



Lazer Görüntüleme ile Tavuk Embriyolarının Kalp Atım Hızının Ölçülmesi Chicken Embryo's Heart Rate Measurements by Laser Imaging

Doç. Dr. Mehmet Engin

Elektrik ve Elektronik Mühendisliği Bölümü, EGE Üniversitesi, İzmir, Türkiye
mehmet.engin@ege.edu.tr

Özetçe — Kalp atım hızı; tüm organizmalara ait, metabolizma ve kan dolaşımının gelişmesi açısından önemlidir. Gelişmekte olan tavuk embriyosunun kalp atım hızı ve kan akışı gibi yaşamsal parametrelerini görüntülemek, kuluçka evresinde dölleme programları için çok faydalıdır. Özellikle yapay kuluçka koşulları için, erken dönemde yumurtaların canlı kalması bakımından pratik öneme sahiptir. Bu çalışmada, lazer beneklenme zıtlık analizi (LBZA) tabanlı optik yöntemi, erken kuluçka evresinde tavuk embriyolarının kalp atım hızı değerlerinin görüntülenmesi için önerilmektedir. Bu uygulama, rutin embriyonik değerlendirme için basitliği ve verimliliği sayesinde, uygulamadaki örneklerden farklılık göstermektedir. Görüntü dizilerinden üretilen beneklenme zıtlık değerlerinin Welch Spektrel Analizi ile kalp atım hızı elde edilmektedir. Elde edilen sonuçlardan; önerilen yöntemin tüm kanatlılar için kullanılabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler — Tavuk embriyosu, kalp atım hızı ölçümü, lazer beneklenme zıtlığı, biyomedikal optik görüntüleme.

Abstract — The heart-rate may be important from point of view of development of whole organism and its metabolism, of circulation. Monitoring the vital signs, such as heart-rate and blood flow, of a developing chicken embryo is very useful at incubation stages for breeding programs. Especially for artificial incubation conditions, confirmation of fertilization and survival of eggs at early stage, are of practical importance. In this paper, an optical method based on laser speckle contrast analysis has been developed to monitor heart-rate values of chicken embryos at early incubation stage. With advantage of simplicity and efficiency of this method, it can be a proper and different from that of literature, for routine embryonic assessment. We can determine heart-rate value using speckle-contrast data from image sequence and Welch Spectral Analysis. It is shown that the proposed system can be used for heart-rate based monitoring of the embryonic development of fertilized chicken and other avian types.

Keywords — Chicken embryo, heart rate measurement, laser speckle contrast, biomedical optical imaging.

I. GİRİŞ

Son dönemlerde, optik görüntüleme yöntemleri, klinik ve araştırma alanlarında insan ve hayvan dokularının özellikle girişimsel olmayan (non-invasive), yüksek uzamsal ve zamana bağlı çözünürlüklü dinamik görüntülenmesinde önemli bir potansiyele sahiptir [1]. Dolaşım sistemi yetersizliklerinin yol açtığı kararsız kan dolaşımı hayvan ve insanlarda etkili olmaktadır [2]. Kalp atım hızı; tüm organizmaya ait, metabolizma ve kan dolaşımının gelişmesi açısından önemli bir göstergedir [3]. Gelişmekte olan tavuk embriyosunun kalp atım hızı ve kan akışı gibi yaşamsal değişkenleri görüntülemek, kuluçka evresinde dölleme programları için çok faydalıdır [4]. Özellikle yapay kuluçka koşulları için, erken dönemde yumurtaların canlı kalması ve aşılamanın sağlanması, kuluçkalama olanaklarından tam faydalanmak için pratik önem taşır. [4]. Araştırma alanında, tavuk embriyolarının kalp atım hızı bilgisinin belirlenmesinde kullanılan girişimsel ve girişimsel olmayan (invasive ve non-invasive) yöntemler geliştirilmektedir [3,4,5,6,7]. Bununla birlikte, yumurta kabuğuna iğne ile girişim gibi girişimli ya da minimal tabanlı kalp atım hızı görüntülenmesi yüksek risk içerebilir.

