



*Двенадцатая Международная научно-техническая конференция
«Оптические методы исследования потоков»
Москва, 25 — 28 июня 2013 г.*

УДК 535.8

А.И.Омельченко, Э.Н.Соболь, Е.М.Щербаков

*Институт Проблем Лазерных и Информационных технологий РАН
142190, Москва-Троицк, Пионерская ул., 2, E-mail: alexio@kmail.ru*

БИОМЕДИЦИНСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПРОЗРАЧНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ ПРИ ЛАЗЕРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

АННОТАЦИЯ

Приведены результаты визуализации гидродинамических потоков и полей термоупругих напряжений в исследованиях лазерного воздействия на биоматериалы и ткани. Рассмотрены различные шлирен- и теневые схемы визуализации термомеханического воздействия лазерных импульсов на вязкоупругие материалы и биоткани. Разработаны методы бесконтактного контроля основных термодинамических параметров среды в зоне лазерного воздействия. На основе видеорегистрации пространственно-временной динамики изображения изучены фототермические и гидравлические эффекты в биологических средах при импульсно-периодическом лазерном воздействии. Изучаются процессы лазерно-стимулированного массопереноса биофункциональных наночастиц в оптически прозрачных биоматериалах. Рассматриваются вопросы обработки изображения для создания контрольных систем технического зрения в лазерной медицине.

**ЛАЗЕРНАЯ МЕДИЦИНА, БИОМАТЕРИАЛЫ, ЛАЗЕР, ФОТОТЕРМИЧЕСКИЕ И
ГИДРАВЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ, ТЕНЕВЫЕ МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ, ЦИФРОВАЯ
ОБРАБОТКА ИЗОБРАЖЕНИЯ**

ВВЕДЕНИЕ

При лазерном воздействии на прозрачные биоматериалы, содержащие поглощающие компоненты: ткани, клетки и тканевые жидкости, а также вводимые фотопоглощающие наночастицы, в результате фототермического эффекта и различия коэффициентов теплового расширения твердой и жидкой фаз возникает неоднородное распределение материала [1]. Такая неоднородность вызывает внутренние напряжения в вязкоупругой среде. Если нагрев происходит за время меньше времени вязкоупругой релаксации, то в среде остается лазерно-индуцированное поле внутренних напряжений. Это поле обычно наблюдают и изучают с помощью известного метода фотоупругости [2]. Однако этот метод применим только для оптически активных материалов. Для случайно-неоднородных, неупорядоченных сред, таких как гели и сильно гидратированные биоткани, метод фотоупругости не применим.

Для визуализации поля термонапряжений в гидрогелях, хрящевых тканях и в некоторых тканях глаза используются шлирен- и теневые схемы [1,3]. В предлагаемой работе представлен обзор оптических методов визуализации гидродинамических и диффузионных потоков, механических напряжений и деформаций в прозрачных и полупрозрачных биоматериалах.

ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ БИОМАТЕРИАЛОВ

Лазерное воздействие на полупрозрачные вязкоупругие материалы приводит к возмущению оптической однородности среды с формированием в зоне воздействия так называемых фазовых объектов, обычно не видимых невооруженным глазом. Это происходит в силу того, что лазерно-индуцированные изменения показателя преломления незначительны, а размеры зоны лазерного воздействия значительно больше длины волны

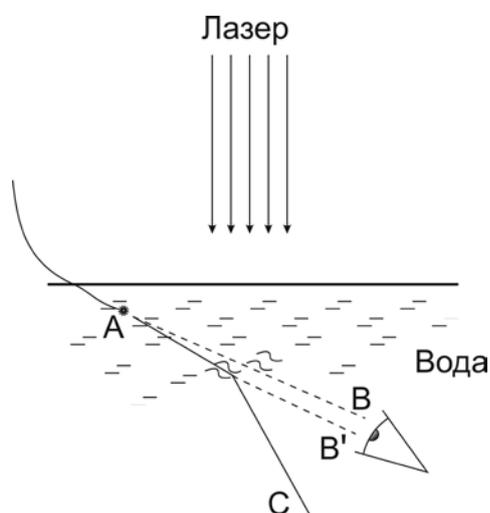


Рис. 1. Наблюдение лазерно-индуцированных фазовых объектов в водной среде. А - источник света, В - луч не рассеянный, В\` - рассеянный луч С - френелевски отраженный луч.

