

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра Оптики и биофотоники

**Анализ микрогемодинамики кровотока в сосудах
лабораторных животных методом спекл-визуализации и ДОКТ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента(ки) 4 курса 4023 группы

направления (специальности) 03.03.02 «Физика»

код и наименование направления (специальности)

Институт физики

наименование факультета, института, колледжа

Гуселева Владислава Дмитриевича

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

Дьяченко П.А.
инициалы, фамилия

Заведующий кафедрой

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

Тучин В.В.
инициалы, фамилия

Саратов 2023 год

Введение

Визуализация системы микроциркуляторного русла, в том числе кровеносных и лимфатических сосудов, играет важную роль в медицине и является клинически необходимой, поскольку может быть использована для диагностики и лечения многих патологических состояний и заболеваний. Также для лучшего понимания патологических механизмов и разработки методов лечения некоторых критических заболеваний.

В условиях развития онкологических заболеваний исследование сосудистой структуры и параметров кровотока раковых тканей является важным моментом, т.к. степень васкуляризации важный параметр при характеристике опухоли, контроле терапевтических откликов и рецидива опухоли.

С развитием лазеров и оптических технологий за последние десятилетия различные подходы к оптической визуализации стали основными инструментами для прижизненной визуализации и получили широкое применение в биомедицинской диагностике

Большинство существующих методов визуализации кровеносных сосудов требуют контрастных веществ, их токсичность и побочные эффекты могут ограничивать применение этих методов. До настоящего времени интерес к использованию оптических методов для мониторинга физиологического состояния, патологической диагностики и терапии возрастил из-за их простоты, безопасности, низкой стоимости, а также особенностей контрастности и разрешения в отличие от обычной рентгеновской компьютерной томографии, ультразвуковой визуализации и других методов медицины

В связи с этим целью данной дипломной работы стал анализ микрогемодинамики в подкожных сосудах лабораторных животных методом спекл-контрастной визуализации и ДОКТ в условиях развития злокачественной опухоли. В ходе работы был проведен анализ микрогемодинамики в подкожных сосудах методами спекл-контрастной визуализации и ДОКТ здоровых лабораторных крыс, и животных с привитой опухолью спустя 14 дней и 28 дней после инъекции. Также был проведен анализ влияния модельной патологии на проницаемость подкожных сосудов путем оценки воздействия водного 70% раствора глицерина на микрогемодинамику методом спекл-контрастной визуализации.

Материалы и методы

В данной работе представлены результаты экспериментального исследования изменений микроциркуляции подкожного кровотока в условиях развития злокачественной опухоли с использованием лазерной спекл-контрастной томографии при применении оптического просветляющего агента и ДОКТ.

В методе спекл-визуализации проводилась оценка контраста усредняемых по времени динамических спеклов в зависимости от времени усреднения спекл-модулированных изображений. Расчет пространственного контраста K производился по регистрируемому изображению спекл- поля по области, размер которой обычно составляет 5×5 или 7×7 пикселей:

$$K_k = \sigma_{I_k} / \bar{I}_k, \quad (1)$$

где k – число кадров в последовательности спекл-модулированных изображений, \bar{I}_k и σ_{I_k} – усредненная по интенсивности рассеянного света анализируемого кадра и среднеквадратичное значение флюктуационной составляющей яркости пикселя, соответственно:

$$\bar{I}_k = (1/MN) \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I_k(m, n), \quad (2)$$

$$\sigma_{I_k} = \sqrt{(1/MN) \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N \{I_k(m, n) - \bar{I}_k\}^2}, \quad (3)$$

Для мониторинга микрогемодинамики был использован лабораторный образец устройства, реализующего метод спекл-визуализации, схема которого представлена на рисунке (1). Спекл-модулированные изображения поверхности анализируемого участка регистрировались монохромной КМОП-камерой (Basler a602f, число пикселей в матрице 656×491 , размер пикселя 9.9×9.9 мкм; 8 бит/пиксель), оснащенной микро-объективом ЛОМО с кратностью увеличения $10 \times$. В качестве источника излучения был использован Не-Не лазер ГН-5П с длиной волны 633 нм.