Diğer taraftan, Mikro Manyetik Rezonans, Optik Uyumluluk (Coherence) Tomografi ve Lazer Doppler sistemler, büyük ölçüm düzeneklerine ve ölçümler için iyi eğitilmiş personele ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle rutin uygulamalar için, kalp atım hızı yöntemlerinin kolay çalıştırılabilirliği ve taşınabilirliği, daha ucuz olması gibi bazı özellikler gerekmektedir. Lazer beneklenme zıtlık tabanlı spektroskopisi ve analiz yöntemleri, kolay uygulanabilirlik, nispeten az maliyet ve girişimsel olmayan (non-invasive) oluşu gibi özelliklerinden dolayı daha çok önem kazanmıştır [1,8,9,10]. İnsan ve hayvan

Biyomedikal Optik

3. Gün / 29 Ekim 2016, Cumartesi

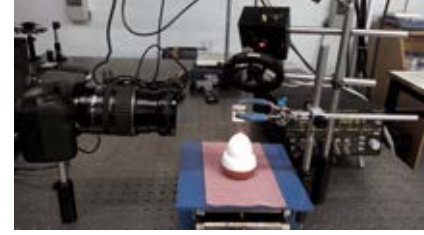
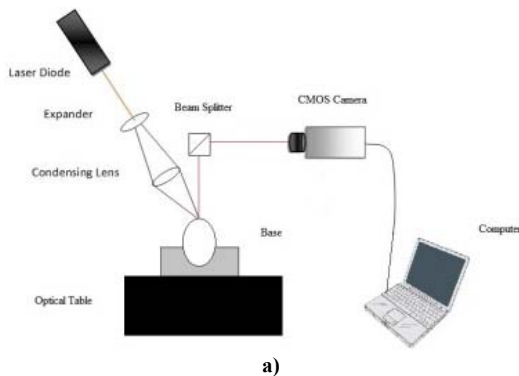
dokusu gibi, optik heterojen ortamın içindeki dinamiklerin geniş alan görüntülenmesi için lazer beneklenme zıtlık görüntülemesi, etkili ve basit bir yöntemdir [11]. Çok iyi zaman ve uzamsal çözünürlükten dolayı LBZA, biyomedikal görüntüleme çalışmalarında yaygın biçimde kullanılır. Günümüzde, tavukçuluk sektöründe ve ilgili araştırma alanında tavuk embriyosunun kalp atım hızı ölçümü, kullanışlı ve portatif bir sistemle yapılamamaktadır. Önerdiğimiz optik sistem, oldukça ekonomik ve basit yapısıyla bu alanda öncü nitelikte olup, ileride düşünülebilecek endüstriyel bir sistemin ana düşüncesini oluşturmaktadır.

Bu çalışmada önerilen yöntem: rutin embriyonik değerlendirme için basitliği ve verimliliği sayesinde, uygun ve literatürdekilerden farklıdır. Görüntü dizisi (ya da çerçeve dizisi) üzerinden elde edilen zıtlık verilenin Welch Spektral Analizinden kalp atım hızı değerini belirlenir. Sistemin kalibrasyonu için, bilinen genlik ve frekanslarda, hoparlör titreşimleri üzerinde in-vitro denemeleri yapıldı. In-vivo deneyleri için, 20 tane yumurta kullanıldı. Kuluçka döneminin 10 farklı gününden alınan yumurtalarla (kuluçka döneminin 3. gününden 14. gününe kadar gelişen yumurtalar) yapılmıştır.

