

# Бимодальная визуализация функциональных изменений кровотока методами оптоакустической и оптической когерентной ангиографии

А.Г.Орлова, П.В.Субочев, А.А.Моисеев, Е.О.Смолина, С.Ю.Ксенофонов, М.Ю.Кириллин, Н.М.Шахова

*Впервые продемонстрированы результаты комплементарного исследования функциональных изменений кровотока поверхностных тканей человека методами оптоакустической (ОА) микроскопии и ангиографической оптической когерентной томографии (ОКТ-А) в ходе окклюзионного теста. Данные ОА микроскопии позволили выявить повышение кровенаполнения сосудов как результат сосудистой окклюзии, а данные ОКТ-А продемонстрировали снижение доли сосудов с функционирующим кровотоком. Представленный в работе комбинированный подход может быть использован в экспериментальной и клинической медицине для исследования функциональных изменений микроциркуляции при диагностике сосудистых патологий поверхностных тканей и оценке ответа микрососудистого русла на лечение.*

**Ключевые слова:** оптоакустическая микроскопия, оптическая когерентная томография, ангиография, функциональный тест, манжеточная окклюзия.

## 1. Введение

Морфо-функциональные изменения микроциркуляторного русла поверхностных тканей, сопровождающие развитие ряда заболеваний, в настоящее время рассматриваются в качестве утвержденных или потенциальных диагностических критериев. Особенности структуры сосудов могут служить индикаторами нарушений кровоснабжения в диагностических задачах дерматологии, онкологии, регенеративной медицины, эндокринологии, сосудистой и пластической хирургии [1–5]. В клинической практике используется широкий набор методов, позволяющих проводить неинвазивное исследование микроциркуляторного русла кожи. Для визуализации структуры сосудов и оценки скорости кровотока применяются капилляроскопия, характеризующаяся небольшой глубиной исследования, и магнитно-резонансная томография (МРТ), которая требует использования контрастирующих агентов. Оценка скорости кровотока обеспечивается методами лазерной доплеровской анемометрии/флоуметрии, их недостатками является низкое пространственное разрешение [6]. Большими потенциальными возможностями для построения карты скоростей кровотока поверхностных тканей обладает метод лазерной спекл-флоуметрии [7], основанный на анализе динамики спекл-структуры рассеянного света при зондировании поверхности ткани когерентным излучением.

В последнее время наблюдается существенный прогресс в развитии оптических и комбинированных методов неинвазивной визуализации, обеспечивающих трех-

мерную визуализацию микрососудистого русла с дополнительными возможностями функциональной диагностики. Оптоакустическая (ОА) визуализация основана на регистрации ультразвуковых волн, возникающих при поглощении импульсного лазерного излучения оптически хромософорами. ОА визуализация сочетает преимущества оптического и акустического подходов, обладает одновременно высоким молекулярным контрастом, характерным для оптических методов, и высоким (субмиллиметровым) пространственным разрешением, характерным для ультразвука. Благодаря высокому оптическому поглощению гемоглобина ОА методы позволяют осуществлять высококонтрастную ангиографию [8].

Основу метода оптической когерентной томографии (ОКТ) составляет интерферометрическое измерение распределения фотонов, рассеянных назад на неоднородностях показателя преломления внутри исследуемых структур, по длинам пробега. Типичный прибор ОКТ способен визуализировать внутреннюю структуру кожи на глубину 1–1.2 мм с разрешением  $\sim 10$  мкм [9]. Доплеровская ОКТ, основанная на дополнительной регистрации доплеровского сдвига фотонов, формирующих ОКТ-изображение, позволяет дополнительно картировать распределение направления и скорости кровотока в поверхностных слоях кожи [10], однако существенным ограничением этого метода является многократное рассеяние, приводящее к искажению регистрируемых профилей скорости [11]. В настоящее время предложен ряд методов, контрастирующих сосуды на основании трехмерных данных, полученных с использованием ОКТ [12–14]. Поскольку абсолютное большинство этих методов основано на детектировании изменений сигнала между последовательными измерениями ОКТ, ОКТ-ангиография (ОКТ-А) визуализирует прежде всего перфузию.