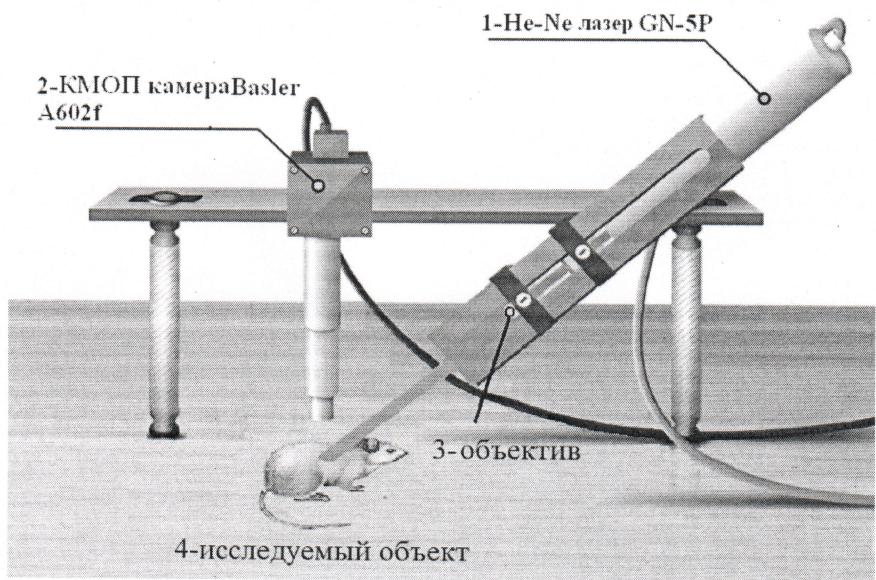


Рисунок 1. Схема экспериментальной установки. 1 - Не-Не лазер ГН-5П, длина волны — 633 нм; 2 – детектор (КМОП камера Basler A602f) с закрепленным тубусом микроскопа с микрообъективом (Ломо, 10×), 3 - расширитель лазерного пучка объектив 10x; 4 - исследуемый объект.

Время экспозиции составило 10 мс. Запись спектр изображений проводилась в течение 1 мин со средней частотой кадров 40 кадров в секунду. Далее исходя из того, что рассчитанный контраст спектр изображений обратно пропорционален скорости кровотока, для простоты анализа изменений микроциркуляции кровотока, введен параметр индекс кровотока, характеризующий относительные изменения скорости кровотока. Данный параметр обратно пропорционален контрасту, т.е. пропорционален скорости кровотока.

Лабораторные животные были разделены на две группы, первая включала в себя здоровых животных (3 штуки), вторая - животных с привитой опухолью спустя 14 дней после инъекции (3 штуки) и третья- животных с привитой опухолью спустя 28 дней после инъекции (3 штуки). Лабораторным крысам была привита опухоль, путем подкожной инъекции в область лопаток по 0.5 мл 25% опухолевой взвеси в растворе Хэнкса штамма альвеолярного рака печени PC1. Под общим обезболиванием (внутримышечное введение анестетика) выполнялся надрез кожи, после чего кожа отгибалась и производился анализ изменения кровотока в подкожных сосудах методом

спекл-контрастной визуализации и ДОКТ. Также было изучено влияние раствора 70% глицерина на микроциркуляцию крови подкожных сосудов у крыс *in vivo* с помощью лазерной спекл-контрастной визуализации. Значение диаметра исследуемых сосудов составляло 250 ± 50 мкм.

Исследования функционирования кровеносной системы в условиях развития перевитой опухоли у лабораторных крыс с помощью ДОКТ производились с использованием коммерческого оптического когерентного томографа с перестраиваемой частотой источника OCS1300SS (Thorlabs Inc. USA), центральная длина волны которого составляет 1325 нм, а ширина спектра - 100 нм.

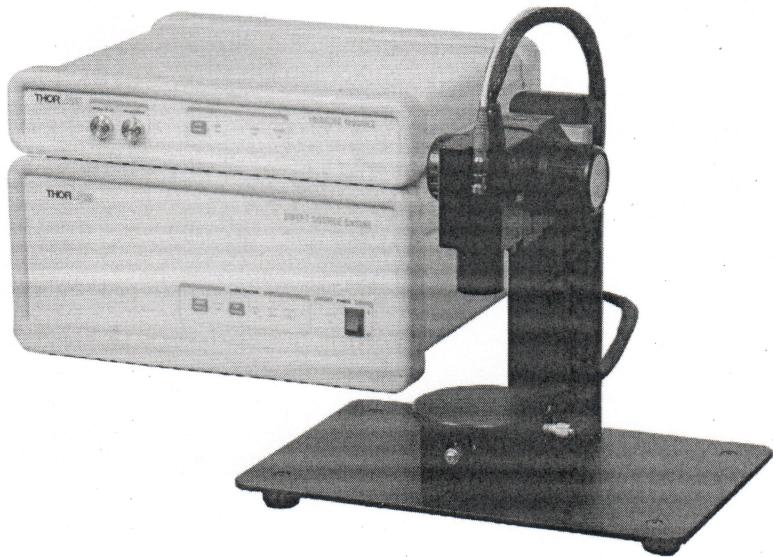


Рисунок 2. Оптический когерентный томограф OCS1300SS (Thorlabs Inc. USA)

Пакет программного обеспечения, поставляемый вместе с томографом, был использован для восстановления доплеровской фазы в комплексной форме из интерференционного сигнала интерферометра с помощью Фурье преобразования. Доплеровская фаза кодирует пространственное распределение движущихся клеток в сосуде и их скорость. Таким образом, наличие доплеровского сдвига в сигнале является индикатором наличия сосуда, а величина этого сдвига характеризует распределение скорости движения клеток в сосуде.