II. MALZEME VE YÖNTEMLER

A. Ölçümsel Kurulum

Donanımsal olarak; ışık kaynağı olarak lazer diyot (633nm, 50W), lens (odak noktası 9 cm), hoparlör (30W), CMOS kamera (Canon 40D, 10.1 MP, 14 bit ve 24 fps örnekleme hızı) bulunmaktadır. Video kaydı, bir yazılım ile gerçekleştirilir (EOS Camera Movie Record) [12]. Hoparlör sistemi üzerinden kalibrasyon yapıldıktan sonra in-vivo ölçümler için, bazı uzaklık ayarlamaları yapılarak ölçüm alındı. Donanımsal yapı Şekil 1'de verilmektedir.

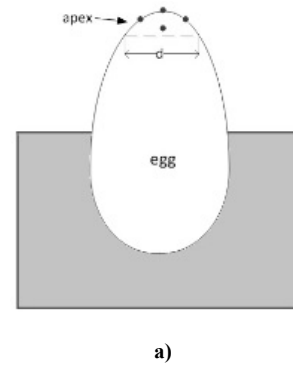


b)

Şekil 1. In vivo tabanlı (kalibrasyon) ölçüm sistemi;
a) Şematik Diyagram, b) Sistem Tasarımı

B. Deneysel (in-vivo) Protokolü

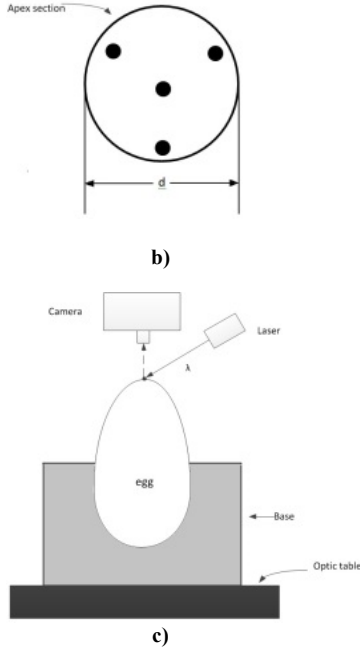
In-vivo ölçümleri için, 20 tane tavuk yumurtası (tavuk ırkı: rose 308) yapay kuluçka cihazında (Cimuka DF103) $37.8 \pm 1^\circ\text{C}$ derecede ve %50-60 bağıl nem oranında tutulur. Tüm işlemler deney hayvanları etiği çerçevesinde Orman ve Su İşleri Bakanlığı'nın 2014 yılı düzenlemelerine uygun olarak yapılmıştır. Ölçüm işlemi için bundan sonra, her bir yumurta kuluçka makinasından alınır ve optik düzeneğin ölçüm yuvasına yerleştirilir. Beneklenme tabanlı geniş alan görüntüsü almak için, yumurta kabuğunun en sivri kısmına üçgen olacak şekilde 3 nokta ve üçgenin merkezine de bir nokta konarak işaretlenir. Bu işaretlenen noktalar, her bir lazer ışık odaklaması için hedef olarak kullanılır. Beneklenme zıtlık analizinden sonra, her bir görüntü için (her bir çerçeve için) bir zıtlık değeri bulunur. Sonuç olarak, algoritmanın son aşamasında, tek bir kalp atım hızı değeri, 4 adet işaretlenmiş lazer aydınlatma hedefine karşılık gelen kalp atım hızı değerlerinin ortalaması alınarak elde edilir. Şekil 2, hedef noktalarının ayarlaması ve aydınlatma noktalarını gösterir.



a)

Biyomedikal Optik

3. Gün / 29 Ekim 2016, Cumartesi



Şekil 2. Tavuk yumurtasının hedef noktası ayarlanması ve aydınlatma noktaları ; a) Tavuk yumurtası, b) Hedef noktaların ayarlanması c) Aydınlatma noktası