света. В виду малости фазового сдвига световой волны наблюдается слабая модуляция интенсивности в изображении зоны лазерного воздействия. Для увеличения контраста изображения используют оптические схемы интерференционного и фазового контраста [4], а также методы пространственной фильтрации (нож Фуко в методе Теплера).

Среди оптических методов нашли применение различные шлирен- и теневые методы визуализации фазовых объектов в оптически прозрачных и полупрозрачных материалах и жидких средах [5]. В настоящее время также известны фотометрические и флуоресцентные методы наблюдения перемещения пробных частиц, вводимых в исследуемые прозрачные среды. Эти методы изучения перемещений в жидкостях и тканях основаны на измерении координат и

скоростей частиц по их изображениям, полученным в последовательные фазы движения среды (*PIV-Particles Image Velocitometry* и *PTA-Particles Track Analysis*). Для исследования процессов лазерного воздействия на ткани глаза нашли применение методы оптической когерентной томографии. Здесь используется усиление фазового контраста рассеянного назад от ткани когерентного излучения при попадании его в интерферометрическую систему регистрации.

Шлирен- визуализация фазовых объектов

Для визуализации лазерно-индуцированных фазовых объектов в биологических тканях и гелях используются различные оптические системы шлирен- и теневой визуализации [1,3]. Основы анализа и синтеза подобных систем рассмотрены в [5-7]. На Рис.2 представлена система визуализации лазерно-индуцированных механических напряжений в биотканях и гелях, построенная по классической схеме Теплера. Эта система состоит из монохроматического источника света, телескопа, плоской прозрачной кюветы, заполненной иммерсионной жидкостью (вода, гель), с образцом ткани и оптическим волокном доставки лазерного излучения, лазера и цифровой видеокамеры. Для увеличения контраста изображения может использоваться нож Фуко.

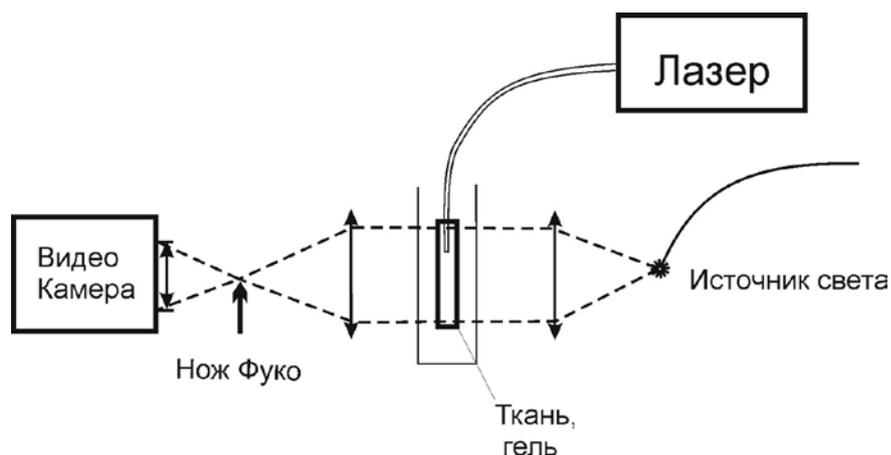


Рис. 2. Оптическая система визуализации лазерно-индуцированных эффектов в биотканях и гелях.

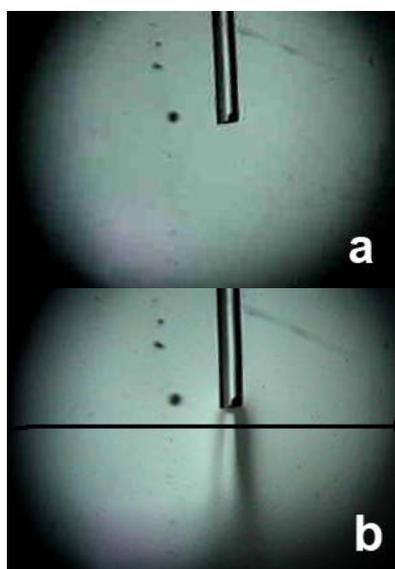


Рис. 3. Теневая картина, полученная при визуализации области воздействия лазерных импульсов на гидрогель: а – нет импульса; в – во время лазерного импульса (показана линия сканирования).

