



УДК 591.473.088.5:66.088+57.087.1:004

## ДЕЯКІ АСПЕКТИ ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ М'ЯЗОВОЇ ТКАНИНИ *IN VITRO* МЕТОДОМ ПРОСТОРОВО-ЧАСОВОЇ КОРЕЛЯЦІЇ СПЕКЛІВ

**М. І. Березюк<sup>1,3</sup>, О. П. Максименко<sup>2</sup>, В. І. Ткаченко<sup>3</sup>, Д. І. Санагурський<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

<sup>2</sup>Фізико-механічний інститут ім. Г. В. Карпенка НАН України  
вул. Наукова, 5, Львів 79060, Україна

<sup>3</sup>Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів  
і кормових добавок, вул. Донецька, 11, Львів 79019, Україна  
e-mail: nberezyuk@yandex.ru

Під час освітлення низькоінтенсивним лазерним випромінюванням м'язової тканини, в результаті випадкової зміни фази відбитих і заломлених хвиль на структурних елементах біооб'єкта спостерігається багатопроменева інтерференція і формуються просторові динамічні поля – біоспекли. Автолітичні процеси після забою тварин зумовлюють зміни структурних елементів м'язової тканини на різних рівнях її організації. Встановлено, що ці зміни впливають на просторово-часові властивості біоспеклів, їхню динаміку. Розроблена експериментальна установка і програмне забезпечення дають змогу досліджувати цифрові спекл-зображення взірців м'язової тканини за допомогою методу просторово-часової кореляції спеклів. Для інтегральної оцінки змін м'язової тканини *in vitro* від часу зберігання запропоновано розраховувати коефіцієнт активності біоспеклів. У ході досліджень було встановлено, що зменшення КАБ прямопропорційне часові зберігання взірців. Це може свідчити про сповільнення фізико-хімічних процесів у м'язовій тканині. Отримані результати плануємо використати для розробки методів неруйнівого контролю та оцінки структури м'язової тканини *in vitro*.

**Ключові слова:** м'язова тканина, біоспекли, просторово-часова кореляція спеклів.

### ВСТУП

М'язова тканина складається з елементів, здатних до скорочення, завдяки чому вона бере участь у виконанні важливих фізіологічних функцій, таких як рух, підтримання положення тіла, кровообіг, дихання тощо. Основною структурно-функціональною одиницею скелетної (посмугованої) м'язової тканини є м'язове волокно. Відомо, що після забою тварин відбуваються автолітичні процеси розпаду структурних елементів цієї тканини під впливом ендо- та екзогенних чинників.

Вивчення цих змін має важливе науково-практичне значення, зокрема з метою контролю якості м'яса та м'ясопродуктів і тому залишається предметом інтенсивних досліджень, у тому числі за допомогою сучасних біофізичних методів [7]. Останнім часом особливий інтерес становлять методи аналізу біоспеклів [2, 8].

Відомо, що в результаті взаємодії низькоінтенсивного лазерного випромінювання із поверхнею та приповерхневими шарами біологічних об'єктів унаслідок випадкової інтерференції множини світлових хвиль у просторі спостереження формуються динамічні спекл-структури або біоспекли [1, 8]. Різноманітні фізико-хімічні процеси призводять до зміни оптичних властивостей відповідних компонентів живої системи, що відображається у просторово-часовій зміні інтерференційного поля, яке візуально проявляється у вигляді мерехтіння біоспеклів [9].

Ці зміни можна якісно і кількісно оцінити, використовуючи спеціальні методи аналізу спекл-зображень (або їх фрагментів), отриманих у цифровому вигляді. Завдяки безконтактності і простоті технічної реалізації вимірювання динаміки біоспеклів, технології та методи спекл-метрології є особливо зручними у медико-біологічних дослідженнях. Зокрема, їх широко використовують під час визначення швидкості й параметрів мікроциркуляції крові *in vivo* [5, 8]. За допомогою феномена біоспеклів вивчають життєздатність насіння рослин [4], ураження його паразитними грибами [4, 6] тощо.