C. Kuramsal Altyapı

Günümüzde, LBZA ve görüntüleme yöntemleri, hızlı uyarlanmalarından dolayı insan ve hayvan dokusu analizi için önem kazanmaktadır [13]. Beneklenme olayı; tek renkli ışığın, pürüzlü bir yüzeyden saçıldığında veya saçıcı parçacıkların akışı nedeniyle oluşan rastgele parlaklık (intensity) örüntüsüdür [14]. Farklı saçılmaya maruz kalmış fotonların dedektör veya kamerada oluşturduğu beneklenme örüntülerinin parlaklığını, saçılan dalgaların farklı faz ve genliklerinin süperpozisyonu belirler. Beneklenmenin nicemsel değerlendirilmesinde zıtlık parametresi kullanılır [13].

$$K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} \quad (1)$$

Burada σ ve $\langle I \rangle$ ise piksel parlaklıklarının standart sapmasını ve ortalamasını simgelerler. Beneklenme zıtlık iyileştirmesi, uzamsal ve/veya zamansal anlamda uygulanabilir. Ayrıca, gözlenen beneklenme zıtlığı, kameranın pozlama zamanının (T) fonksiyonu olup, tek bir benekteki parlaklık dalgalanmalarının özilişki (otokorelasyon) fonksiyonuyla da ilişkilidir [2].

$$K^2(\tau) = V_N(T) = \frac{2P}{T} \int_0^T \left(1 - \frac{\tau}{T}\right) [g_1(\tau)]^2 dt \quad (2)$$

Burada T pozlama zamanını; V_N normalize edilmiş varyansı; τ özilişki fonksiyonu için gecikme süresini; P ise kamera için sabit bir değeri ifade eder. Beneklenme

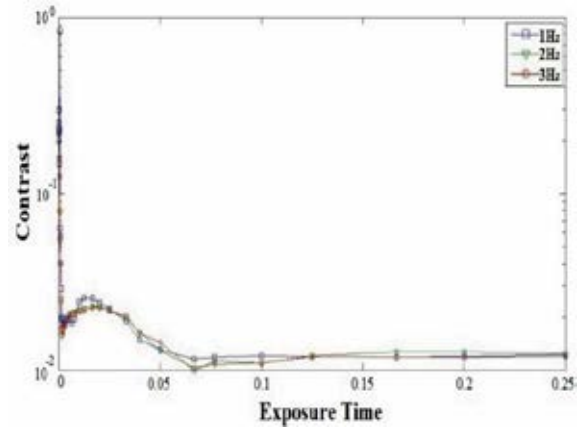
analizinden doğru değerler elde etmek için, kameranın piksel boyutu ile beneklenmelerin boyutunun oranı uzamsal örnekleme kriterince önemlidir (Nyquist kriteri).

Kalp atımından oluşan beneklenme örüntüsünün zamana bağlı değişimini takip edebilmek için, beneklenme tabanlı görüntüler 220 msec süreyle (çerçeve dizileri) kaydedildi. Sonrasında her görüntü için (çerçeve) tek bir zıtlık değeri, K, Denklem (1) kullanılarak hesaplanır [15]. Tüm çerçevelere ait zıtlık değerlerinden üretilen dizi Welch Güç Yoğunluğu Spektral kestirimi işlemine sokulmuştur. Güç spektrumundaki maksimum değer (baskın bileşen), kalp atımına karşı gelmektedir. Kalp atım hızı (atım/dakika) ise aşağıdaki Denklem (3) ile kullanılır.

$$\text{Kalp atım hızı} = 60 \times \text{maksimum frekans değeri} \quad (3)$$

III. SONUÇLAR

DeneySEL çalışmalar iki ana basamakta gerçekleştirilir; ilk aşamada in vitro (hoparlör sistemi) sistem üzerinden en uygun kamera pozlama süresi belirlendi (Şekil 3). Şekilden görüleceği üzere en uygun kamera pozlama süresi 60 ms olarak belirlendi. İkinci aşamada ise yumurta örnekleri üzerinden ölçüm yapıldı.