При использовании импульсного Эрбий волоконного лазера в биотканях и гелях наблюдаются лазерно-индуцированные эффекты [1]. С включением лазера происходит поглощение лазерного излучения в образце ткани или геле. При этом вблизи выходной апертуры оптического волокна доставки, формируется аксиально-симметричное поле механических напряжений (Рис.3), вызванных нагревом и термическим расширением внутритканевой жидкости (воды).

Ввиду различия коэффициентов термического расширения воды и ткани, под действием высокого давления возникает перемещение волокон и формирование в области лазерного воздействия оптической неоднородности. Такая неоднородность обуславливает возникновение фазового объекта в области наблюдения. Введение фотопоглощающих наночастиц облегчает визуализацию лазерно-индуцированных фазовых объектов в прозрачной среде [3].

На Рис.3б показана теневая картина, возникающая в прозрачном геле при воздействии импульсно-периодического лазерного излучения. Использовался гидрогель с вязкостью $10 \text{ Па}\cdot\text{с}$ и оптическим поглощением 10 см^{-1} . При введении поглощающих лазерное излучение наночастиц возрастает фототермический эффект лазерного излучения в геле [8]. Это приводит к еще большему увеличению гидростатического

давления в зоне лазерного воздействия и дальнейшему перераспределению концентрации наночастиц.

Мы провели обработку изображения теневой картины зоны лазерного воздействия на гель с наночастицами и получили профиль радиального распределения концентрации. На рис. 4 представлены распределения оптической плотности в продольном сечении теневой картинке в зоне лазерного воздействия (линия сканирования показана на рис.3) и результаты расчета радиального распределения плотности $C(r)$ в поперечном сечении. В расчетах предполагалась аксиальная симметрия теневой картинке, а ее оптическая плотность в заданной точке определялась по методу Абеля.

В соответствии с рассчитанным радиальным распределением плотности $\Delta C/C_0$ можно рассчитать распределение показателя преломления n лазерно-индуцированного фазового объекта, возникающего в зоне лазерного воздействия.

Расчет величины давления в области лазерного воздействия для случая гауссового пучка и аксиально-симметричной теневой картины представлен в работе [3]. На основе такого расчета была проведена компьютерная обработка изображения теневых картинок (Рис.3б), полученных при видеорегистрации динамических фазовых объектов в зоне лазерного воздействия. В результате этой обработки [3] была получена временная зависимость величины давления и термоупругих напряжений. Таким образом, было получено поле термоупругих напряжений из эксперимента по визуализации лазерно-индуцированных фазовых объектов. Следует отметить, что такая обработка возможна для вязкоупругих сред, таких как гель, хрящ и др. при деформациях вплоть до предела упругости и разрушения образца под действием лазерного нагрева.

Для изучения лазерно-индуцированных течений, возникающих на стадии нестационарного нагрева, необходимо провести проверку соответствия расчетной модели получаемым экспериментальным данным. С учетом модификации модели можно будет получить количественную информацию о возникновении кавитационных пузырьков при импульсном лазерном нагреве вязкоупругих сред.