У Фізико-механічному інституті НАН України розроблено метод дослідження динамічних спекл-структур на основі аналізу часових залежностей зміни значень коефіцієнта крос-кореляції спекл-зображень, який дає змогу досліджувати просторово-оптичні характеристики біооб'єктів. За даним методом коефіцієнт крос-кореляції фрагментів  $C_{m,n}^{k+l}$  двох спекл-зображень обчислюється так [1]:

$$C_{m,n}^{k+l} = \left| \frac{\langle (S_{ij}^k - \langle S_{ij}^k \rangle) \cdot (S_{ij}^{k+l} - \langle S_{ij}^{k+l} \rangle) \rangle}{\sigma_{ij}^k \cdot \sigma_{ij}^{k+l}} \right|, \quad (1)$$

де  $i, j$  – номер пікселя у  $m, n$ -му фрагменті цифрового спекл-зображення;  $i = 1, \dots, I$ ;  $j = 1, \dots, J$ ;  $m = 1, \dots, M$ ;  $n = 1, \dots, N$ ;  $S_{ij}$  – інтенсивність  $i, j$ -го пікселя;  $k$  – номер першого спекл-зображення,  $k+l$  – номер наступного спекл-зображення;  $\sigma_{ij} = \sqrt{\langle (S_{ij} - \langle S_{ij} \rangle)^2 \rangle}$  – середньоквадратичне відхилення;  $\langle \rangle$  – операція усереднення значень за кількістю пікселів у фрагменті зображення.

Даний метод використовували для оцінки ступеня стиглості овочів і фруктів, а також вибору оптимальних умов їх зберігання [1, 2, 11].

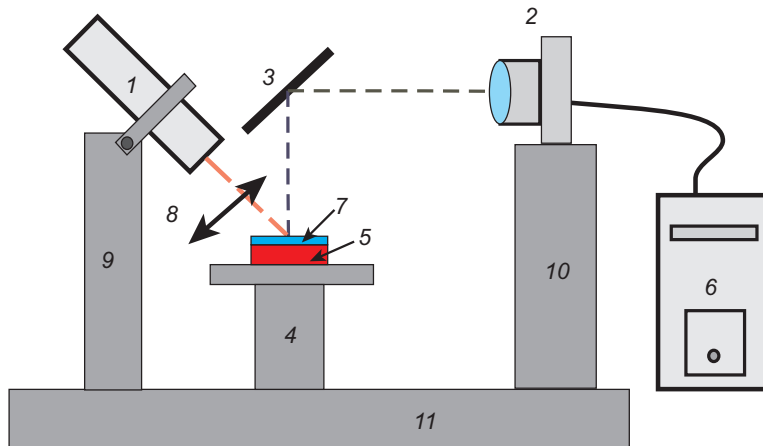
Мета нашої роботи полягає у вивченні динаміки біоспеклів м'язової тканини за допомогою методу просторово-часової кореляції спеклів.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Одними із найпоширеніших видів свійських тварин є курка та свиня домашня. Тому експерименти проводили, використовуючи м'язову тканину курей-бройлерів (середня маса 3,5–4 кг) та поросяти (маса приблизно 25 кг), яких утримували у стаціонарних умовах віварію. Евтаназію тварин здійснювали під ефірним наркозом і одержані від них зразки стегового м'яза використовували в подальших дослідженнях. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України „Про захист тварин від жорстокого поводження”.

Умови формування лазерних біоспеклів м'язової тканини викликали потребу модифікувати схему реєстрації зображень і алгоритм їх обробки, які запропоновані раніше [1]. Для проведення досліджень ми розробили нову установку для реєстрації спекл-зображень, схему якої наведено на рис. 1. Для збільшення інтенсивності розсіяного випромінювання зрізки освітлювали вузьким лазерним променем (діаметр приблизно 1 мм).

