

УДК 612.13; 535.8

ВИЗУАЛИЗИРУЮЩАЯ ФОТОПЛЕТИЗМОГРАФИЯ В ЗЕЛЕНОМ СВЕТЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ ЧЕРЕЗ ИНТАКТНЫЙ ЧЕРЕП

Н. П. Подолян¹, И. Г. Агафонова², Э. Нипполайнен¹, Р. В. Ромашко¹,
С. Л. Кузнецов³, И. Н. Завестовская⁴, А. А. Камшилин¹

В настоящей работе впервые продемонстрирована принципиальная возможность оценки изменений параметров кортикального кровотока у мышей через интактную черепную кость во время фармакологических тестов с помощью метода визуализирующей фотоплетизмографии с освещением в зеленой области спектра, что позволяет оценивать эффект проводимых тестов на гемодинамику без предварительного хирургического воздействия на кости черепа. Показано, что введение нитроглицерина может привести как к увеличению кортикального кровотока, так и к его спаду, что свидетельствует о дуализме влияния этого препарата на менингеальную вазомоторную активность.

Ключевые слова: кортикальный кровоток, визуализирующая фотоплетизмография, индекс перфузии, интактный череп, нитроглицерин.

Введение. Одной из самых частых причин инвалидизации и смертности населения являются сосудистые заболевания головного мозга. Эффективность их выявления на ранних стадиях и результативность последующей фармакологической и хирургической терапии во многом зависит от достоверности и точности методов диагностики. В этой

¹ Институт автоматизации и процессов управления ДВО РАН, 690041 Россия, Владивосток, ул. Радио, 5.

² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, 690022 Россия, Владивосток, Проспект 100 лет Владивостоку.

³ Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991 Россия, Москва, ул. Трубецкая, 8.

⁴ ФИАН, 119991 Россия, Москва, Ленинский пр-т, 53; e-mail: podolian@iacp.dvo.ru.

связи актуальной задачей является разработка новых надежных и чувствительных измерительных систем и методов исследования церебральной гемодинамики.

Для оценки параметров церебрального кровотока в клинической медицине используется широкий спектр современных диагностических методов, таких как магнитно-резонансная томография, позитронно-эмиссионная томография, динамическая компьютерная томография, однофотонная эмиссионная компьютерная томография, транскраниальный доплеровский ультразвук, лазерная доплеровская флоуметрия и др.

В большинстве случаев, оценка мозгового кровотока проводится при интактном (не трепанированном) черепе, редким исключением является использование лазерной доплеровской флоуметрии [1, 2] или магнитно-резонансной томографии [3, 4] во время нейрохирургических операций или после черепно-мозговой травмы, хотя такое применение весьма ограничено и малоинформативно. Вместе с тем, во время операции для хирурга очень важно иметь точную и объективную информацию о функциональном состоянии церебральной гемодинамики, состоятельности механизмов ауторегуляции мозгового кровотока в различных физиологических состояниях. Эта необходимость требует создания и отработки адекватных моделей цереброваскулярных нарушений, поиска и исследования новых потенциально активных лекарственных препаратов, оценки их действия и токсичности на экспериментальных животных. Такой подход позволит создать основу для эффективного купирования острых состояний и лечения сосудистых патологий головного мозга, разработки новых методов диагностики и оперативного лечения.

Недавно в экспериментах на крысах было продемонстрировано, что визуализирующая фотоплетизмография (вФППГ) является надёжным и простым в использовании бесконтактным методом оценки функционального состояния корковой сосудистой сети при выполнении фармакологических и физиологических тестов. Метод основан на освещении биологической ткани некогерентным зеленым светом неизменной интенсивности, последующей модуляции интенсивности отраженного света за счет его взаимодействия с эритроцитами и регистрации последовательности изображений области исследования. Он позволяет неинвазивно оценить амплитудно-временные параметры микроциркуляции в зависимости от перфузионного давления и сосудистого тонуса [5–7]. В данных исследованиях, прижизненная видеозапись внутричерепных сосудов животных осуществлялась через краниальные окна (для правого и левого мозговых полушарий) в двух реализациях: с частичным стачиванием теменной кости черепа до оптической прозрачности (закрытое краниальное окно) и с трепанацией черепной кости (открытое краниальное окно). В ходе исследования было установлено, что характер церебральной

гемодинамики в случае закрытого краниального окна может существенно отличаться от гемодинамики при трепанации [5]. Отметим, что создание краниальных окон как в первом, так и во втором случае требует определенного времени, является нетривиальной и технически достаточно сложной хирургической манипуляцией.

