрящевая оболочка. Показатели рассеяния и фактор анизотропии индикатрисы рассеяния крови соответствовали экспериментальным данным для образца крови с гематокритом  $H = 0.421$  и концентрацией гемоглобина  $C_{Hb} = 129$  г/л. Процесс переноса излучения в среде моделировался методом Монте-Карло, основанным на последовательном отслеживании большого количества траекторий фотонов в среде до их выхода из среды или уменьшения их «мощности» до пренебрежимого уровня.

Смоделированные изображения бронхиальной ткани, содержащей три сосуда различного диаметра, приведены на рисунок 2. Видно, что из-за многократного рассеяния света окружающей тканью, контраст сосудов низкий, а их контуры существенно размыты. На изображении также присутствуют артефакты, связанные с падением освещенности на его краях.

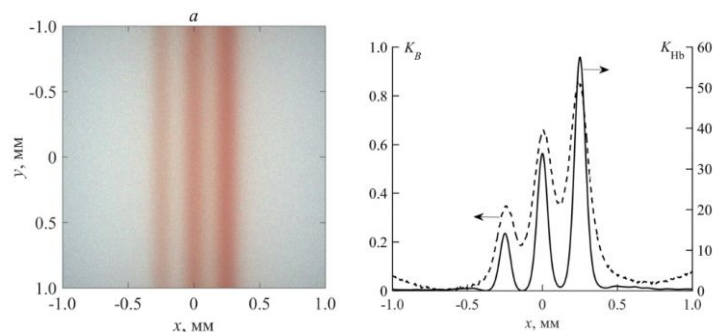


Рисунок 2. Синтезированное изображение среды, имитирующей бронхиальную ткань (а), и пространственные профили его контрастов до (штрихи) и после (линия) его преобразования в двумерное распределение гемоглобинового индекса

Рассмотрим, как изменится видимость сосудов при их отображении в гемоглобиновом индексе. Учитывая симметрию исходного изображения ткани, определим его контраст как  $K_B(i) = (V_{B, \max} - V_B(i)) / V_B(i)$ , где  $i$  – целочисленная координата пиксела в направлении перпендикулярном сосудам,  $V_B(i)$  – средняя яркость пикселов с координатой  $i$  в синем канале изображения,  $V_{B, \max}$  – максимальная яркость пикселов в синем канале. После преобразования изображения в распределение HbI сосуды приобретут светлые цвета на фоне темной окружающей ткани, поэтому определим контраст преобразованного изображения как  $K_{Hb}(i) = (HbI(i) - HbI_{\min}) / HbI_{\min}$ , где  $HbI_{\min}$  – минимальный гемоглобиновый индекс вдоль оси, перпендикулярной сосудам. Контрасты исходного и преобразованного изображений сопоставлены на рисунок 2б. Видно, что после преобразования исходного изображения в распределение гемоглобинового индекса отмеченные выше артефакты практически полностью устраняются, увеличивается четкость контуров сосудов, а их контраст возрастает почти на 2 порядка, что способствует улучшению качества изображений кровеносных структур. Оперативная реконструкция изображений ткани в гемоглобиновом индексе, не зависящем от условий освещения и съемки, открывает возможность для разработки и использования объективных пороговых критериев сегментации сосудов на изображениях.

При изучении реакции сосудов на воздействия, в том числе и сосудодобных препаратов, большой интерес представляет оценка диаметра и площади сечения внутреннего просвета сосудов. Анализ эффективности применения существующих алгоритмов выделения контуров для решения задачи построения скелета сосудистого рисунка бульбарной конъюнктивы глаза показал, что их применение приводит к многочисленным разрывам при трассировке слабоконтрастных изображений малых сосудов. В данной работе предложено использовать кольцевые структуры с расширяющимися радиусами, механизм функционирования которых аналогичен действию рецептивных полей сетчатки глаза и зрительной коры мозга. С целью устранения разрывов, возникающих на некоторых участках изображения капилляров за счет ограниченного числа эритроцитов, разработан специальный алгоритм выделения граничных точек разрывов и заполнения возникающих промежутков. Такой подход позволяет формировать скелет сосудистого рисунка цифровых изображений видимых сосудов бульбарной конъюнктивы с небольшим количеством ложных точек и русел, что демонстрирует изображение на рисунке 3.