PIV и PTA - обработка изображений потоков, перемещений и деформаций среды для определения координат, скоростей и траекторий частиц

Для изучения перемещения среды под действием лазерного нагрева использовалась видеорегистрация изображения области воздействия лазерного пучка [8]. В прозрачный гель, вместе с наночастицами, вводились пробные флуоресцентные частицы, которые в зоне действия лазерного пучка подсвечивались зеленым светом (пилот-луч лазера с $\lambda = 532$ нм). Основное излучение Er- волоконного лазера мощностью 1,5 Вт, длительностью импульсов 0,6 с и периодом повторения 1,5 с направлялось по световоду в гель. В результате лазерного нагрева из-за термического расширения жидкости (в гидрогеле связывается до 80% воды) наблюдается перемещение среды из горячей области в холодную. Это можно видеть на последовательных кадрах изображения, полученного при видеорегистрации - Рис.5. При этом вдоль оси лазерного пучка наблюдаются поршневые (продольные) колебания скорости перемещения частиц в области нагрева. Значение скорости перемещения частиц можно получить из значения смещения d и времени кадровой развертки. Обработка изображения частиц Рис.5а показала, что амплитуда скорости перемещения среды в области лазерного воздействия может достигать $\sim 1,8-2$ мм/с.

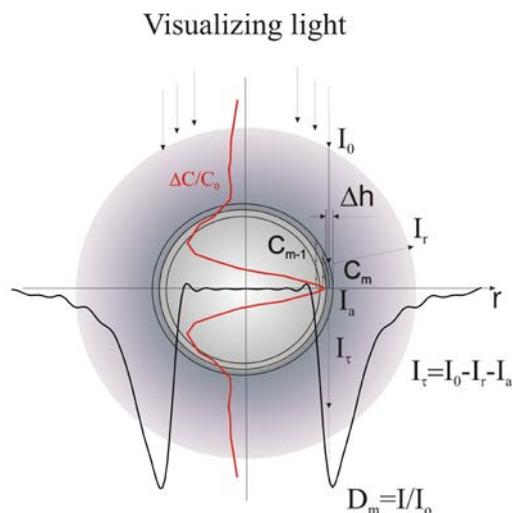


Рис. 4. Шлирен визуализация воздействия лазерного излучения на полупрозрачный гель с фотопоглощающими наночастицами (лазерное излучение направлено перпендикулярно плоскости рисунка, а свет визуализации параллелен ей.)

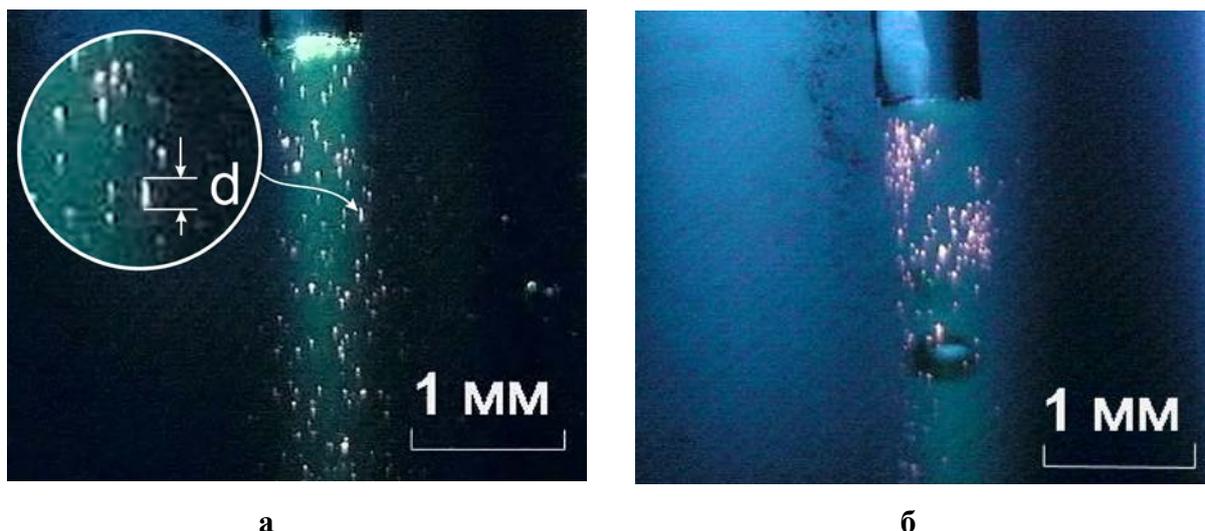


Рис. 5. Теневое изображение геля в области контакта со световодом:
 а) исходного геля, с равномерным распределением концентрации наночастиц (показано d - начальное смещение пробной частицы в начале лазерного воздействия) и б) после воздействия импульсного нагрева лазерным излучением (отчетливо видно сгущение частиц на границе лазерного пучка и образование кавитационного пузырька).