Під час дослідження біоспеклів м'язової тканини використовували He-Ne лазер ЛГН-207 потужністю 1,5 мВт ( $\lambda=630$  нм). Щоб зменшити вплив лазерного випромінювання, зрізки м'язової тканини освітлювали тільки під час реєстрації зображень. Для цього використовували оптичний затвор – 8, який синхронно відкривався з моментом початку реєстрації зображень. Серію зображень поверхні м'язової тканини у місці падіння лазерного променя реєстрували цифровою відеокамерою з інтервалом 1 с протягом 30 с. Отримані зображення зберігали на жорсткий диск комп'ютера, які пізніше обробляли за допомогою спеціально розробленої програми в середовищі MATLAB.

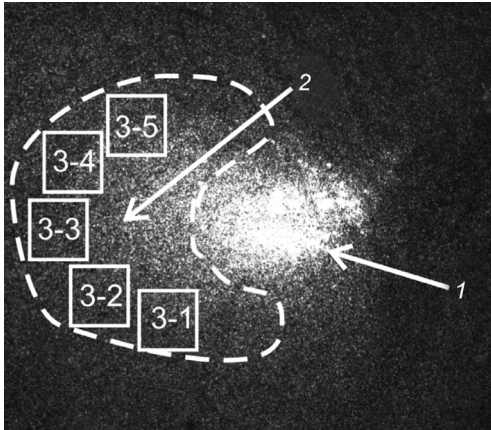


**Рис. 1.** Схема установки для реєстрації біоспеклів м'язової тканини: 1 – лазер; 2 – цифрова відеокамера з об'єктивом; 3 – дзеркало; 4 – предметний столик; 5 – зрізек м'язової тканини в кюветі; 6 – персональний комп'ютер з програмним забезпеченням; 7 – предметне скельце; 8 – оптичний затвор; 9, 10 – штативи; 11 – оптична лава

**Fig. 1.** Scheme of the device for registration of skeletal muscle biospeckles: 1 – laser; 2 – CCD camera; 3 – mirror; 4 – stage; 5 – sample of skeletal muscle in cuvette; 6 – PC with appropriate software; 7 – cover glass; 8 – optical shutter; 9, 10 – supports; 11 – optical bench

Під час експерименту відпрепаровані зрізки м'язової тканини, які зберігали у холодильній камері, поміщали у кювету 5, яку встановлювали на предметний столик 4. Перед реєстрацією спекл-зображень їх накривали предметним скельцем і витримували 5–7 хв при кімнатній температурі. Зрізки освітлювали сфокусованим лазерним променем, який спрямовували під кутом  $45^\circ$  до напрямку спостереження. За допомогою дзеркала 3 і об'єктива на чутливій матриці відеокамери 2 формувалося зображення поверхні м'язової тканини в околі взаємодії лазерного випромінювання з об'єктом (рис. 2).

Спочатку реєстрували спекл-зображення двох зрізків м'язової тканини курки через 3–4 год після забою. Через 24 год для першого зрізка та через 48 год для другого провели повторні вимірювання. Протягом усього цього часу зрізки м'язової тканини



**Рис. 2.** Фотографія поверхні м'язової тканини: 1 – місце падіння лазерного променя; 2 – область формування розвинутих біоспеклів, (3–1,...,3–5) – фрагменти, які використовували для розрахунку функції просторово-часової кореляції

**Fig. 2.** Photo of the skeletal muscle surface: 1 – the reflection place of laser beam; 2 – the region of developed biospeckles, (3–1,...,3–5) – fragments that were used for the calculation of the function of spatio-temporal correlation

курки зберігали при температурі  $+4^{\circ}\text{C}$  в холодильній камері. У випадку м'язової тканини свині, яка зберігалася за тих самих умов, реєстрацію зображень проводили відповідно через 28 та 72 год. Реєстрацію спекл-зображень взірців м'язової тканини свині, які зберігалися при температурі  $-4^{\circ}\text{C}$ , були проведені через 28, 72 та 144 год після забою. Обрані температури відповідають умовам зберігання свіжого м'яса протягом кількох діб, які забезпечують холодильні установки в побуті й закладах торгівлі.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Значення коефіцієнтів крос-кореляції між першим (вихідним) зображенням  $k$  та всіма наступними  $l = 1, \dots, 30$  розраховували за виразом (1), для кожної пари відповідних фрагментів  $m, n = (3-1, \dots, 3-5)$ . При цьому для кожної пари відповідних фрагментів отримували послідовність значень  $C_{m,n}^{k+l}$ , які характеризують зміни коефіцієнта крос-кореляції  $C(t)$  за час вимірювання  $t = l \cdot dt$  у вибраному фрагменті зображення, де  $dt$  – інтервал часу між двома зареєстрованими зображеннями. На рис. 3 наведено графік залежності зміни значень коефіцієнта крос-кореляції для одного з фрагментів спекл-зображення в часі.