Параллельное исследование сосудистого русла с использованием ОА ангиографии и ОКТ-А позволяет одновременно получать информацию о его структуре, кровенаполнении, а также о функционировании кровотока.

А.Г.Орлова, П.В.Субочев, А.А.Моисеев, Е.О.Смолина, С.Ю.Ксенофонов, М.Ю.Кириллин, Н.М.Шахова. Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН, Россия, 603950 Н.Новгород, ул. Ульянова, 46; e-mail: orlova@ufp.appl.sci-nnov.ru

Поступила в редакцию 30 октября 2018 г., после доработки – 8 ноября 2018 г.

Поскольку физические явления, лежащие в основе формирования ангиографических изображений в ОА методах и ОКТ-А различаются, а также поскольку оба подхода могут быть объединены в одном устройстве, исследование возможности их комплементарного применения при оценке функциональных реакций тканей представляет несомненный интерес. Данная комбинация методов уже использовалась для последовательной или одновременной визуализации сосудистого русла нормальной и рубцовой ткани, а также невуса, гемангиомы, экземы и базальноклеточного рака [15–18]. Работ по комплементарному применению этих методов для исследования динамики кровотока при внешних воздействиях до настоящего времени не проводилось.

Для оценки динамического ответа сосудистой системы и его альтераций при различных патологиях используется широкий ряд функциональных тестов, в основе которых лежит контролируемое воздействие на параметры перфузии тканей [6]. ОА метод впервые был использован для оценки реакции микроциркуляторного русла в ходе окклюзионного теста в исследовании [19]. Целью настоящей работы является изучение возможности комбинированного применения ОКТ-А и ОА ангиографии в визуализации функциональных изменений сосудистой сети поверхностных слоев кожи при окклюзии.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Экспериментальная ОА установка

В качестве источника зондирующего излучения в экспериментальной установке для ОА ангиографии (ИПФ РАН) был использован импульсный лазер на длине волны 532 нм Wedge HB532 (BrightSolutions, Италия) с частотой следования импульсов 2 кГц и длительностью импульсов 1 нс. Трехмерные изображения формировались механическим сканированием исследуемого объекта оптико-акустической головкой. Лазерное излучение доставлялось до головки посредством волоконно-оптического жгута, оптоакустические импульсы регистрировались одноэлементным датчиком, расположенным в центре головки. Частотная полоса 35 МГц и фокусное расстояние 6.7 мм акустического датчика обеспечивали пространственное разрешение ОА микроскопии на уровне 50 мкм при глубине не более 2 мм. Для получения в окклюзионном тесте ОА изображений образец сканировался в области размером 3×3 мм, лежащей в плоскости  $xu$  с шагом  $\Delta x = \Delta y = 25$  мкм, поэтому размер получаемых ОА изображений составлял 120×120 пикселей. Общее время получения полного набора ОА А-сканов составляло не более 3 мин [20].

Для получения ОА ангиограмм набор А-сканов обрабатывался с использованием трех численных алгоритмов, последовательно применяемых к исходным данным [21]. Сначала ко всем А-сканам применялся одномерный алгоритм деконволюции с регуляризацией по Тихонову [22], позволяющий компенсировать частотно-зависимое акустическое поглощение в полосе 35 МГц приемных частот ОА антенны. Затем ко всем В-сканам, полученным в плоскостях  $xz$  и  $yz$ , применялся алгоритм двумерной фурье-реконструкции [23], позволяющий увеличить глубину резкости ОА антенны с 0.75 до 2 мм. Наконец, к найденным в результате деконволюции и реконструкции данным применялся алгоритм трехмерной фильтрации

Франги [24], позволяющий повысить относительный контраст сосудистых (цилиндрических) структур диаметром от 7.5 до 200 мкм (по отношению к сферическим и плоским структурам аналогичных линейных размеров).

