

Fizikai Szemle

MAGYAR FIZIKAI FOLYÓIRAT

A Matematikai és Természettudományi Értesítőt az Akadémia 1882-ben indította
A Matematikai és Fizikai Lapokat Eötvös Loránd 1891-ben alapította

LXIII. évfolyam

10. szám

2013. október

A LÉZERES SZÓRÁSI INTERFERENCIA JELENSÉGÉNEK FELHASZNÁLÁSA SZÖVETI VÉRELLÁTÁS NAGY PONTOSSÁGÚ, KÖLTSÉGHATÉKONY MÉRÉSÉRE

Zölei-Szénási Dániel,^{1,3} Smausz Kolumbán Tomi,² Bari Ferenc,³ Domoki Ferenc,⁴ Hopp Béla¹

¹Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék, Szegedi Tudományegyetem

²MTA–SZTE Fotoakusztikus Kutatócsoport, Szegedi Tudományegyetem

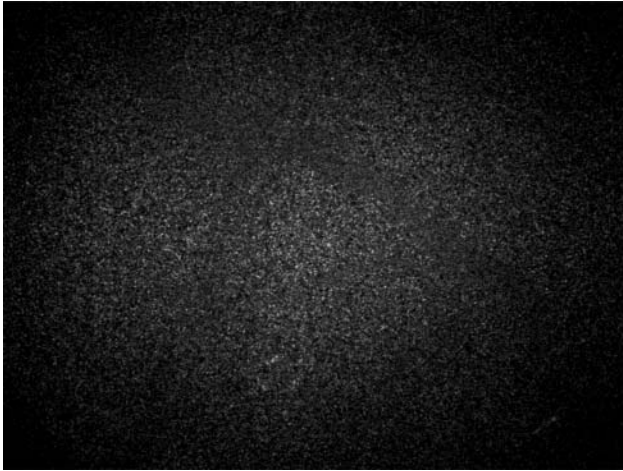
³Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet, Szegedi Tudományegyetem

⁴Élettani Intézet, Szegedi Tudományegyetem

Égési sérülést, transzplantációt (szervpótlást), leszádkadt végtag visszavarrását követően, illetve a bőrdaganatos elváltozásai vagy éppen előrehaladott cukorbetegség esetén rendkívül fontos lehet a bőr – egészen pontosan az erekkel átszőtt irha – vérellátásának gyors és pontos vizsgálata. Ezen esetekben sokszor olyan eszközre van szükség, ami a vizsgált – általában nagyobb – szövetterület vérellátását térképszerűen, viszonylag nagy tér- és időbeli felbontással képes megmutatni. A ma létező és ezeket a kritériumokat kielégítő, kereskedelmi forgalomban hozzáférhető eszközök nem nyújtanak kellő pontosságot a vizsgálat során, ami hibás diagnózishoz és a vizsgált szövet, végtag visszafordíthatatlan károsodásához vezethet.

Jelenleg a fentebb említett biológiai „minták” vérellátásának nem invazív (nem a szervezetbe hatoló eszközökkel történő) vizsgálata és egyes orvostudományi, véráramlással összefüggő alapkutatások során általában két optikai módszer adott: a hagyományos vagy a pásztázó lézer Doppler-rendszer alkalmazása. Mindkét eljárás nagy pontosságot biztosít, azonban korlátaik miatt általában kompromisszumokat kell kötni, amelyek veszélyeztethetik a mérés elvégzését, leronthatják annak pontosságát. Az első módszer igen jó időbeli felbontást ad, de csak néhány rögzített ponton, ahol is körülbelül 1 mm^3 térfogatban vizsgálható a szöveti perfúzió (a vér rendezetlen irányú haladása