Як видно з наведеного графіка, метод аналізу динамічних спекл-структур виявився дуже чутливим до процесів, які відбуваються у м'язовій тканині. Навіть протягом кількох секунд спостерігаються значні зміни значень коефіцієнта крос-кореляції.

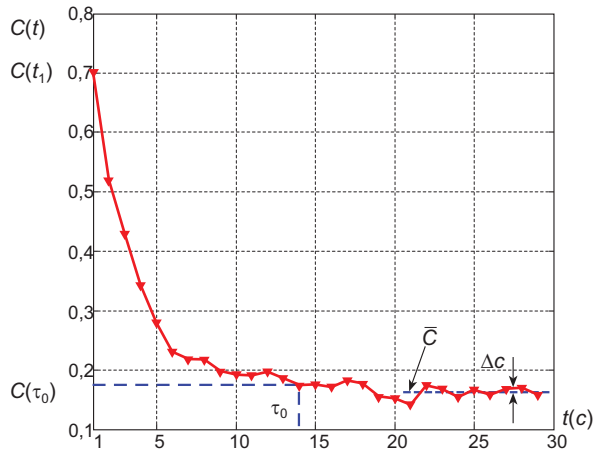
Аналізуючи отримані залежності зміни значень крос-кореляційного коефіцієнта від часу, для різних взірців м'язової тканини курки та свині встановлено ряд характерних інформаційних параметрів. Цими параметрами є величина, на яку змінюється коефіцієнт крос-кореляції від максимального значення до деякого залишкового постійного рівня, інтервал часу  $\tau_0$ , за який проходять ці зміни, залишкове значення коефіцієнта крос-кореляції  $C(\tau_0)$  та значення коефіцієнта крос-кореляції після першої секунди  $C(t_1)$  (рис. 3). Використовуючи ці параметри, ми запропонували для інтегральної оцінки фізико-хімічних змін, які відбуваються під час зберігання м'язової тканини, розраховувати певну величину, яка характеризує зміни значень коефіцієнта крос-кореляції за час  $\tau_0$ , і умовно назвали її коефіцієнтом активності біоспеклів (КАБ)

$$\text{КАБ} = \frac{C(t_1) - C(\tau_0)}{\int_{t_1}^{\tau_0} C(t) \cdot dt}, \quad (2)$$

де  $C(t_i)$  – значення коефіцієнта крос-кореляції через інтервал часу  $dt$  (у наших експериментах  $dt = 1$  с);  $C(\tau_0)$  – значення коефіцієнта крос-кореляції через інтервал часу  $\tau_0$ .

**Рис. 3.** Графік залежності коефіцієнта крос-кореляції від часу

**Fig. 3.** Chart of the cross-correlation coefficient in time dependence



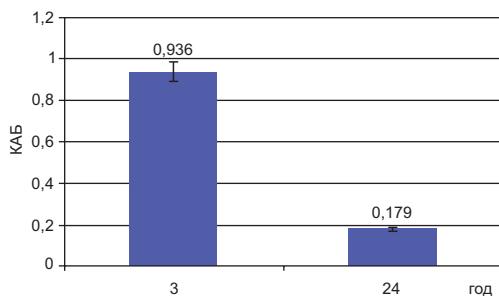
Для кількісного оцінювання  $\tau_0$  і  $C(\tau_0)$  потрібно визначити постійний залишковий рівень, при якому змінами значення коефіцієнта крос-кореляції можна нехтувати (коли ці зміни перебувають у межах похибки вимірювання). Для розрахунку цього рівня ми визначали середнє значення коефіцієнта крос-кореляції за останні 5 секунд вимірювання  $\bar{C} = [C(26) + \dots + C(30)] / 5$  і додавали до нього подвійне значення максимального відхилення  $\Delta c$  від цього середнього:

$$C(\tau_0) = \bar{C} + 2 \cdot \Delta c. \quad (3)$$

Знаменник у виразі (2) розраховували, інтегруючи отримані числові значення коефіцієнта крос-кореляції за методом трапецій. Використовуючи вирази (1) і (2), з урахуванням (3), проведено розрахунки усередненого за фрагментами 3–1, ..., 3–5 значення КАБ і межі відхилення від середнього значення для зрізків м'язової тканини курки та свині, які представлені на рис. 4–7.

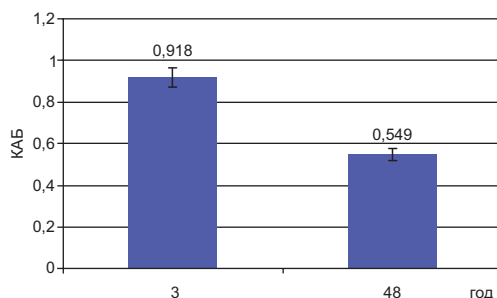
Під час досліджень було встановлено, що розраховані значення КАБ для різних фрагментів одного зображення (рис. 2) дещо відрізняються, що свідчить про просторову неоднорідність процесів, які відбуваються в м'язовій тканині. Також з отриманих даних чітко видно зменшення середнього значення КАБ з часом для усіх зрізків, що зберігали при  $+4^\circ\text{C}$  (рис. 4–6). Подібну картину спостерігаємо і для зрізків м'язової тканини свині (стегновий м'яз) при  $-4^\circ\text{C}$  (рис. 7). Ми вважаємо, що зменшення величини КАБ прямо пропорційне часу її зберігання та вказує на зниження інтенсивності фізико-хімічних процесів у м'язовій тканині *in vitro*.

Встановлено, що значення коефіцієнта крос-кореляції спекл-зображень біооб'єктів зменшується у часі та прямує до деякого постійного рівня унаслідок різноманітних фізико-хімічних процесів життєдіяльності. Автолітичні процеси після забою тварин зумовлюють специфічні зміни структурних елементів м'язової тканини на різних рівнях її організації. Пусковим механізмом для цілого ряду фізико-хімічних і біохімічних процесів є ферментативний розпад глікогену й АТФ. У результаті збільшення вмісту фосфорної, молочної, пірвіноградної кислот відбувається спад рН до 5,8–5,6.



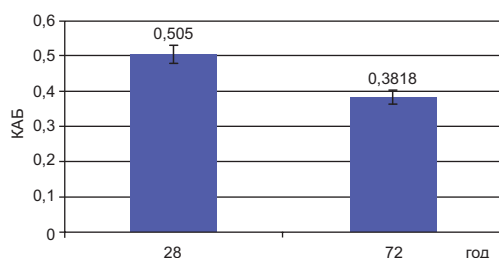
**Рис. 4.** Зміна КАБ м'язової тканини курки (взірець I), яка зберігалася за температури +4°C

**Fig. 4.** BAC changes of chicken skeletal muscle (sample I), which was kept at +4°C



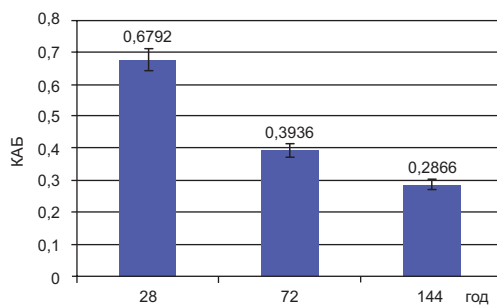
**Рис. 5.** Зміна КАБ м'язової тканини курки (взірець II), яка зберігалася за температури +4°C