Şekil 3. Farklı pozlama zamanlarında beneklenme-zıtlık değişimi

In vivo deneyler için benzer şekilde kameranın pozlama zamanı, T, daha önceden belirlendiği gibi 60 ms olarak alınmıştır. Kuluçkanın her bir günü için, 20 tavuk yumurtası (veya embriyosu) kalp atım hızı ölçüm sürecine alındı. Sonrasında, kalp atım hızı değerlerine karşılık gelen (esas olan) zıtlık değerleri 20 ölçümün ortalaması olarak belirlendi. Bu değerlere, SPSS testi uygulandı ve tüm testler için istatistiksel anlamlılık düzeyi, p, 0.05 olarak alındı. Daha sonra, ANOVA testi ile, bu değerlerin zamana (gün) bağlılığı incelendi (p<0.001). Daha sonra post-hoc Tukey testi ile grup içi etkiler incelenmiştir.

Biyomedikal Optik

3. Gün / 29 Ekim 2016, Cumartesi

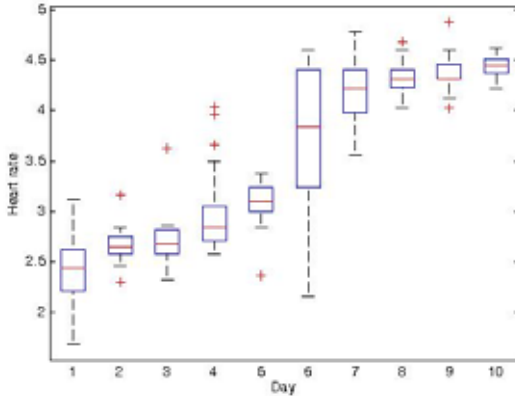
Sonuçlar, Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 2'de görüldüğü üzere, (4,5), (7,8), (7,9), (7,10), (8,9), (8,10) karşılaştırmaları hariç, geriye kalan tüm gruplarda önemli farklılıklar mevcuttur. Ayrıca Şekil 4'de, 20 tavuk embriyosu üzerinden, kalp atım hızlarına karşılık gelen zıtlık değerlerinin değişimi görülmektedir.

Days (Groups)					
	1	2	3	4	5
Mean ± Std	2,435 ± 0,362	2,664 ± 0,175	2,723 ± 0,251	2,999 ± 0,436	3,077 ± 0,223
	6	7	8	9	10
Mean ± Std	3,787 ± 0,680	4,200 ± 0,312	4,328 ± 0,172	4,392 ± 0,213	4,448 ± 0,166

Tablo 1 . Grup ortalamaları

Comparison of Days (Groups)									
	1-2	1-3	1-4	1-5	1-6	1-7	1-8	1-9	1-10
p-value	0,483	0,171	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9	2-10	3-4
p-value	1,000	0,053	0,005	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,216
	3-5	3-6	3-7	3-8	3-9	3-10	4-5	4-6	4-7
p-value	0,031	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,599	<0,001	<0,001
	4-8	4-9	4-10	5-6	5-7	5-8	5-9	5-10	6-7
p-value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,005
	6-8	6-9	6-10	7-8	7-9	7-10	8-9	8-10	9-10
p-value	<0,001	<0,001	<0,001	0,959	0,720	0,359	1,000	0,980	1,000

Tablo 2. Grupların karşılaştırılması



Şekil 4. 20 embriyonun kalp atım hızına karşılık gelen zıtlık değişimleri

IV. TARTIŞMA

Bu çalışmada amaçlanan, döllenmiş tavuk yumurtasının kalp atım hızı ölçümünün, tamamen girişimsel olmayan (yumurta kabuğu kırılmadan) yöntemle yapılabilmesidir. Önerilen sistemde; öncelikle in vitro (hoparlör) sistemi üzerinden kalibrasyon yapılmıştır. Daha sonra 20 yumurta örneği üzerinden farklı kuluçka günleri için, kalp atım hızı ile ilişkili zıtlık değerleri ölçülmüştür. Sonuçlardan önerilen sistemin kanatlı hayvan

kuluçka dönemi için uygun olduğu görülmektedir. İleriki çalışmalarda sistemin daha bütünsel ve taşınabilir olması için iyileştirmeler planlanmaktadır.