В данной работе в качестве объекта изучения выбраны мыши. Как показали наши предварительные исследования, морфология костей черепа данного животного позволяет выполнить оценку мозгового кровотока непосредственно через теменную кость, без её предварительной хирургической подготовки. Исследование выполнено методом вФПГ в зеленом свете, который, как известно, приобретает наибольшую модуляцию на частоте сердцебиений после взаимодействия с биологической тканью, содержащей кровеносные сосуды, и позволяет получить наилучшее отношение сигнал/шум, несмотря на то, что глубина его проникновения не высока [8].

В настоящей работе впервые продемонстрирована возможность оценки параметров церебральной гемодинамики у мышей через интактную черепную кость во время фармакологических тестов с помощью метода визуализирующей фотоплетизмографии с освещением в зеленой области спектра, что позволяет оценивать эффект проводимых тестов на кортикальный кровоток в более естественных условиях.

Анестезия и хирургическая подготовка. Пилотное исследование было проведено на шестимесячном самце линейной лабораторной мыши весом 30 г, подготовленной в виварии Федерального бюджетного учреждения здравоохранения “Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае”. Мышь анестезировали путем внутрибрюшинной (в/б) инъекции раствора ксилазина (Bioveta, Чехия) в дозе 5.5 мг/кг и раствора дроперидола (Дальхимфарм, Россия) в дозе 4 мг/кг. Адекватность анестезии контролировали по отсутствию рефлекса отдергивания после защемления лапы. После достижения хирургического уровня анестезии производилась подготовка операционного поля. На теменную часть головы животного наносился специальный депиляционный состав (триогликолят кальция, гидроксид натрия, эмульгатор, глицерин, смягчающие кожу компоненты) для удаления шерсти и предотвращения её попадания в хирургический разрез, область операции дезинфицировалась. Голова животного фиксировалась в стереотаксическом аппарате, выполнялся разрез кожи скальпа и обнажение черепной кости, мягкие ткани скальпа удалялись. Поверхность открытой черепной кости увлажнялась физиологическим раствором для предотвращения высыхания. Стальные игольчатые электроды вводили в мышечную ткань лап мыши для регистрации электрокардиограммы (ЭКГ) в ходе эксперимента. Для ввода исследуемых лекарственных средств устанавливали в/б

канюлю. На протяжении всех экспериментов температуру животного контролировали и поддерживали в диапазоне 37.5–38 °С с помощью стола с подогревом с механизмом обратной связи. После процедуры подготовки животное отдыхало не менее 20 минут, чтобы минимизировать эффект реакции от манипуляций.

Протокол эксперимента. В общей сложности было выполнено три последовательных эксперимента (на одном животном) по исследованию церебрального кровотока во время провокационной фармакологической пробы с вазодилатирующим (расширяющим кровеносные сосуды) веществом. Продолжительность каждого эксперимента составляла 150 секунд, в течение которых видеокадры внутричерепных структур записывались непрерывно и синхронно с ЭКГ. Фотоплетизмографический (ФПГ) сигнал на исходном уровне регистрировался в течение первых 10 секунд каждого экспериментального сеанса. На десятой секунде с помощью канюли производился постепенный ввод вазодилататора (нитроглицерин (НГЦ), раствор для инфузий, ООО “Озон”, Россия) в/б в дозе 10 мг/кг. Временной промежуток между инъекциями составлял не менее 15 минут.