Оптическая когерентная томография

Неабляционное действие инфракрасного лазерного излучения на некоторые ткани глаза (роговица, склера) приводит к изменению структуры и механических свойств в облучаемой ткани. Для исследования механизма возникновения таких изменений необходимо получить информацию о структуре и свойствах подповерхностных слоев облучаемой ткани в процессе лазерного воздействия. Получить такую информацию позволяет оптическая когерентная томография (ОКТ) [9]. На Рис.6а показана схема визуализации структуры ткани при лазерном облучении склеры глазного яблока кролика, а

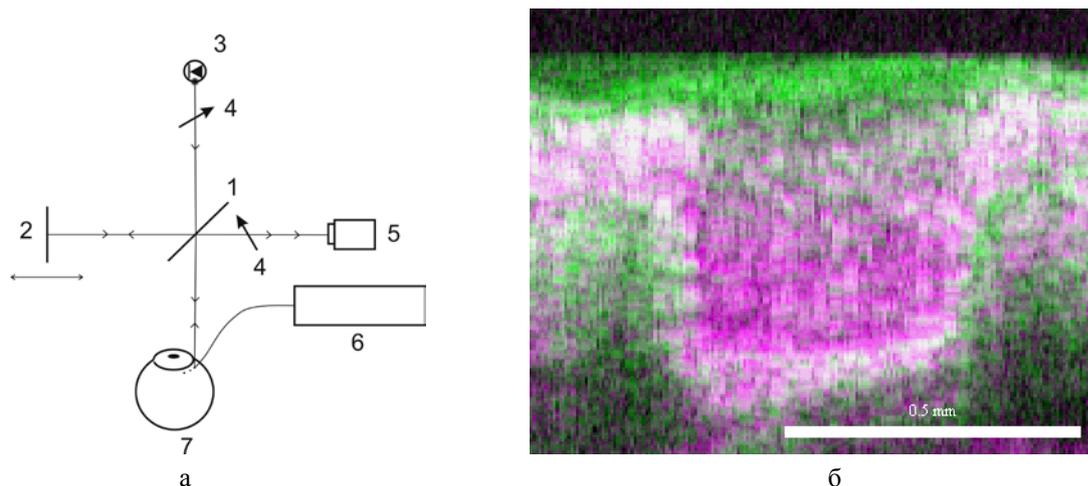


Рис. 6. Поляризационно-чувствительная ОКТ: а) 1-расщепитель пучка, 2-подвижный отражатель, 3- источник низко-когерентного излучения, 4- поляриды, 5 детектор , 6-волоконный лазер, 7- глаз кролика; б) – томограмма склеры кролика, после облучения 10 сек лазерным пучком в неабляционном режиме (видны изменения в центре зоны лазерного воздействия, по всей глубине склеры).

Рис. 6 б демонстрирует картину подповерхностных изменений структуры склеральной оболочки после лазерного облучения.

С помощью поляризационно-чувствительной ОКТ представляется возможным визуализировать упорядоченные структуры вблизи поверхности вне зоны лазерного воздействия (Рис.6 б). Также можно увидеть изменение направления упорядочения под действием лазерного излучения в глубине ткани. Кроме того, в зоне лазерного воздействия наблюдается уменьшение оптической плотности рассеивающих центров, что также видно на томографической картинке Рис. 6 б.