### 2.2. ОКТ-ангиография

Установка ОКТ (ИПФ РАН) работает на центральной длине волны 1.3 мкм и имеет аксиальное разрешение 10 мкм и латеральное разрешение 15 мкм, она основывается на принципе спектральной ОКТ со спектрометром на основе линейки фотоприемников InGaAs (SU512-LD (512 Pixel), Sensors Unlimited, Inc., USA) и обеспечивает 20000 измерений профиля рассеяния по глубине (А-сканов) в секунду. Это позволяет записывать за 26 с объем 256×256×512 пикселей, необходимый для визуализации сосудов. Двумерное ОКТ-сканирование проводилось в непрерывном режиме, при этом сканер установки ОКТ не проходил одну позицию дважды. Для контрастирования сосудов использовался метод, основанный на высокочастотной фильтрации в пространстве сигнала с использованием фильтра с конечной импульсной характеристикой (ВЧ КИХ-фильтра) [25]. Поскольку сканирование вдоль медленной оси производится со значительным (~60%) перекрытием сканирующего пучка в соседних измерениях, изменения сигнала между соседними измерениями, связанные с движением, имеют большую по величине высокочастотную составляющую, в сравнении с изменениями сигнала, связанными со сканированием. Использование ВЧ КИХ-фильтрации позволяет вычислить одно кросс-секционное изображение (В-скан) ОКТ-А на основе лишь 7 соседних структурных В-сканов ОКТ и визуализировать В-сканы ОКТ-А в реальном времени. Контрастирование вытянутых структур на изображениях осуществлялось при помощи двумерного фильтра [26], поскольку сосуды в трехмерном объеме на ОКТ-А вытянуты по глубине из-за так называемого теневого артефакта.

### 2.3. Окклюзионный тест

Эксперимент по совместному использованию ОА ангиографии и ОКТ-А проводился с участием здорового 30-летнего добровольца. Во время эксперимента доброволец располагался сидя и помещал руку на опорной пластине ладонью вверх, кисть фиксировалась, на внутренней стороне кисти в области возвышения большого пальца (thenar) выбиралась зона исследования. Размеры зоны исследования для ОА метода и ОКТ-А были одинаковыми (3×3 мм). Временное пережатие тканей (манжеточная окклюзия) осуществлялось с использованием компрессионной манжеты, накладываемой на предплечье приблизительно на середине расстояния между лучезапястным и локтевым суставами. С целью дозирования силы компрессии давление нагнетаемого в манжету воздуха контролировалось и на время проведения теста устанавливалось на 60 мм рт. ст. выше значения предварительно измеренного систолического давления добровольца. Исследование проводилось до пережатия, через 5 мин. от его начала и сразу после выпуска воздуха из манжеты [27].

В качестве количественной характеристики получаемых ангиографических изображений, позволяющей оценить наблюдаемые изменения, была выбрана доля сосу-

дов в объеме ткани, причем для ОА изображений эта величина характеризует кровенаполненность, а для ОКТ-А – долю сосудов с функционирующим кровотоком. Для определения доли сосудов в объеме ткани полученные с помощью ОА метода и ОКТ-А двумерные изображения сосудистых сеток были бинаризованы. Выраженное в процентах отношение площади, занимаемой бинаризованными сосудистыми сетками, к площади изображения, считалось долей сосудов на данном изображении.

### 3. Результаты и обсуждение

На рис.1 показаны полученные при ОА ангиографии и ОКТ-А изображения микроциркуляторного русла одного и того же волонтера при выполнении окклюзионного теста. На ОА изображениях (рис.1,а–в) кровеносные сосуды, содержащие гемоглобин, визуализируются на фоне окружающих тканей как зоны с высоким уровнем сигнала. Крупные сосуды входят в состав глубокого сплетения сосудов кожи, мелкие – в состав поверхностного сплетения [28]. По данным ОА ангиографии доля кровенаполненных сосудов в объеме ткани до окклюзии в исследуемой зоне ладони составляет 52%.