a kapillárisokban). A pásztázó Doppler-rendszerekkel nagyobb testfelületek is megfigyelhetők, azonban egy-egy perfúzió- vagy áramlásterkép elkészítése több percig is eltarthat, amely idő alatt többször, akár jelentősen is megváltozhat a vizsgált szövet vérellátása, illetve mozgási műtermékek (artifaktumok) torzítják a mérési eredményeket. Ráadásul az utóbbi típusba tartozó eszközök beszerzési költsége meglehetősen magas. A lézer Doppler-rendszerek mellett ígéretes alternatívát jelenthetnek a lézeres szórási interferencia képalkotáson (*Laser Speckle Imaging*, LSI) vagy lézeres szórási interferencia kontrasztelemzésen (*Laser Speckle Contrast Analysis*, LASCA) alapuló eljárások, amelyeket már eredményesen alkalmaznak az agyfelszín, illetve a szemfenék vérellátásának vizsgálatára. Azonban a jelenleg kereskedelmi forgalomban elérhető ilyen eszközök nem biztosítják a lézer Doppler-eszközökkel összemérhető pontosságot, a mért és megjelenített eredmények torzulnak, ha a vizsgált szövet mozdulatlan, statikus szóró elemeket tartalmaz [1]. Márpedig ez a feltétel gyakran fennáll, különösen a többrétegű felépítéssel rendelkező bőr esetén. Írásunkban egy olyan szegedi fejlesztést mutatunk be, amely jelentősen megnöveli a LASCA-rendszerek pontosságát. Ez a költséghatékony technológia alkalmassá vált a bőr véráramlásának közel valós idejű vizsgálatára.



1. *ábra*. Altatott malac agyfelszínéről készített nyers szórási interferenciakép és az ez alapján számított kontrasztterkép. Az ereknél a kontraszt alacsonyabb, mint a környező szövetnél.

A lézeres szórási interferencia kontraszttelemzésen alapuló véráramlásmérés

Ha egy optikailag egyenetlen felületre koherens fény esik, és a felületről szóródó fotonokat egy ernyőn felfogjuk, jellegzetes szemcsés mintázatot láthatunk. A jelenség neve lézeres szórási interferencia. Hasonlót tapasztalhatunk akkor is, ha ernyő helyett egy leképező rendszert (például egy kamerát objektívvel) használunk, azonban ekkor a keletkező foltok kialakulását az optikai elemek is befolyásolják. Ugyanilyen szemcsés szerkezetű képet látunk, ha szabad szemmel figyeljük meg a lézerral megvilágított érdes felületet, amely esetben az interferenciakép a retinán alakul ki. Ha a lézerral megvilágított minta mozog, vagy mozgó elemeket tartalmaz (például áramló vörösvértesteket), akkor a szórási interferenciakép időben változik. Mivel a képek rögzítése során a kamera nem végtelenül rövid ideig exponál, a keletkező szórási interferenciakép elmosódottá válik: minél intenzívebb a mozgás (vagy minél hosszabb az expozíciós idő), annál elmosódottabbá válik a rögzített kép. Az 1. *ábra* felső képe egy altatott malac agyfelszínéről készült, nyers szórási interferenciaképet mutat. A szórási interferen-

ciakép egyik objektív statisztikai tulajdonsága a kontraszt, amelynek segítségével egyértelműen jellemezhető a kép elmosódottsága. A kontraszt az egyes képpontok intenzitásértékei szórásának és az átlagos intenzitás hányadosa:

$$K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle}.$$

Minél elmosódottabb a kép, annál alacsonyabb a kontraszt. Ezt mutatja az 1. *ábra* alsó képe, amely az előbbi területről készült 20 felvétel alapján számított kontrasztterképek átlaga. Ebben az esetben a kontrasztterképeket 5×5 képpont nagyságú ablakkal számítottuk ki és az ablakot 1 képpontonként léptettük vízszintes és függőleges irányban, hogy megkapjuk a kontrasztterképet. A kontrasztterképek átlagolására azért volt szükség, hogy csökkentjük a statisztikai zaj mértékét.