**Fig. 5.** BAC changes of chicken skeletal muscle (sample II), which was kept at +4°C



**Рис. 6.** Зміна КАБ взірця м'язової тканини свині, який зберігався за температури +4°C

**Fig. 6.** BAC changes of pig skeletal muscle sample, which was kept at +4°C



**Рис. 7.** Зміна КАБ взірця м'язової тканини свині, який зберігався за температури -4°C

**Fig. 7.** BAC changes of pig skeletal muscle sample, which was kept at -4°C

Зниження рН і руйнування лізосомальних мембран викликає активацію внутрішньоклітинних ферментів – катепсинів. При цьому виникають умови для протеолітичного гідролізу м'язових білків. Крім цього, за наявності  $\text{Ca}^{2+}$  м'язова протеаза зумовлює дезінтеграцію структур міофібрил у ділянці Z-лінії. Під впливом ферментів і утворених під час розпаду АТФ легко відщеплюваних фосфатів поступово відбувається дисоціація актоміозинового комплексу. Крім того, білки також зазнають суттєвих конформаційних змін, які зумовлюють їхні агрегаційні взаємодії. Відбувається набухання колагену сполучної тканини. Поступово накопичуються продукти ферментативного розпаду білків і пептидів, нуклеотидів, вуглеводів, ліпідів, а також креатину, креатиніну та інших азотистих екстрактивних речовин, зокрема біогенних амінів (кадаверину, тираміну та ін. [10]) тощо. Швидкість перебігу цих змін, в основному, залежить від температури: із її збільшенням процеси автолізу відбуваються швидше, зі зменшенням – навпаки.

Вплив електролітів і розпад ліпідів призводять до порушення цілісності внутрішньоклітинних і клітинних мембран, що зумовлює перерозподіл іонів і рідини. Отже, фізико-хімічні процеси розпаду клітинних компонентів, сполучної тканини, а також вплив мікроорганізмів зумовлюють зміни як оптико-геометричної структури поверхні, так і приповерхневих шарів (розподілу та природи розсіювачів світла)

м'язової тканини з часом. Це, у свою чергу, впливає на просторово-часові (динамічні) властивості біоспеклів. Як уже було зазначено, динаміку спекл-зображень у часі можна кількісно оцінювати за допомогою крос-кореляційного коефіцієнта [1].

Нами показано, що існує обернена залежність динаміки змін біоспеклів м'язової тканини від часу  $\tau_0$ , за який значення крос-кореляційного коефіцієнта змінюється від максимального  $C(t_1)$  до деякого постійного рівня  $C(\tau_0)$ , і пряма залежність від різниці значень крос-кореляційного коефіцієнта  $C(t_1) - C(\tau_0)$ . Кількісним показником інтенсивності фізико-хімічних процесів у м'язовій тканині може слугувати величина КАБ, тобто чим інтенсивніше відбуваються ці процеси в біооб'єкті, тим більше значення КАБ.

1. Франкевич Л.Ф., Максименко О.П., Муравський Л.І. Дослідження біоспеклів методом просторово-часової спекл-кореляції. **Відбір і обробка інформації**, 2005; 23(99): 117–121.
2. Adamiak A., Zdunek A., Kurenda A. et al. Application of the biospeckle method for monitoring bull's eye rot development and quality changes of apples subjected to various storage methods – preliminary studies. **Sensors**, 2012; 12(3): 3215–3227.
3. Aizu Y., Asakura T. Bio-speckle phenomena and their application to the evaluation of blood flow. **Opt. Las. Tech.**, 1991; 23: 205–219.
4. Arizaga R., Cap N., Rabal H. et al. Activity image in dynamical speckle. **Third Iberoamerican Optics Meeting, Proceeding SPIE 3572**. 1999; 310–314.
5. Boas D. A., Dunn A. K. Laser speckle contrast imaging in biomedical optics. **J. Biomed. Opt.**, 2010; 15(1): 011109–011112.
6. Braga R. A., Dal Fabbro I. M., Borem F. M. et al. Assessment of seed viability by laser speckle techniques. **Biosystems engineering**, 2003; 86(3): 287–294.
7. Damez J.-L., Clerjon S. Meat quality assessment using biophysical methods related to meat structure. **Meat Science**, 2008; 80: 132–149.
8. Draijer M., Hondebrink E., van Leeuwen T. et al. Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion. **Lasers Med. Sci.**, 2009; 24(4): 639–651.
9. Jinior R., Silva B., Rabelo G. et al. Reliability of biospeckle image analysis. **Optical Engineering**, 2006; 45: 390–395.
10. Vinci G., Antonelli M.L. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. **Food Control**, 2002; 13: 519–524.
11. Zdunek A., Muravsky L., Frankevych L. et al. New nondestructive method based on spatial-temporal speckle correlation technique for evaluation of apples quality during shelf-life. **Int. Agrophysics**, 2007; 21(3): 305–310.