Изображения ОКТ-А (рис.1,з–е), в свою очередь, визуализируют перфузию: высокий сигнал соответствует зонам, в которых значение сигнала ОКТ значительно изменилось между двумя измерениями. Поскольку ОКТ обладает меньшей глубиной построения изображения в сравнении с ОА методом, на изображении ОКТ-А видны лишь сосуды, входящие в состав поверхностного сплетения. По данным ОКТ-А доля сосудов с функционирующим кровотоком составляет 28%. Более низкое значение, полученное методом ОКТ-А, по сравнению с ОА методом, можно объяснить меньшей глубиной зондирования и, следовательно, меньшим вкладом крупных сосудов.

ОА метод продемонстрировал, что во время окклюзии (рис.1,б) наиболее выраженные изменения ОА сигнала характерны для мелких сосудов поверхностного сплетения, которые временно наполнялись кровью и становились отчетливо видны на ОА изображениях. Для крупных сосудов также было продемонстрировано повышение ОА сигнала, свидетельствующее об увеличении кровенаполнения, которое возвращалось к исходному уровню после снятия окклюзии (рис.1,в). Значение доли сосудов в объеме ткани во время и после окончания пережатия составило 64% и 56% соответственно (рис.1,б, в). Повышение содержания гемоглобина в коже при проведении сосудистой окклюзии уже было продемонстрировано ранее с использованием оптических [20, 29] и ОА [30] методов.

Методом ОКТ-А показано, что пережатие сосудов приводит к существенному снижению интенсивности кровотока, что выражается в практически полном исчезновении сигнала (рис.1,д). Снятие окклюзии приводит к восстановлению кровотока [6], что можно косвенно наблюдать на изображениях ОКТ-А как увеличение количества видимых сосудов (рис.1,е). По данным ОКТ-А доля сосудов с функционирующим кровотоком во время и после окклюзии составила 6% и 30% соответственно.

Следует отметить, что пространственное разрешение ОА метода не позволяет визуализировать сосудистые структуры, расположенные друг к другу ближе, чем на 50 мкм, в то время как ОКТ-А обладает пространственным разрешением ~10 мкм (у используемой в эксперименте установки латеральное разрешение 15 мкм, аксиальное

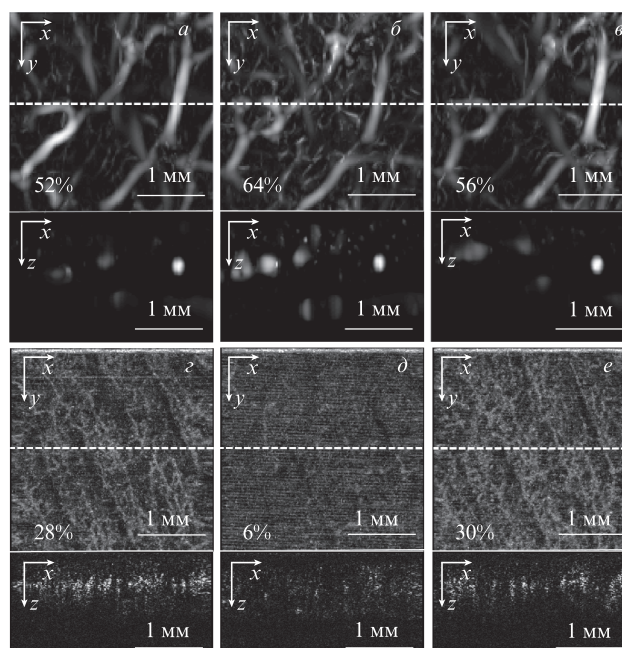


Рис.1. ОА (а–в) и ОКТ-изображения (з–е) кровеносных сосудов ладони человека до окклюзии (а, з), во время окклюзии (б, д), после окклюзии (в, е). Верхние ряды – С-сканы (вид сверху), нижние ряды – В-сканы (поперечные сечения сосудов по глубине z). Процентные значения характеризуют долю сосудов в объеме ткани.