A kontraszt értéke alapján megbecsülhető az áramlási sebesség az adott területen, azonban közöttük az összefüggés nem lineáris. Ehelyett az átlagos sebesség az egyes képpontok által mutatott fényességértékek időbeli változásaihoz tartozó autokorrelációs idővel (τ , röviden korrelációs idő) fordítottan arányos, így a T expozíciós idő esetén mért K kontraszt értéke alapján függvényillesztéssel határozhatók meg a vizsgált szövet vérellátásában bekövetkező változások:

$$K^2(T) = \frac{1}{T} \int_0^T C^2(t) dt, \quad (1)$$

ahol $C(t)$ az egyes képpontok fényessége időbeli változásainak autokovarianciája, amely lorentzi sebességeloszlást feltételezve

$$C(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right),$$

valamint

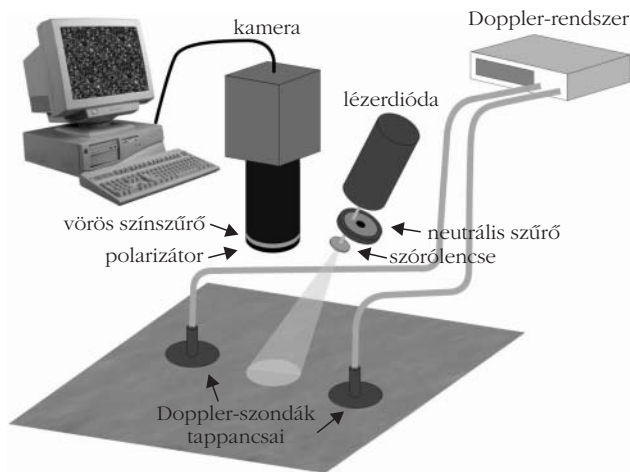
$$\lim_{T \rightarrow 0} K(T) = 1 \text{ és } \lim_{T \rightarrow \infty} K(T) = 0,$$

lásd [2].

A módszer kiterjesztése bőrfelületeken történő mérésekre

Valós méréseknél a kontraszt maximális értéke számos nem ideális körülmény következtében nagyon rövid expozíciós idő esetén sem érheti el az 1-et [3], sőt, statikus szóróelemek jelenléte mellett nagyon hosszú expozíciós idővel sem közelít a 0-hoz, hanem afölött marad. Feltételeztük, hogy a fentebb említett problémákra megoldást jelenthet több expozíciós idő és egy új, bővített formula alkalmazása. Ennek vizsgálatához egy alkalmas elrendezést kellett összeállítanunk, amelynek vázlatát a 2. *ábra* mutatja.

A modellkísérletek elvégzéséhez egy küvetát latex mikrogömbök 2 térfogatszázalék koncentrációjú szuszpenziójával töltöttünk meg, és egy részét $50 \mu\text{m}$ vastag



2. ábra. A mérések során alkalmazott elrendezés vázlata.

teflonfóliával takartuk le. Ezzel olyan szövetet imitáltunk, amelyben mozdulatlan szóróelemek is vannak. Mivel a teflonfóliával fedett területen számított kontrasztértékek nagy expozíciós idők esetén sem közelítik meg a 0-t, így egy módosított kontraszt – expozíciós idő összefüggést vezetünk be:

$$K^2(T) = P_1^2 \frac{\tau^2}{2 T^2} \left[\exp\left(-\frac{2 T}{\tau}\right) - 1 + \frac{2 T}{\tau} \right] + P_2^2, \quad (2)$$

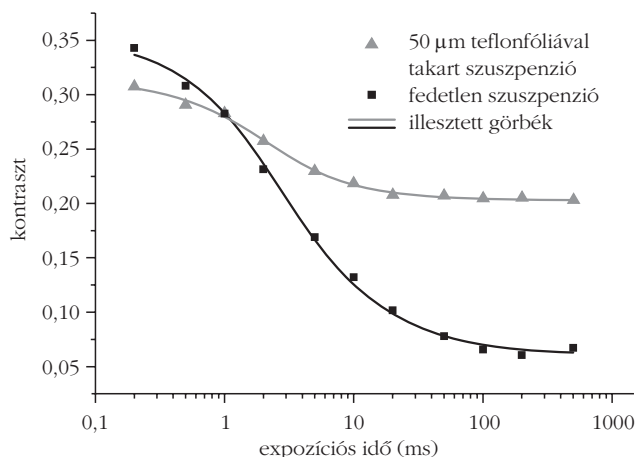
ahol

$$P_1^2 + P_2^2 = \lim_{T \rightarrow 0} K^2(T) \text{ és } P_2^2 = \lim_{T \rightarrow \infty} K^2(T);$$

itt P_1 a mozgó, míg P_2 a statikus szóróelemek hozzájárulását jellemzi a kialakult szórási interferenciaképhez. A (2) formula segítségével a $K(T)$ értékek alapján függvényillesztés segítségével feltérképezhetők a minta szórási tulajdonságai, és egyúttal meghatározható a minta mozgó elemeire jellemző valós korrelációs idő, ahogyan azt a 3. ábra is mutatja [4].