V. TEŞEKKÜR

Bu proje, Tübitak 113E771 numaralı proje olanaklarıyla desteklenmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Forrester KR, Tulip J, Leonard C, Stewart C, Bray RC., "A laser speckle imaging technique for measuring tissue perfusion." IEEE Trans Biomed Eng., (2004) Nov;51(11):2074-84.
- [2] Yeo C., Park HC., Lee K., Song C., "Avian embryo monitoring during incubation using multi-channel diffuse speckle contrast analysis." Biomed Opt Express, (2015) Dec 14;7(1):93-8, DOI: 10.1364/BOE.7.000093, eCollection, (2016).
- [3] Cohn A.E., "Physiological Ontogeny : A. Chicken Embryos. V. ON the Rate of the Heart Beat during the development of Chicken Embryos." J. Exp. Med., (1925) Aug 31; 42(3): 291-297.
- [4] Yang L., You S., Zhang L., Yang T., Li P., Lu J., "Noninvasive vasculature detection using laser speckle imaging in avian embryos through intact egg in early incubation stage." Biomed Opt Express, (2013) Jan 1;4(1):32-7, DOI: 10.1364/BOE.4.000032, Epub, (2012) Dec 10.
- [5] Bogue J.Y., "The heart rate of the developing chick." J. Exp. Biol., 9, (1932), pp. 351-358.
- [6] Tazawa H., Kuroda O., Whittow G.C., "Noninvasive determination of embryonic heart rate during hatching in the brown noddly (Anous stolidus)." Auk (American Ornithologists Union); Jul, (1991), Vol. 108 Issue 3, p594.
- [7] Aubert A. E., Beckers F., Ramaekers D., Verheyden B., Leribaux C., Aerts J.M. and Berckmans D., (2004), "Heart rate and heart rate variability in chicken embryos at the end of incubation." Experimental Physiology, 89: 199-208, DOI:10.1113/expphysiol.2003.027037.
- [8] Claudia P. Valdes, Hari M. Varma, Anna K. Kristoffersen, Tanja Dragojevic, Joseph P. Culver, and Turgut Durduran, "Speckle contrast optical spectroscopy, a non-invasive, diffuse optical method for measuring microvascular blood flow in tissue." Biomed Opt Express, (2014) Aug 1; 5(8): 2769-2784, Published online, (2014) Jul 23, DOI: 10.1364/BOE.5.002769.
- [9] Postnov DD., Sosnovtseva O., Tuchin VV., "Improved detectability of microcirculatory dynamics by laser speckle flowmetry." J Biophotonics, (2015) Oct;8(10):790-4, DOI: 10.1002/jbio.201500152, Epub, (2015) Jun 25.
- [10] Zakharov P., Völker AC., Wyss MT., Haiss F., Calcinaghi N., Zunzunegui C., Buck A., Scheffold F., Weber B., "Dynamic laser speckle imaging of cerebral blood flow." Opt. Express, (2009) Aug 3;17(16):13904-17.
- [11] Zakharov P., Völker A., Buck A., Weber B., Scheffold F., "Quantitative modeling of laser speckle imaging." Opt Lett, (2006) Dec 1;31(23):3465-7.
- [12] <http://eos-camera-movie-record.soft112.com>
- [13] Boas DA., Dunn AK., "Laser speckle contrast imaging in biomedical optics." J Biomed Opt, (2010) Jan-Feb; 15(1):011109, DOI: 10.1117/1.3285504.
- [14] Nemati M., Wijshoff RW., Stijnen JM., van Tuijl S., Bergmans JW., Bhattacharya N., Urbach HP., "Laser-speckle-based detection of fluid pulsation in the presence of motion artifacts: in vitro and in vivo study." Opt Lett, (2013) Dec 15;38(24):5334-7, DOI: 10.1364/OL.38.005334.