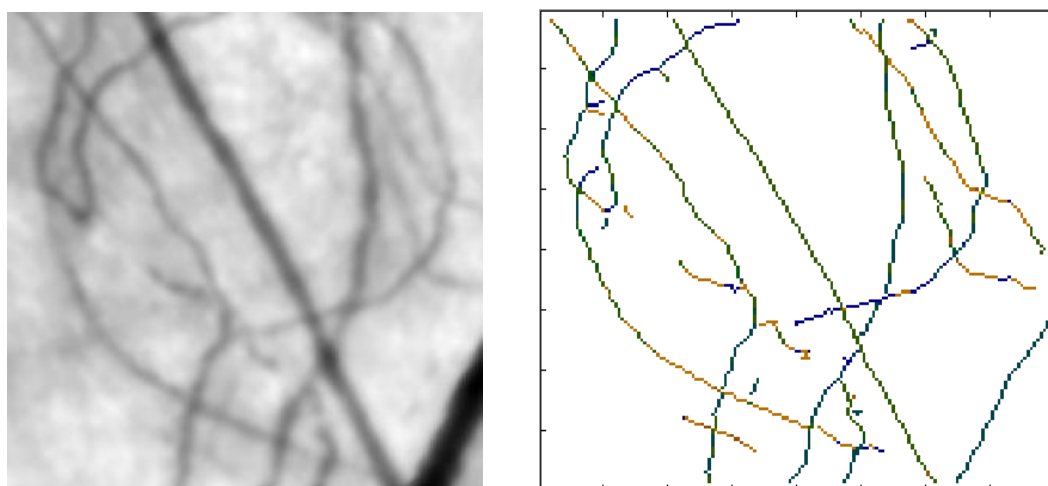


Рисунок 3. Фрагмент изображения бульбарной конъюнктивы (а) и результат трассировки сосудистого рисунка (б)



Проводимая трассировка сосудистого рисунка значительно упрощает задачу сегментации сосудистого рисунка и последующего определения диаметра внутреннего просвета сосудов. Кольцевые структуры позволяют в каждом пикселе, принадлежащем оси сосуда, определять направление оси и формировать контур поперечного сечения его цифрового изображения.

Разработанный алгоритм позволяет автоматически формировать карту распределения эквивалентных диаметров внутреннего просвета видимых сосудов бульбарной конъюнктивы глаза. Получаемые гистограммы Гистограммы распределения эквивалентного диаметра ( $a$ ) и площади ( $b$ ) внутреннего просвета видимых сосудов бульбарной конъюнктивы, полученные при обработке изображения с размером  $1040 \times 1392$  пикселей, фрагмент которого представлен на рисунок 3а, примеры которых приведены на рисунке 4 имеют несколько мод, которые соответствуют сосудам разного калибра. Заметим, что при достаточно большой площади анализируемого участка бульбарной конъюнктивы, равной нескольким квадратным миллиметрам, моды гистограммы сильно перекрываются и сглаживаются, вследствие плавности изменения диаметров внутреннего просвета по мере перехода от артерий к артериолам, капиллярам, венулам и венам.