Bár a 3. ábra elkészítéséhez az expozíciós időt 0,2 és 500 ms között változtattuk, a legtöbb mérés esetén, amikor nagyobb területek megfigyelésére volt szükség,

3. ábra. 50 μm vastag teflonfóliával takart és fedetlen szuszpenzióról különböző expozíciós időkkel készült képek alapján számított kontrasztértékek és a (2) összefüggés alapján rájuk illesztett görbék.



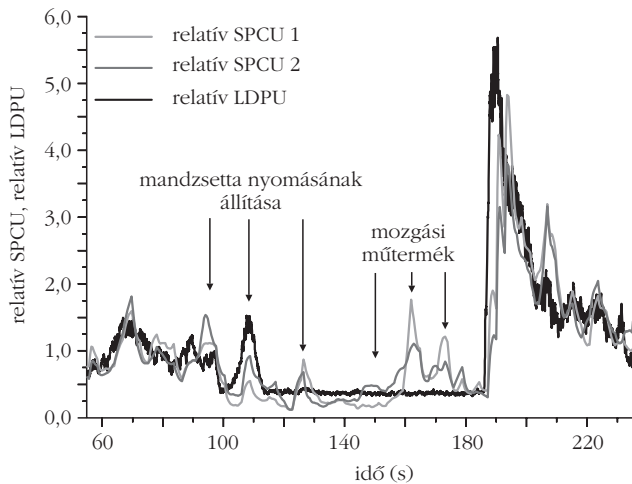
a kamera által látott megfelelő fényerősség biztosítása és a mérés időtartamának csökkentése érdekében 1, 2, 5, 10, 20, 50 és 100 ms-os expozíciós idők alkalmaztunk. Módszerünk segítségével sikeresen követtük a latex szuszpenzió áramlási sebességének változásait [5]. Velünk közel egy időben hasonló eredményre jutottak Parthasarathy és munkatársai [6], valamint Zakharov és munkatársai [7], azonban a két csoport által kidolgozott formulák az itt közölnél lényegesen bonyolultabbak, és a velük történő függvényillesztés nehézkes.

Munkánkat az emberi alkar fedő bőr vérellátásában bekövetkező változások vizsgálatával folytattuk. Megmutattuk, hogy az általunk kidolgozott eljárás segítségével bőr esetén a jelenleg elterjedten alkalmazott módszereknél megbízhatóbban becsülhető meg a hámló szövet vérellátásában bekövetkező változások posztokkluzív reaktív hiperémia (PORH, a végtag vérnyomásmérő mandzsettával történő elszorítása, majd fölengedése) során [8].

Az időbeli felbontás javítása

A fent bemutatott módszer segítségével végzett egyetlen mérés közel egy percre is elnyúlhat, mivel a kontrasztértékeket terhelő számottevő statisztikai zaj csökkentése érdekében minden expozíciós idő mellett legalább 5 képet kell rögzíteni. Ez ugyan vetekedhet a pásztázó Doppler-rendszerek időbeli felbontásával, azonban közel sem elegendő gyorsabb folyamatok nyomon követésére. Így egy, a területen még nem alkalmazott eljárás dolgoztunk ki a fényerő szabályozására, valamint a mintavételezésre és a valós idejű kiértékelésre.