Экспериментальная установка. Графическая схема экспериментальной установки представлена на рис. 1(а), хронология исследования показана на рис. 1(б). Видеокадры с изображениями мозга животного записывались на расстоянии 15 см от исследуемой области монохромной видеокамерой UI-3060CP-M-GL (Imaging Development Systems GmbH, Германия) с объективом VIS-NIR 67716 (Edmund Optics, США). Запись производилась с частотой 100 кадров в секунду и разрешением 760 × 470 пикселей. Камера была размещена в центре осветительного модуля, состоящего из четырех колец диодной ленты (250 светодиодов, излучающих на длине волны 530 ± 25 нм) и жестко закреплена на штативе (Manfrotto, Италия) для точного позиционирования. Чтобы уменьшить влияние бликов на измеряемый видеосигнал, излучение светодиода было линейно поляризовано, и отраженный свет проходил через поляризационную пленку с ортогональной ориентацией оси пропускания. Одновременно цифровой электрокардиограф (модель Кардиотехника-ЭКГ-8, ООО “Инкарт”, Санкт-Петербург, Россия) записывал электрокардиограмму мыши в двух отведениях с частотой дискретизации 1 кГц. Регистрируемые видеокадры и ЭКГ синхронизировались по времени с точностью до 1 мс и записывались на жесткий диск персонального компьютера.

Обработка данных. Записанные видеокадры и данные ЭКГ анализировались в режиме постобработки с использованием специального программного обеспечения, реализованного на платформе MATLAB (Версия R2020a, The MathWorks, Inc., США). Анализ проводился по всей поверхности открытой черепной кости, исключая участки с неком-