разрешение 10 мкм), что позволяет получать более подробные изображения поверхностного сплетения, в то время как большая глубина ОА изображения позволяет визуализировать структуры глубокого сплетения сосудов кожи.

По сравнению с установками, применяемыми для комбинированного исследования сосудов кожи [15–18], ОА микроскоп, использованный в нашей работе, обладал улучшенным пространственным разрешением (50 мкм) благодаря более широкополосной антенне при уменьшенной глубине диагностики (2–3 мм) благодаря лазеру с более короткой длиной волны. Преимуществом используемого в нашей работе прибора ОКТ является возможность визуализации кросс-секционных ангиографических изображений в реальном времени.

Комбинация ОКТ-А и ОА ангиографии позволила одновременно наблюдать изменения двух параметров – общего содержания гемоглобина и скорости кровотока. Результаты, демонстрирующие повышение кровенаполнения на фоне снижения перфузии при проведении окклюзионного теста, уже были продемонстрированы ранее при совместном применении оптической диффузионной спектроскопии и доплерометрии [31, 32]. Результаты нашей работы хорошо согласуются с этими данными. Учитывая тот факт, что реакция микроциркуляторной системы на пережатие в здоровых тканях отличается от таковой при периферических заболеваниях артерий [33, 34], данный подход может быть использован в целях диагностики. Кроме того, высокое разрешение методов дает возможность визуализации индивидуальных сосудов, что может быть использовано для дополнительного наблюдения аномалий их структуры.

В заключение отметим, что параллельное использование ОА методов и ОКТ-А позволило получить взаимодополняющую информацию о структурных и функциональных изменениях микроциркуляторного русла в ходе ок-

клюзионного теста. ОА микроскопия предоставила данные для количественной оценки доли кровенаполненных сосудов в объеме ткани и качественной оценки их формы и положения. Ангиографическая ОКТ дала оценку доли сосудов с функционирующим кровотоком.

Комплементарное исследование тканей *in vivo* методами ОКТ-А и ОА ангиографии проведено при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (Проект № 15-29-04884). Разработка численных алгоритмов, использованных для получения оптико-акустических изображений, осуществлялась при поддержке гранта Российского научного фонда (Проект № 18-45-06006).