A fejlesztés első lépéseként lehetővé kellett tenni, hogy az expozíciós időt és a hozzá tartozó fényerőt képről képre, néhány ezredmásodperc alatt lehessen változtatni. A lézerdióda folytonos meghajtó áramának változtatásával ez nem volt megoldható, mivel az ezzel járó módusugrások az interferenciaképek ugrásszerű változásait eredményezték, a célnak megfelelő elektrooptikai vagy akusztiooptikai modulátor [6] pedig nem állt rendelkezésünkre. Ennek érdekében egy rendkívül költséghatékony megoldást dolgoztunk ki, amely a mintát megvilágító lézer áramának kapcsolóüzemű szabályozásán alapult. A módszer lényege, hogy az egyes expozíciók azonos számú és azonos tulajdonságú felvillanásokból állnak, és az expozíciós időt a felvillanások között eltelt idő hangolásával lehet beállítani. A kamera integrációs idejét eközben állandó értéken lehet tartani, ami csökkenti a kamera nemlineáris tulajdonságai által okozott torzulásokat. Az optimális paraméterek feltérképezését követően elértük, hogy a kamera által érzékelt fény átlagos intenzitása jó egyezést mutasson minden expozíció során [9]. A fejlesztés második lépéseként egy új mintavételezési eljárást dolgoztunk ki. A mérés a gyakorlatban a következőképpen történt: kezdetben a rendszer minden expozíciós idő segítségével (1, 2, 5, 10, 20, 50 és 100 ms) 5 képet készített az előzetes kalibráció elvégzéséhez. Ezután a mérésekhez kiválasztott, például 5 ms-os expozíciós idő esetén ... – 5 – 0 – 5 – 1 – 5 – 2 –



4. ábra. A speckle- és a Doppler-rendszer által mutatott eredmények egy reprezentatív mérés során. A speckle-rendszert jelentősen megzavarhatja a vizsgált szövet elmozdulása, amelynek következtében mozgási műtermékek (artifaktumok) keletkezhetnek. Mivel a Doppler-szondák rögzítve voltak a vizsgált bőrfelszínhez, azok nem érzékenyek az elmozdulásra. Figyelemre méltó, hogy a felkarra helyezett vérnyomásmérő mandzsetta nyomásváltozásának hatása mindkét mérőrendszer eredményeiben megjelent, és a mozgási műtermékektől eltekintve jól egyeznek az eredmények. A speckle-rendszer két, a kezelő által kijelölt területet vizsgál egy szerre.

5 – 10 – 5 – 20 – 5 – 50 – 5 – 100 – ... ms ciklusokban rögzítette a képeket, ahol 0 ms a háttérvilágítás korrekcióját szolgáló kép volt. Ez lehetővé tette, hogy a mérőrendszer minden második, 5 ms-mal rögzített képet követően megadja a vizsgált területre jellemző reciprok korrelációs idő ($1/\tau$) értékét, a változó expozíciós idők segítségével pedig folyamatosan újrakalibrálja magát a minta szórási tulajdonságaiban bekövetkező esetleges változásoknak megfelelően. A mérésekhez kiválasztott (a fenti példában 5 ms hosszú) expozíciós idő megadása a minta tulajdonságai alapján történt úgy, hogy az expozíciós idő – kontraszt görbe inflexiós pontjának közelében legyen. Az általunk kifejlesztett fényerő-szabályozáson, illetve mintavételezési és kiértékelési eljáráson alapuló módszert PORH során teszteltük úgy, hogy egy hagyományos lézer Doppler-rendszerrel párhuzamos referenciamérést folytattunk. A lézer Doppler-rendszer által mutatott értékekre a továbbiakban LDPU (Laser Doppler Perfusion Unit), a LASCA-rendszer által nyújtott értékekre pedig SPCU (Speckle Contrast Perfusion Unit) néven fogunk hivatkozni. A mérés eredménye a 4. ábrán látható.

A mérőrendszer a jelen cikk írásának időpontjában másodpercenként 5 kép rögzítését tette lehetővé, így a perfúziós értékekre vonatkozó frissítési ráta ennek a fele, azaz 2,5 Hz volt. Kiválóan látszik, hogy az általunk fej-

lesztett rendszer reakcióideje megfelelőnek bizonyult a bőr perfúziójában bekövetkező viszonylag gyors változások követésére is, annak ellenére, hogy a Doppler-rendszer mintavételi frekvenciája körülbelül 25-ször nagyobb (64 Hz) az előbbiéénél.