Фотометрия непрозрачных наночастиц в прозрачных объектах

Разработка новых методов лечения с помощью наночастиц требует принципиально новых средств диагностики. Высоких результатов в изучении диффузионного проникновения наночастиц в гидратированные ткани с низкой проницаемостью (хрящ, склера глаза) можно достигнуть, применяя простые методы визуализации [3]. К таким методам относится шпирен- визуализация малых неоднородностей в слабо поглощающих средах. На Рис. 7 представлена визуализация распределения наночастиц оксида железа в тонком цилиндрическом образце, помещенном в растворе в тонкий прозрачный слайд. В окружающем хрящевой образец растворе поддерживалась постоянная концентрация наночастиц магнетита, средний размер которых не превышал 15 нм. Этот образец подвергался импульсно-периодическому нагреву лазерным пучком Er- волоконного лазера, направленным в центр. Изображение на Рис. 7 (а) представляет исходное распределение наночастиц в хряще до лазерного воздействия. На Рис. 7 (б) изображено такое распределение после 3 мин облучения импульсно-периодическим излучением мощностью около 1 Вт с частотой повторения импульсов 1 Гц и длительностью 500 мс. Здесь же показаны распределения каналов яркости, полученных при пиксельной обработке изображения вдоль линии сканирования (показана на изображении Рис.7 а,б).

Используя распределения синего канала (соответствует максимуму поглощения наночастиц оксида железа), можно получить распределение концентрации наночастиц в образце хряща. На Рис.7 показаны распределения концентрации наночастиц, полученных в приближении «оптически тонкого» образца в различные моменты времени до - (1) и (2) - после лазерного облучения. Ввиду того, что использовались ВМР-изображения с 8 – битовым представлением яркости, значения концентрации $C(N)$ рассчитывались по формуле:

$$C(N) = 255 - B(N).$$

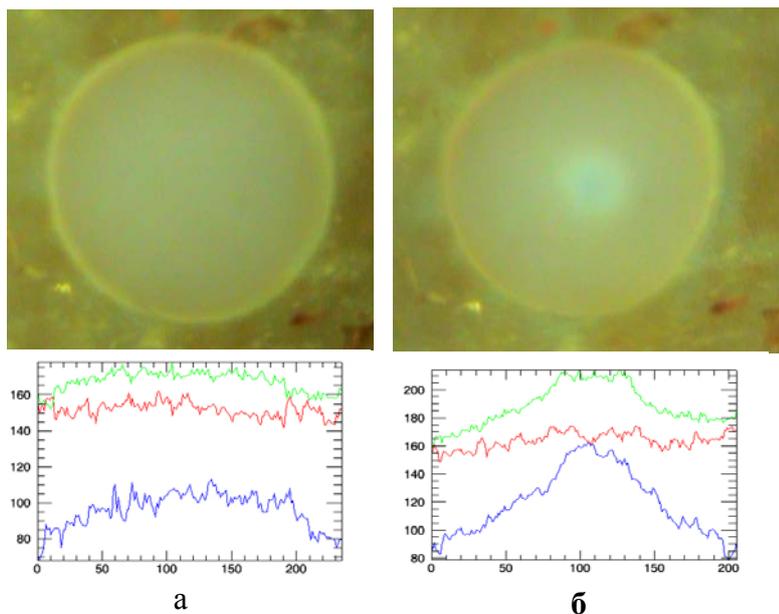


Рис. 7. Распределение наночастиц оксида железа: а - в необлученном хряще; б – в облученном лазером хряще; (внизу показаны пиксельная обработка изображений и распределение RGB- каналов яркости по линии сканирования).

Отметим, что фотометрия образцов ткани осуществлялась на оптически тонких образцах в линейном приближении бугеровского поглощения. Рассеянием света пренебрегалось ввиду сильного поглощения наночастиц на длине волны 340 нм [10].

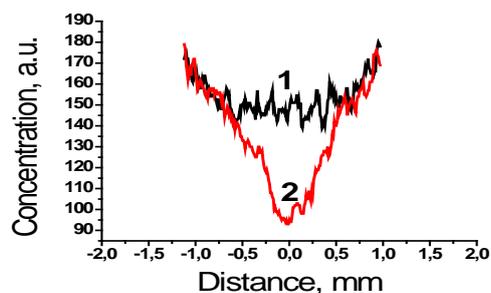


Рис. 8. Распределение концентрации наночастиц в необлученном (1) и облученном образце хряща (2)

Метод Силуэта

Метод Силуэта используется для изучения формы непрозрачных объектов по профилю тени, образуемой на плоском экране при освещении параллельным пучком света. На Рис. 9 представлен силуэт роговицы глаза свиньи, зарегистрированный с помощью цифровой видеокамеры в оптической системе визуализации, которая показана на Рис.2.