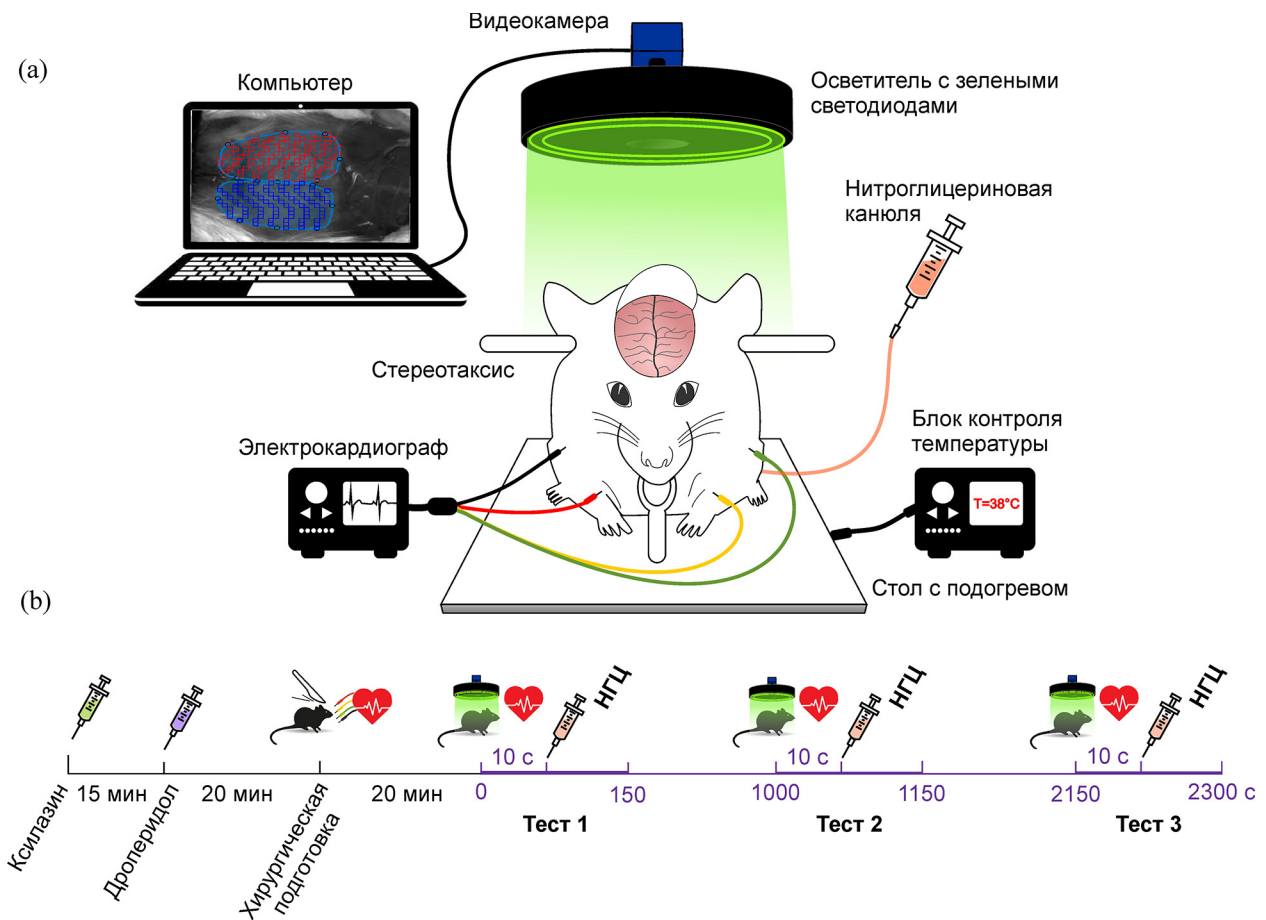


Рис. 1: Графическая схема эксперимента и протокола измерений. (а) Схема вФПГ установки для мониторинга реакции кровотока во внутричерепных сосудах головного мозга мыши на введение НГЦ. Мышь располагалась на столе с контролируемым подогревом, голова животного фиксирована в стереотаксическом аппарате, в мышцы лап введены стальные игольчатые электроды. Ввод НГЦ осуществляется через в/б канюлю. Видеокадры в зеленом освещении регистрировались синхронно с ЭКГ и записывались в память компьютера. (б) Хронология экспериментального исследования.

пенсированными бликами. В каждый момент времени форма сигнала ФПГ оценивалась в каждом пикселе записанных видеоизображений по алгоритму, подробно описанному в работах [5, 7]. Вкратце, обработка начиналась со стабилизации цифрового изображения с использованием алгоритма секторного оптического потока [9], затем форма сигнала ФПГ для каждой точки изображения вычислялась как покадровая эволюция значения пикселя и нормализовалась путем расчета соотношения переменного компонента на частоте сердцебиений (AC) и медленно меняющегося (DC) компонента полученного

сигнала. Длительность каждого сокращения сердца определяли по R-пикам синхронно записываемой ЭКГ. После этого путем усреднения сигналов 15 последовательных сердечных сокращений рассчитывалась форма усреднённого сигнала ФПГ. Наконец, индекс перфузии (ИП) рассчитывался как разница между максимальным и минимальным значениями среднего импульса ФПГ. Параметр ИП сначала рассчитывался в каждом пикселе, а затем усреднялся по выбранной области интереса, например, по правому и левому полушарию. Частоту сердечных сокращений (ЧСС) оценивали по данным ЭКГ в те же моменты времени.

Результаты и выводы. Для всех трех последовательно выполненных тестов с НГЦ получены экспериментальные данные, напрямую отражающие физиологические процессы гемодинамики и воздействие вводимого препарата на сосудистый кровоток мозга мыши. На рис. 2 представлено временное изменение ИП и ЧСС ((a), (c) и (b), (d)) и карты пространственного распределения ИП в начале (1) и в конце (2) проведения двух последовательных фармакологических тестов с введением НГЦ.

Ввод препарата выполнялся на 10-й секунде с момента начала видеозаписи каждого теста. Из рис. 2(a) видно, что примерно через 30 секунд после ввода вазодилататора наблюдается существенное снижение ИП со значения $\sim 0.27\%$ на базальном уровне до $\sim 0.19\%$ на третьей минуте эксперимента. Карты пространственного распределения ИП (1) и (2) в псевдоцветах (оранжевым – максимальное и синим – минимальное значение) представлены для 5–9 и 130–134 секунды эксперимента, соответственно. Как видно, изменение кровотока значительно на всей исследуемой области, что вызвано, по-видимому, резким спадом артериального давления (АД) в сосудах головного мозга после введения НГЦ. Снижение АД компенсируется ростом ЧСС (рис. 2(b)). Так, на базальном уровне среднее значение ЧСС составляло 239 уд/мин, а через две минуты после введения НГЦ – возросло до 325 уд/мин, что является косвенным признаком действия вазодилататора на сосудистую систему.