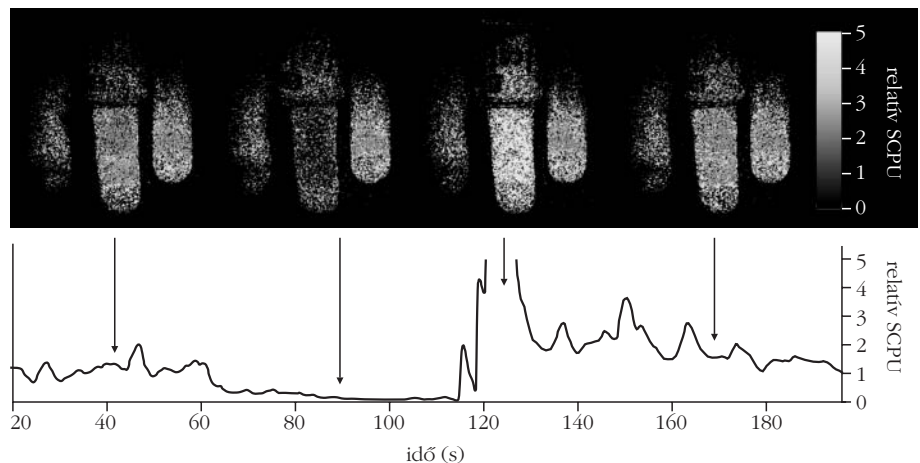
Egy hozzávetőleg 300×200 képpont felbontású (ami a kontrasztterképek felbontása) $1/\tau$ térkép meghatározása képpontról képpontra a fent leírt, függvényillesztésen alapuló módszer segítségével több órát venne igénybe, így a részletes áramlási térképek előállítására csak a mérések követően volt lehetőség. Ezért a fejlesztés harmadik lépéseként egy olyan, előre definiált értékeket tartalmazó táblázatokon alapuló közelítő eljárást dolgoztunk ki, amely lehetővé tette, hogy egy áramlásterkép előállítása egy napjainkban átlagosnak mondható, két processzormagos számítógépen csupán kevesebb, mint 0,2 másodperc alatt megtörténhessen. Ezáltal lehetővé vált, hogy a vizsgálatot végző személy már mérés közben a teljes vizsgált terület közel valós idejű perfúzió térképét is láthassa. Az 5. ábra egy emberi középső ujj elszorítása során készült filmfelvétel fontosabb eseményeinek egyes kockáit és az ujj átlagos perfúziós értékének grafikonját mutatja.

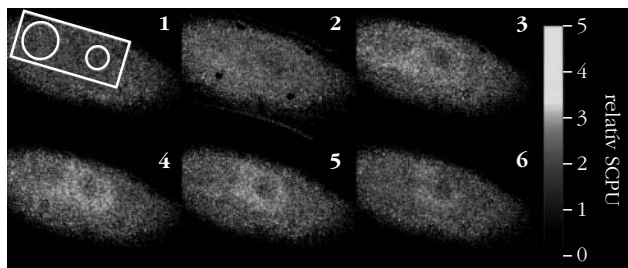
A 6. ábra az emberi alkart borító bőr véráramlási válaszát mutatja egy hideg tárggyal (egy optikai rögzítőelemmel, „dióval”, amelynek egyik furata szélesebb, mint a másik; a sziluettjét bejelöltük az első képkockán) való érintkezést követően. Szembetűnő, hogy csak ott reagált a bőr a hidegre, ahol ténylegesen érintkezett a tárggyal, míg a furatok helyén végig változatlan maradt a perfúzió.

Összegzés

Laboratóriumunkban egy olyan, közel valós idejű méréseket végrehajtó mérőrendszer fejlesztésén dolgozunk, amely alkalmas nagyobb szövetterületek vérrellátásának gyors, hatékony és megbízható vizsgálatára. Az eszköz további fejlesztése nyomán a mintavételi rátát a

5. ábra. Egy emberi középső ujj vérellátásának változása az újra helyezett mandzsetta felfűtése és leengedése hatására. Az ábra felső részén sebességtérképek láthatók, míg alsó részén sebességgrafikon mutatja a stimulált szövetben lévő perfúzió intenzitását. A nyilak a képek elkészültének időpontjait, illetve a görbe vonatkozó részeit mutatják.