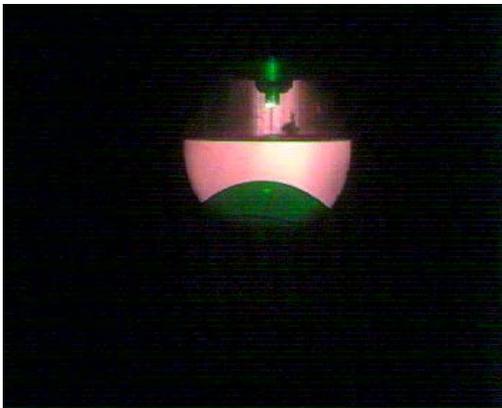


Рис. 9. Изображение силуэта роговицы глазного яблока свиньи, облучаемого кольцевым источником лазерного излучения Ег-лазера мощностью 3 Вт (показано сверху).

Полученное изображение с помощью цифровой фильтрации преобразуют в черно-белое изображение контура тени. Затем линию контура переводят в кривую Безье и далее определяют кривизну этой кривой. Рис.10 демонстрирует изменение радиуса кривизны роговицы при ее облучении лазерным пучком с кольцевым распределением интенсивности. Здесь показана визуализация профиля роговицы неподвижного глаза и зарегистрированы изменения радиуса кривизны в одном из сечений. Однако представляется возможным получение ее профиля в нескольких сечениях объекта с помощью подвижной теневой оптической системы. Таким методом можно исследовать топографию поверхности роговицы непосредственно в процессе изменения формы поверхности

в ходе лазерной операции. Отдельные элементы оптической системы могут использоваться в контрольной системе технического зрения лазерной медицинской установки. Кроме того, с использованием современных многопиксельных видеокамер этот метод по пространственному разрешению может составить конкуренцию кератотопографам на основе проекционных световых колец.

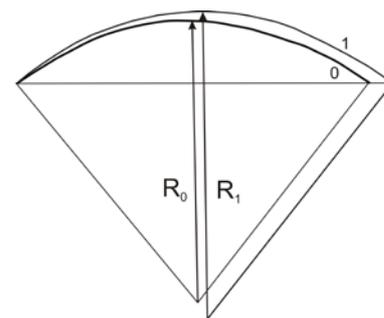


Рис. 10. Профили роговицы: 0- в начале облучения, 1 – при лазерном облучении в течение 100 с. Значения радиусов кривизны роговицы: $R_0=8.3$ мм; $R_1=9$ мм;

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптические методы визуализации имеют широкое применение в биомедицине. Они используются для исследования взаимодействия лазерного излучения с биологическими тканями и вязкоупругими материалами, входящими в них. Диапазон этих исследований достаточно широк: от лазерно-индуцированных гидродинамических потоков до изучения диффузии наночастиц в хрящевых тканях. Применение современных методов видеорегистрации быстротекающих процессов и цифровой обработки изображений позволяют проводить исследования на различных временных масштабах и пространственного разрешения. Так использование математической обработки изображений теневых картин позволяет получить информацию о пространственно-временной динамике термоупругих напряжений, возникающих при взаимодействии лазерного излучения с вязкоупругими материалами и тканями. Метод силуэта позволяет визуализировать форму роговицы глаза и изучать топографию поверхности биоткани при лазерном воздействии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку работы. Грант РФФИ № 11-08-00574 а.

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ (к рисунку 4).