Второе введение НГЦ, как видно из графика на рис. 2(c) привело к возрастанию ИП с базальных $\sim 0.18\%$ до $\sim 0.28\%$ к концу теста. На картах распределения (1) и (2), представленных для 1005–1009 и 1130–1134 секунды, соответственно, четко видна тенденция к росту ИП. Средняя ЧСС при этом остается высокой в течение всего теста – 356 уд/мин и незначительно меняется к концу эксперимента (рис. 2(d)). Последующее, третье введение вазодилататора не привело к изменению индекса перфузии, его уровень составил $\sim 0.23\%$, среднее значение ЧСС – 346 уд/мин.

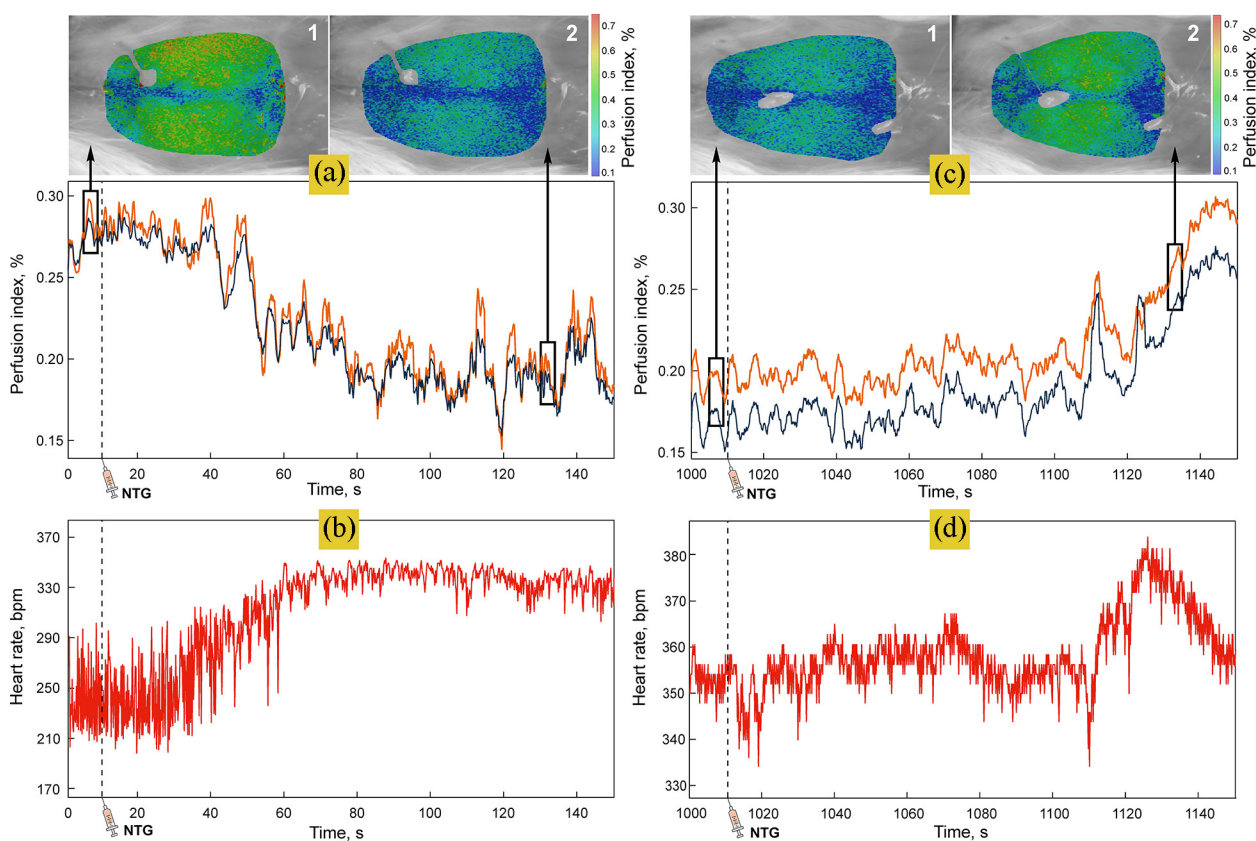


Рис. 2: Экспериментальные зависимости, полученные при выполнении двух последовательных фармакологических тестов с внутрив брюшинным введением НГЦ. (а) временная зависимость ИП (оранжевым цветом – для правого полушария мозга, синим – для левого) и ЧСС – (b), (1) и (2) – карты пространственного распределения ИП до и после первого введения НГЦ, соответственно. (с) временная зависимость ИП (оранжевым – для правого полушария мозга, синим – для левого) и ЧСС – (d), (1) и (2) – карты пространственного распределения ИП до и после второго введения НГЦ.