Алгоритм анализа данных включал в себя следующие шаги. В программе ImageJ на изображениях выбиралась исследуемая область сосуда, далее полученное изображение (Рис. 3) переводилось в текстовый файл.

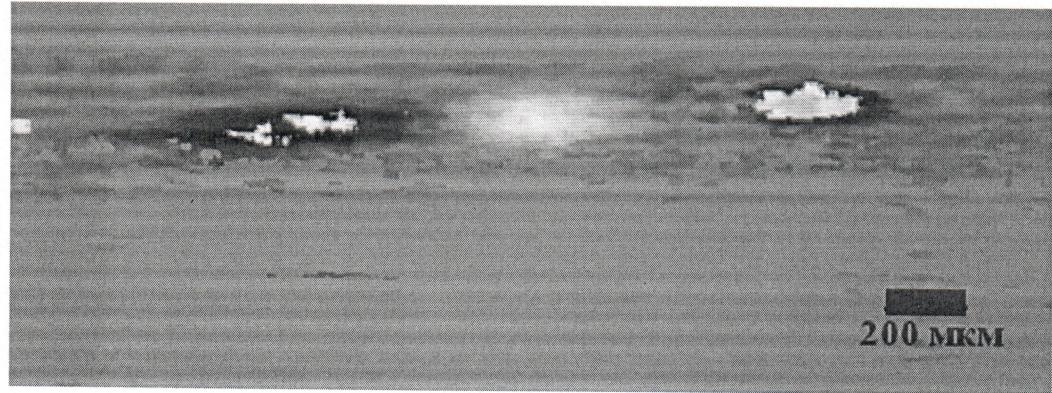


Рисунок 3. Допплеровские ОКТ изображения сосудов

Каждый пиксель выбранной области изображения (Рис.3) переводился в соответствующую разность фаз в диапазоне $[-\pi; \pi]$ по формуле:

$$\Delta\varphi(x, y) = \rho(x, y) \frac{2\pi}{255} - \pi,$$

где $\rho(x, y)$ – значение соответствующего пикселя в изображении.

Далее разность фаз $\Delta\varphi(x, y)$ переводилась в скорость по следующей формуле:

$$V(x, y) = \frac{\lambda_0 \pi \Delta t}{\Delta\varphi(x, y) \cos(\theta)},$$

где λ_0 – центральная длина волны излучения 1,325 мкм, Δt – интервал времени между соседними А-сканами – 1/16000 секунды, θ – угол между вектором скорости и зондирующими пучком 97,8. Далее рассчитанные скорости усреднялись для каждого кадра и был построен график зависимости скорости кровотока от дня развития опухоли.

Результаты и обсуждения

Исследования применения 70% раствора глицерина методом спекл-визуализации, представленные в данной работе были сосредоточены на анализе реакций кровотока на воздействие ОПА в подкожных сосудах в условиях развития опухоли.

На рисунке (4) представлены полученные результаты анализа микротенденции в подкожных сосудах, результат представлен в виде диаграммы, значения нормированы на значения индекса скорости для контрольной группы.

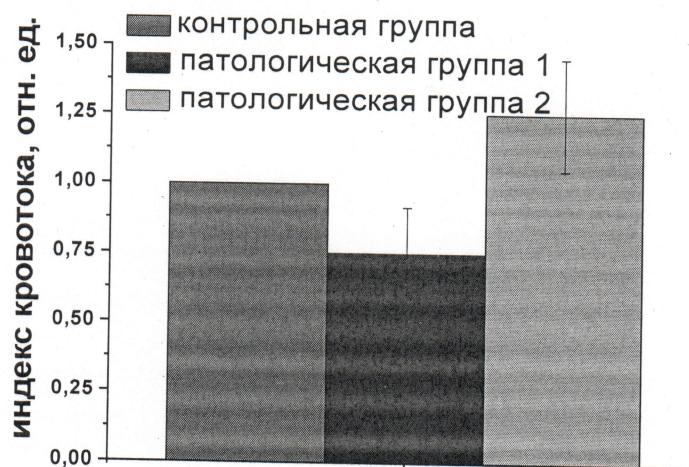


Рисунок 4. Динамика изменения индекса кровотока для различных экспериментальных групп полученная с помощью спекл-визуализации

Полученные результаты показывают, что скорость кровотока у патологической группы №1 снижена на 25% относительно контрольных измерений, у патологической группы №2 увеличена на 26% относительно контрольных измерений.