I_0 – интенсивность падающего на объект света, Вт/м²;
 I_a – интенсивность поглощенного света, Вт/м²;
 I_r – интенсивность отраженного света, Вт/м²;
 I_τ – интенсивность прошедшего света, Вт/м²;
 Δh – толщина цилиндрического слоя в среде;
 n – показатель преломления среды;
 N – номер пикселя;
 V – яркость пикселя;
 $D_m = I/I_0$ – оптическая плотность теневой картины в точке m ;
 C_m, C_{m-1} – точки равной плотности фазового объекта;
 C_0 – плотность в центре фазового объекта;
 ΔC – радиальное изменение плотности от точки к точке.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Omelchenko A.I., Sobol E.N.** Imaging of laser-induced thermo-elastic stress in biotissues with shadowgraph. Optical and Digital Image Processing, edited by Peter Schelkens, Touradj Ebrahimi, Gabriel Cristóbal, Frédéric Truchetet, Proc. of SPIE Vol. 7000, 700015, (2008), doi: 10.1117/12.780094
2. **Теория упругости.** / С.П. Тимошенко, Дж. Гудьер. 2-е изд. М.: Наука, 1979. 560 с.
3. **Omelchenko A.I., Sobol E.N.** Shleiren visualization of laser-induced flow in biological tissues and gels with nanoabsorbers. International Conference on Fluid Control, Measurement, and Visualization August 17-21, 2009, Moscow, Russia.
<http://www.ihed.ras.ru/flucome10/rus/index.htm>
4. **Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging** / D.B.Murphy, John Wiley & Sons, 2001. 368 p.
5. **Теневые методы.** / Л.В. Васильев, М.: Наука, 1968. 368 с.
6. **Sun M.** Computer modeling of shadowgraph optical setup. Proc. of SPIE, V.6279 62790 L1-8. 27th International Congress on High-Speed Photography and Photonics, edited by Xun Hou, Wei Zhao, Baoli Yao, Proc. of SPIE Vol. 6279, 62790L, (2007) · doi: 10.1117/12.725100.
7. **Anyoji M., Sun M.** Computer analysis of the shlieren optical setup. Proc. of SPIE, V. 6279 62790 M1-8. 27th International Congress on High-Speed Photography and Photonics, edited by Xun Hou, Wei Zhao, Baoli Yao, Proc. of SPIE Vol. 6279, 62790M, (2007) · doi: 10.1117/12.725101.
8. **Омельченко А.И., Соболев Э.Н.** Влияние лазерного излучения и магнитного поля на массоперенос фотопоглощающих магнитных наночастиц в вязкоупругих биологических тканях. / Перспективные материалы. 2010. №8. С.125-128.
9. **Sobol E.N., Baum O.I. et al.** Eye tissue structure and refraction alterations upon non-destructive laser action. / Laser Physics. 2006. V.16, No.5. P.735-740.
10. **Омельченко А.И., Сошникова Ю.М. et al.** Применение лазерных методов для изготовления и стабилизации биофункциональных наночастиц. // Тез. докладов V Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» (ТКМФ-5) 2012. Т.2. С.19-21.

A.I. Omelchenko, E.N.Sobol, E.M.Sherbakov

*Institute on Laser and Information Technologies of Russian Academy of Sciences
2 Pioneerskaya str., Moscow, Troitsk, Russia, 142190; E-mail: alexio@kmail.ru*

BIOMEDICAL APPLICATION OF VARIOUS TECHNIQUES FOR VISUALIZATION OF LASER EFFECT ON TRANSPARENT BIOMATERIALS

Visualization study of hydrodynamic flow and thermoelastic stress-fields resulted in laser effect on transparent biomaterials and tissues are presented. Various shlieren- and shadowgraph schemes for visualization of thermomechanics effect of laser pulses on the visco-elastic biomaterials and biotissues were considered. Noncontact techniques for control of the general thermodynamic parameters of materials in zone of laser-tissue interaction have been designed. Photothermal and hydraulic effects on biological media irradiated by repetitive pulse laser radiation have been studied using spatial and time-resolved dynamics of the images video recorded. Biofunctional nanoparticles mass transfer in laser-stimulated diffusion in the transparent biomaterial are studied. Bioimaging and image processing problems are considered for vision control system designed to laser medicine.

LASER MEDICINE, BIOMATERIALS, LASER, PHOTOTHERMAL AND HYDRAULIC EFFECTS, SHLIEREN VISUALIZATION, DIGITAL IMAGE PROCESSING