Представленные в настоящей работе результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными, полученными в недавно опубликованной работе по исследованию действия вазодилататора на мозговой кровоток у крыс [9], где показано, что введение НГЦ может привести как к увеличению индекса перфузии, так и к его спаду, что свидетельствует о дуализме влияния этого препарата на менингеальную вазомоторную активность.

Таким образом, в настоящей работе впервые продемонстрирована принципиальная возможность оценки изменений параметров кортикального кровотока через интактную

черепную кость во время фармакологических (потенциально и физиологических) тестов, что позволяет оценивать эффект проводимых тестов на кортикальный кровоток в более естественных условиях.

Коллектив авторов благодарит сотрудников ИАПУ ДВО РАН Ефимова Т. А., Никитина Н. В. за помощь в разработке и создании элементов экспериментальной установки и Белавенцеву А. В. за помощь в проведении экспериментальных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-65-00096) в части доработки системы вФППГ и компьютерного программного обеспечения для обработки экспериментальных данных, а также Министерства образования и науки РФ (тема научного исследования: 122040400018-6) в части проведения экспериментального исследования и теоретического анализа полученных результатов.

Животного содержали в стандартных условиях при естественном световом режиме (12-часовом цикле свет/темнота) и свободном доступе к воде и пище. Перед проведением эксперимента животного выдерживали на голодной диете не менее 12 часов, в день исследования питьё ограничивали. Эксперименты проводились в соответствии с этическими принципами Международной ассоциации по изучению боли, Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета о защите животных, используемых в научных целях. Протокол исследования одобрен решением локального этического комитета (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток, протокол № 02/23 от 27.02.2023 г.). Были приложены все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животного.

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] B. R. Rosenblum, R. F. Bonner, E. H. Oldfield, *J. Neurosurg* **66**(3), 396 (1987). DOI: 10.3171/jns.1987.66.3.0396.
- [2] P. Castro, E. Azevedo, F. Sorond, *Curr. Atheroscler. Rep.* **20**(8), 37 (2018). DOI: 10.1007/s11883-018-0739-5.
- [3] J. Fierstra, J.-K. Burkhardt, C. H. B. van Niftrik, et al., *Magn. Reson. Med.* **77**(2), 806 (2017). DOI: 10.1002/mrm.26135.
- [4] G. Muscas, C. H. B. van Niftrik, J. Fierstra, et al., *Neurosurg. Focus* **46**(2), E7 (2019). DOI: 10.3171/2018.11.FOCUS18502.
- [5] O. V. Mamontov, A. Y. Sokolov, M. A. Volynsky, et al., *Sci. Rep.* **10**(1), 19008 (2020). DOI: 10.1038/s41598-020-75824-w.

- [6] O. A. Lyubashina, O. V. Mamontov, M. A. Volynsky, et al., *Front. Neurosci.* **13**, 1235 (2019). DOI: 10.3389/fnins.2019.01235.
- [7] A. A. Kamshilin, T. V. Krasnikova, M. A. Volynsky, et al., *Sci. Rep.* **8**(1), 13663 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-32036-7.
- [8] A. A. Kamshilin, O. V. Mamontov, *Physiological origin of camera-based PPG imaging*, In: Wang W, Wang X, eds. *Contactless Vital Signs Monitoring*. London: Academic Press, pp. 27–50 (2022). DOI: 10.1016/B978-0-12-822281-2.00010-X.
- [9] A. Y. Sokolov, M. A. Volynsky, A. V. Potapenko, et al., *Sci. Rep.* **13**, 11928 (2023). DOI: 10.1038/s41598-023-39171-w.

Поступила в редакцию 5 ноября 2023 г.

После доработки 30 ноября 2023 г.

Принята к публикации 1 декабря 2023 г.