1. Rezvani H.R., Ali N., Nissen L.J., Harfouche G., de Verneuil H., Taieb A., Mazurier F. *J. Invest. Dermatol.*, **131**, 1793 (2011).
2. Velasco P., Lange-Asschenfeldt B. *Br. J. Dermatol.*, **147**, 841 (2002).
3. Sorg H., Tilkmorn D.J., Hager S., Hauser J., Mirastschijski U. *Eur. Surg. Res.*, **58**, 81 (2017).
4. Stirban A. *Curr. Diab. Rep.*, **14**, 541 (2014).
5. Dusseldorp J.R., Pennington D.G. *Plast. Reconstr. Surg. Global Open*, **2**, e228 (2014).
6. Wright C.I., Kroner C.I., Draijer R. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, **54**, 1 (2006).
7. Nadort A., Kalkman K., van Leeuwen T.G., Faber D.J. *Sci. Rep.*, **6**, 25258 (2016).
8. Mercep E., Deán-Ben X.L., Razansky D. *Photoacoustics*, **10**, 48 (2018).
9. Izatt J.A., Choma M.A., Dhalla A.H., in *Optical Coherence Tomography* (Springer, Cham, 2015, pp. 65–94).
10. Chen Z., Milner T., Srinivas S., Wang X., Malekafzali A., van Gemert M.J.C., Nelson J.S. *Opt. Lett.*, **22**, 1119 (1997).
11. Быков А.В., Кириллин М.Ю., Приезжев А.В., *Квантовая электроника*, **35**, 1079 (2005) [*Quantum Electron.*, **35**, 1079 (2005)].
12. Yu L., Chen Z. *J. Biomed. Opt.*, **15**, 016029 (2010).
13. Mariampillai A., Standish B.A., Moriyama E.H., Khurana M., Munce N.R., Leung M.K., Jiang J., Cable A., Wilson B.C., Vitkin I.A. *Opt. Lett.*, **33**, 1530 (2008).
14. Jonathan E., Enfield J., Leahy M.J. *J. Biophoton.*, **4**, 583 (2011).
15. Zabihian B., Weingast J., Liu M., Zhang E., Beard P., Pehamberger H., Drexler W., Hermann B. *Biomed. Opt. Express*, **6**, 3163 (2015).
16. Liu M., Chen Z., Zabihian B., Sinz C., Zhang E., Beard P.C., Ginner L., Hoover E., Minneman M.P., Leitgeb R.A., Kittler H., Drexler W. *Biomed. Opt. Express*, **7**, 3390 (2016).
17. Zabihian B., Chen Z., Rank E., Sinz C., Bonesi M., Sattmann H., Ensher J., Minneman M.P., Hoover E., Weingast J., Ginner L., Leitgeb R., Kittler H., Zhang E., Beard P., Drexler W., Liu M. *J. Biomed. Opt.*, **21**, 96011 (2016).
18. Chen Z., Rank E., Meiburger K.M., Sinz C., Hodul A., Zhang E., Hoover E., Minneman M., Ensher J., Beard P.C., Kittler H., Leitgeb R.A., Drexler W., Liu M. *Sci. Rep.*, **7**, 17975 (2017).
19. Favazza C.P., Cornelius L.A., Wang L.V. *J. Biomed. Opt.*, **16**, 026004 (2011).
20. Subochev P., Orlova A., Mikhailova I., Shilyagina N., Turchin I. *Biomed. Opt. Express*, **7**, 3951 (2016).
21. Subochev P., Perekatova V., Kirillin M., Orlova A., Smolina E., Loginova D., Turchin I. *Proc. Int. Conf. Laser Optics (ICLO)* (IEEE, 2018, p. 482).
22. Van de Sompel D., Sasportas L.S., Jokerst J.V., Gambhir S.S. *PLoS One*, **11**, e0152597 (2016).
23. Jaeger M., Schüpbach S., Gertsch A., Kitz M., Frenz M. *Inverse Problems*, **23**, S51 (2007).
24. Oruganti T., Laufer J.G., Treeby B.E. *Proc. SPIE*, **8581**, 85811W (2013).
25. Moiseev A., Ksenofontov S., Sirotkina M., Kiseleva E., Gorozhantseva M., Shakhova N., Matveev L., Zaitsev V., Matveyev A., Zagaynova E., Gelikonov V., Gladkova N., Vitkin A., Gelikonov G. *J. Biophotonics*, **11**, e201700292 (2018).
26. Zhang M., Hwang T.S., Campbell J.P., Bailey S.T., Wilson D.J., Huang D., Jia Y. *Biomed. Opt. Express*, **7**, 816 (2016).
27. Casavola C., Paunescu L.A., Fantini S., Gratton E. *J. Biomed. Opt.*, **5**, 269 (2000).
28. Weller R.P., Hunter J.A., Savin J.A., Dahl M.V. (Eds) *Clinical Dermatology* (Blackwell Publ., 2013, p. 364).
29. Nagashima Y., Yada Y., Hattori M., Sakai A. *Int. J. Biometeorol.*, **44**, 11 (2000).
30. Subochev P., Orlova A., Smolina E., Kirillov A., Shakhova N., Turchin I. *Laser Phys. Lett.*, **15**, 045602 (2018).
31. Strömberg T., Sjöberg F., Bergstrand S. *Microvasc. Res.*, **113**, 50 (2017).
32. Abay T.Y., Kyriacou P.A. *J. Clin. Monit. Comput.*, **32**, 447 (2018).
33. Khalil M.A., Kim H.K., Hoi J.W., Kim I., Dayal R., Shrikhande G., Hielscher A.H. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, **49**, 83 (2015).
34. Alomari M.A., Khabour O.F., Alawneh K., Shammas R.A. *Int. J. Rheumatol.*, **2018**, 8498651 (2018).