Результат измерений влияния 70% раствора глицерина на микроциркуляцию крови подкожных сосудов у крыс *in vivo* с помощью лазерной спекл-контрастной визуализации (LSCI) показан на рисунке (5). Результат представлен в виде диаграммы, значения нормированы на значения индекса скорости для контрольной группы.

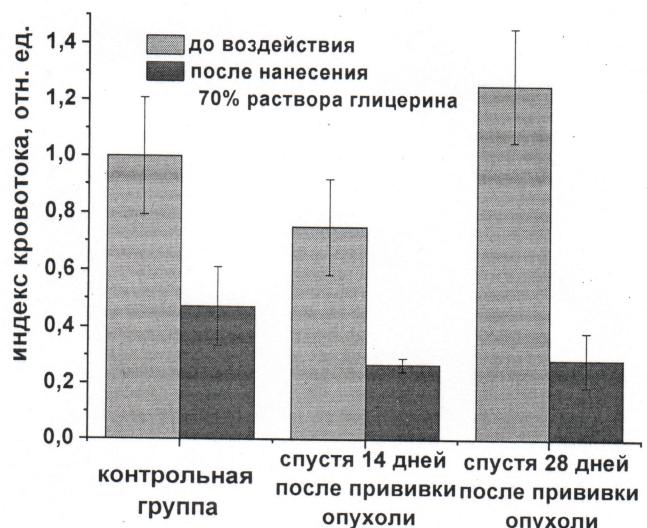


Рисунок 5. Изменение скорости кровотока при влиянии 70% раствора глицерина на подкожные сосуды.

При этом результаты воздействия просветляющего агента на кровоток показали, что применение 70% раствора глицерина вызывает снижение скорости кровотока у контрольной группы, примерно в 2 раза. При этом у патологических групп воздействие раствора на кровоток более выражено, у группы, измерения на которой, проводились спустя 14 дней после прививки опухоли, скорость кровотока снизилась в 2.8 раз, спустя 28 дней – в 4 раза. Разница на характер воздействия 70% глицерина на скорость крови в подкожных сосудах, возможно свидетельствует о нарушении проницаемости сосудов в условиях развития злокачественной опухоли.

На воздействие ацетилхолина была зафиксирована аналогичная разница в изменении скорости кровотока, в контрольной группе было получено более выраженное изменение скорости кровотока, чем в группе с патологией. Таким образом, применение оптических агентов может быть использовано для мониторинга некоторых осложнений, связанных с изменениями проницаемости сосудов, в условиях развития различных патологий.

Зависимость индекса кровотока от дня развития опухоли полученная с помощью ДОКТ представлена на рисунке (6).

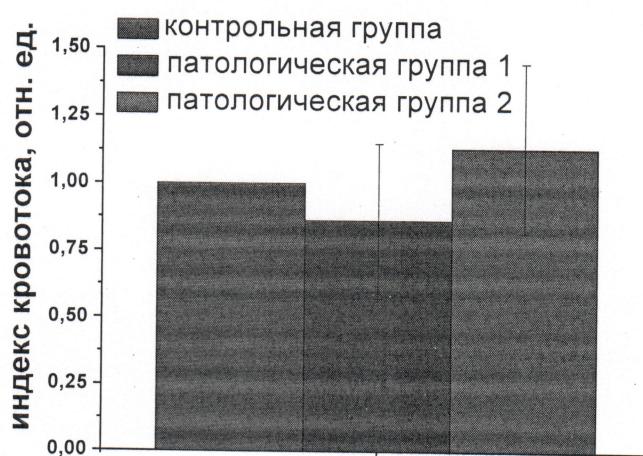


Рисунок 6. Динамика изменения индекса кровотока в сосудах при развитии опухоли.

Полученные с помощью ДОКТ результаты показывают, что скорость кровотока у патологической группы №1 снижена на 14% относительно контрольных измерений, у патологической группы №2 увеличена на 13% относительно контрольных измерений. Характер изменений микрогемодинамики коррелирует с результатами, полученными с помощью установки спекл-контрастной визуализации, описанной выше, что в целом демонстрирует достоверность полученных нами результатов, но при этом нет полного совпадения в количественной оценке изменений микрогемодинамики, этот факт может быть обусловлен разными подходами измерений скорости кровотока.

Вывод

Результаты, полученные при исследовании нарушений микроциркуляции подкожного кровотока в условиях развития злокачественной опухоли, показывают, что развитие заболеваний у животных вызывает изменения в микроциркуляторной системе, а применяя оптические просветляющие агенты мы можем оценить изменения проницаемости сосудов в условиях развития опухоли, в нашем случае результаты показали ее увеличение.

By

13.06.2023

Тусенев В.Д.