## SOME ASPECTS OF STUDYING OF MUSCLE TISSUE *IN VITRO* BY SPATIO-TEMPORAL CORRELATION OF SPECKLES

**M. I. Berezyuk<sup>1,3</sup>, O. P. Maksymenko<sup>2</sup>, V. I. Tkachenko<sup>3</sup>, D. I. Sanahurskyi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

<sup>2</sup>Karpenko Physical-Mechanical Institute of the NAS of Ukraine, 5, Naukova St., Lviv 79060, Ukraine

<sup>3</sup>State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Preparations and Feed Additives  
11, Donetska St., Lviv 79019, Ukraine  
e-mail: nberezyuk@yandex.ru

The skeletal muscle illumination by a low power laser radiation, as a result of the random phase change of reflected and refracted waves, the multiple interference ray is observed on the structural elements of biological object and a developed spatial dynamic field which are called biospeckles, is formed. Autolytical processes after animals

slaughter cause changes in the structural elements of skeletal muscle at various levels of its organization. It was found that these changes affect the spatial and temporal properties of biospeckles and their dynamics. The experimental setup and software were developed. They allow to investigate the digital speckle photos of skeletal muscle samples by means of time-temporal correlation speckles method. For integrated assessment of changes in skeletal muscle *in vitro* depending on the time of storage calculation of the biospeckle activity coefficient ion is proposed. During the research it was found that the decrease of BAC is directly proportional to the storage time of models. This may indicate a slowdown of physical and chemical processes in the skeletal muscle. The results can be used for developing the methods of nondestructive testing and evaluation of the skeletal muscle structure *in vitro*.

**Keywords:** skeletal muscle, biospeckles, spatio-temporal correlation of speckles.

## НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ *IN VITRO* МЕТОДОМ ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННОЙ КОРРЕЛЯЦИИ СПЕКЛОВ

Н. И. Березюк<sup>1,3</sup>, О. П. Максименко<sup>2</sup>, В. И. Ткаченко<sup>3</sup>, Д. И. Санагурський<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

<sup>2</sup>Физико-механический институт имени Г. В. Карпенко НАН Украины  
ул. Научная, 5, Львов 79060, Украина

<sup>3</sup>Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок, ул. Донецкая, 11, Львов 79019, Украина  
e-mail:nberezyuk@yandex.ru

При освещении низкоинтенсивным лазерным излучением мышечной ткани, в результате случайного изменения фазы отраженных и преломленных волн на структурных элементах биообъектов наблюдается многолучевая интерференция и формируются пространственные динамические поля – биоспеклы. Автолитические процессы после убоя животных обуславливают изменения структурных элементов мышечной ткани на различных уровнях ее организации. Установлено, что эти изменения влияют на пространственно-временные свойства биоспеклов, их динамику. Разработанная экспериментальная установка и программное обеспечение позволяют исследовать цифровые спекл-изображения образцов мышечной ткани с помощью метода пространственно-временной корреляции спеклов. Для интегральной оценки изменений мышечной ткани *in vitro* от времени хранения предложено рассчитывать коэффициент активности биоспеклов. В ходе проведенных исследований было установлено, что уменьшение КАБ прямо пропорционально времени хранения образцов. Это может свидетельствовать о замедлении физико-химических процессов в мышечной ткани. Полученные результаты планируем использовать для разработки методов неразрушающего контроля и оценки структуры мышечной ткани *in vitro*.

**Ключевые слова:** мышечная ткань, биоспеклы, пространственно-временная корреляция спеклов.

Одержано: 21.12.2012