6. ábra. Az alkart borító bőr véráramlási válasza egy hideg tárgy érintését követően. Az (1) kép a tárgy érintése előtt készült, ezen bejelöltük a tárgy helyét is. A (2) kép közvetlenül a tárgy elvételét követően készült, és a további képek a hiperémiás (alapszint fölé emelkedő) reakciót mutatják be.

kétszeresére kívánjuk növelni, míg a reakcióidőt a harmadára tervezzük csökkenteni. Ennek eredményeként a mérőrendszer az igen drága lézer Doppler-rendszerek pontosságát tudná nyújtani a hagyományos LASCA-rendszerek térbeli felbontásával, ugyanakkor megközelítve azok időbeli felbontását. Egy ilyen eszköz különösen hasznos lenne a bőrgyógyászatban, például égési sérülések, cukorbetegség szövődményeinek, vagy éppen a bőr rákos elváltozásainak vizsgálata során. Mivel munkánk alatt végig arra törekedtünk, hogy a lehető legköltséghatékonyabb megoldásokat és újításokat alkalmazzuk úgy, hogy az eredmények minősége semmiképpen se romoljon, így egy, az általunk kidolgozott módszereken alapuló orvosi mérőeszköz viszonylag alacsony költségen lenne előállítható.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnénk köszönetet mondani „Az SZTE Kutatóegyetemi Kiválósági Központ tudásbázisának kiszélesítése és hosszú távú szakmai fenntarthatóságának megalapozása a kiváló tudományos

utánpótlás biztosításával” (TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012), az „Impulzuslézerek alkalmazása az anyagtudományban és a biofotonikában” (TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0060), a „Környezeti tényezők és genetikai faktorok interakciójának vizsgálata immunmediált és daganatos betegségek kialakulásában” (TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035) projekteknek, valamint az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramoknak (OTKA F-67816) a kutatás anyagi hátterének biztosításához. Domoki Ferenc köszönetet mond a Magyar Tudományos Akadémiának a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj formájában nyújtott támogatásáért.

Irodalom

1. C. J. Stewart, R. Frank, K. R. Forrester, J. Tulip, R. Lindsay, R. C. Bray: A comparison of two laser-based methods for determination of burn scar perfusion: laser doppler versus laser speckle imaging. *Burns* 31/6 (2005) 744.
2. A. F. Fercher, J. D. Briers: Flow visualization by means of single-exposure speckle photography. *Opt. Commun.* 37/5 (1981) 326.
3. R. Bandyopadhyay, A. S. Gittings, S. S. Suh, P. K. Dixon, D. J. Durian: Speckle-visibility spectroscopy: a tool to study time-varying dynamics. *Rev. Sci. Instrum.* 76 (2005) 093110.
4. T. Smausz, D. Zölei, B. Hopp: Real correlation time measurement in laser speckle contrast analysis using wide exposure time range images. *Appl. Opt.* 48/8 (2009) 1425.
5. T. Smausz, D. Zölei, B. Hopp: Determination of real correlation time and calibration in laser speckle contrast analysis. *Book of abstracts of 16th Int. Conf. on Advanced Laser Technologies 2008* (2008) ISBN 978-963-06-5737-2, LaserSkill Ltd.
6. A. B. Parthasarathy, W. J. Tom, A. Gopal, X. Zhang A. K. Dunn: Robust flow measurement with multi-exposure speckle imaging. *Opt. Express* 16/3 (2008) 1975.
7. P. Zakharov, A. C. Völker, M. T. Wyss, F. Haiss, N. Calcinaghi, C. Zunzunegui, A. Buck, F. Scheffold, B. Weber: Dynamic laser speckle imaging of cerebral blood flow. *Opt. Express* 17/16 (2009) 13904.
8. D. Zölei, T. Smausz, B. Hopp, F. Bari: Multiple exposure time based laser speckle contrast analysis: demonstration of applicability in skin perfusion measurements. *Photonics and Optoelectronics* 1/2 (2012) 28.
9. T. Smausz, D. Zölei, B. Hopp: Laser power modulation with wavelength stabilization in multiple exposure laser speckle contrast analysis. *Proc. of SPIE* 8413 (2012) 84131J.