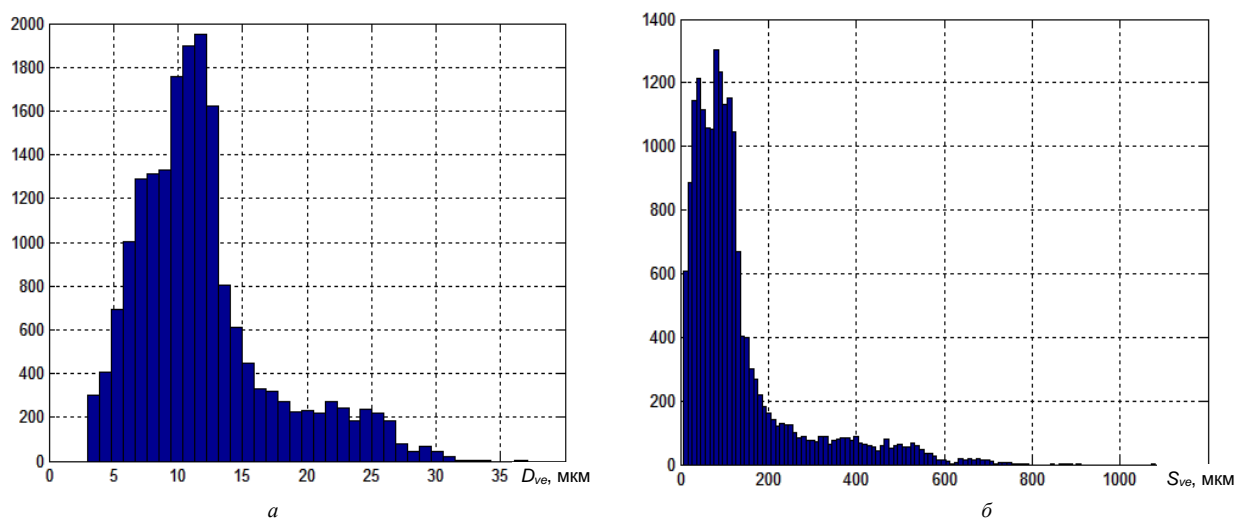


Рисунок 4. Гистограммы распределения эквивалентного диаметра

Получаемые гистограммы распределения диаметра и площади внутреннего просвета сосудов бульбарной конъюнктивы могут быть использованы физиологами и врачами при исследованиях морфологических параметров сосудов микроциркуляторного русла, ранней диагностике сосудистых патологий, характера реагирования сосудов на действие сосудоактивных веществ, выявления склонности пациента к развитию вазоспазма и т. д.

#### Литература

- [1] Лысенко, С.А. Определение структурно-морфологических параметров бульбарной конъюнктивы человека по спектрам диффузного отражения света / С.А. Лысенко, В.А. Фираго, М.М. Кугейко, А.И. Кубарко // Журн. прикл. спектр. – 2016. – Т. 83, № 4. – С. 606–615.
- [2] Лысенко, С.А. Метод расчета коэффициента диффузного отражения света от глазного дна / С.А. Лысенко, М.М. Кугейко // Журн. прикл. спектр. – 2016. – Т. 83, № 3. – С. 419–429.
- [3] Magnifying narrowband imaging is more accurate than conventional white-light imaging in diagnosis of gastric mucosal cancer / Y. Ezoe [et. al.] // Gastroenterology. – 2011. – Vol. 141, № 6. – P. 2017–2025.
- [4] Лысенко, С.А. Метод выделения кровеносных сосудов на трехцветных изображениях биотканей // Журн. прикл. спектр. – 2017. – Т. 84, № 3. – С. 419–427.

## OPTICAL METHODS OF DIAGNOSING BLOOD VESSELS AND GAS COMPOSITION OF HEMOGLOBIN

**S.A. LYSENKO<sup>1</sup>**  
*Deputy Director of the Institute for Nature Management of National Academy of Science of Belarus, Dr. Phys.-Mat. science*

**V.A. FIRAGO<sup>2</sup>**  
*Professor of the Department of Quantum Radiophysics and Optoelectronics of Belorussian State University, PhD*

**A.I. KUBARKO<sup>3</sup>**  
*Professor of the Department of Normal Physiology of the Belarusian State Medical University, Dr. Med. sciences, professor*

**E.S. KASHITSKY<sup>4</sup>**  
*Leading researcher at the Laboratory of Nutrition and Sports Physiology of the Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, PhD*

<sup>1</sup>*Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

<sup>2</sup>*Belorussian State University, Minsk, Belarus;*

<sup>3</sup>*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;*

<sup>4</sup>*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

*E-mail: lysenkorfe@gmail.com*

**Abstract.** The article provides an overview of the optical methods and systems developed by the authors for studying blood vessels and determining the gas composition of hemoglobin. To reduce the cost of computer time in analyzing optical measurement data while maintaining the accuracy of the solution inherent in numerical methods of radiation transfer theory, regression-analytical methods are used to calculate the characteristics of multiple scattering of human tissue and blood.

**Keywords:** tissue, blood vessels, biomedical optics, radiative transfer.