

Володин П.Л., Иванова Е.В., Соломин В.А.

Возможности современных методов диагностики и компьютерной обработки данных с помощью программы «Фемтоскан» для выявления слабых термических повреждений клеток ретинального пигментного эпителия

Volodin P.L., Ivanova E.V., Solomin V.A.

Possibilities of modern diagnostic techniques and computer data processing using «FemtoScan» programs for revealing weak thermal injuries in cells of the retinal pigment epithelium

ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России, г. Москва

Цель. Оценить возможности и разрешающую способность современных методов диагностики с компьютерной обработкой изображений при помощи программы «Фемтоскан» для выявления слабых термических повреждений ретинального пигментного эпителия (РПЭ). **Методы исследования.** Для определения порогового термического повреждения РПЭ наносили несколько аппликаций селективным микроимпульсным режимом на лазере IQ 577 (IRIDEX). Проводили цифровую фоторегистрацию в отраженном инфракрасном свете, исследование аутофлюоресценции (АФ), флюоресцентную ангиографию. Для оценки результатов анализировали участки сетчатки с определенным типом воздействия, подсчитывали количество видимых лазерных аппликаций, определяли пороги повреждения РПЭ с различной поверхностной плотностью энергии (ЕД), сравнивали уровень фона тестируемой и контрольных зон. Для усиления контрастности и эффективности визуализации использовали метод вычитания и обработки изображений с помощью компьютерной программы «Фемтоскан». **Результаты.** Термическое повреждение РПЭ определялось начиная с ЕД 1270 мДж/см² (1 импульс, 2 Вт, 50 мкс, 100 мкм) на коротковолновой АФ с вычитанием фона после обработки изображений программой «Фемтоскан». Применение нескольких импульсов в пакете приводит к повышению ЕД с увеличением вероятности визуализации. Метод «Фемтоскан» повышает в 2 раза вероятность визуализации слабых участков лазерного воздействия. **Заключение.** Наиболее чувствительным методом диагностики для выявления воздействия на РПЭ селективным микроимпульсным режимом является коротковолновая аутофлюоресценция (488 нм). Повреждение РПЭ определяется при прозрачных оптических средах и средней степени пигментации глазного дна начиная с ЕД 1270 мДж/см². **Ключевые слова:** микроимпульсное селективное лазерное воздействие, «Фемтоскан», пигментный эпителий сетчатки.

Purpose. To assess possibilities and resolution capacity of modern diagnostic techniques with computer image processing using «FemtoScan» programs for identifying weak thermal injuries in the retinal pigment epithelium (RPE). **Materials and methods.** For determining the threshold of RPE thermal injury, several applications were put using selective micropulse mode of IQ 577 laser (IRIDEX). Digital photo registration in the reflected infrared light, autofluorescent (AF) assessment, fluorescent angiography were made. To evaluate the results, the researchers analyzed retina zones after various exposures, counted the number of visible laser applications, determined RPE damage thresholds with different surface energy density (ED), compared background levels in the tested and control zones. To enhance the contrast and visualization efficiency, the subtraction and image processing technique using «FemtoScan» computer program was used. **Results.** Thermal damage to RPE was registered starting from ED 1270 mJ/cm² (1 pulse, 2 W, 50 μs, 100 μm) at short-wave AF with the background subtraction after image processing by «FemtoScan» program. Several pulses in the package increase ED with higher probability for visualization. «FemtoScan» technique increases the probability of visualization of the weakest areas of laser exposure by two folds. **Conclusion.** Short-wave autofluorescence (488 nm) is the most sensitive diagnostic technique for detecting the impact of selective micropulse mode at RPE. Damage to RPE is seen in transparent optical media and medium pigmentation degree starting from ED 1270 mJ/cm². **Keywords:** micropulse selective laser treatment, «FemtoScan», retinal pigment epithelium.

Введение

В основе развития дистрофических заболеваний макулярной области сетчатки, приводящих к снижению центральных зрительных функций, лежат морфофункциональные изменения ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и хориоретиального комплекса (ХПК). Перспективным направлением в лечении данной патологии является применение тканесберегающих методов лазерного лечения. Этим требованиям в наибольшей степени соответствует микроимпульсный режим, реализуемый на современных серийных лазерных установках [2, 4, 6–8]. Для успешного и безопасного лечения необходимо достигнуть прицельного избирательного повреждения РПЭ. Поэтому очень важно определить значение поверхностной плотности энергии (ЕД), достаточной для термического воздействия на РПЭ [4]. Для регистрации лазерных аппликаций нужно использовать возможности оборудования, позволяющие зафиксировать различные

повреждения ХПК. Сложной задачей является определение порогового воздействия на РПЭ, так как современные диагностические приборы не обладают достаточной разрешающей способностью.

В настоящее время наиболее информативным диагностическим методом, позволяющим визуализировать изменения структуры РПЭ, является конфокальная сканирующая лазерная офтальмоскопия (СЛО). При создании конфокального изображения снижается интерферирующее рассеянное световое излучение от соседних структур и увеличивается контрастность. Свет с различной длиной волны по-разному проникает и отражается различными структурами сетчатки. Следовательно, на одном и том же глазном дне выявляются различные изменения ретинальной ткани при цветной цифровой фоторегистрации, снимках в инфракрасном (ИК) и бесцветном свете и исследовании флюоресценции с помощью конфокальной СЛО. В зависимости от поставленных задач

целесообразно применять различные методы визуализации, каждый из которых несет важную диагностическую информацию. Так, в отраженном ИК-свете выявляются поражения РПЭ и сетчатки, которые не определяются по результатам других методов получения изображений. Флюоресцентная ангиография (ФАГ) глазного дна позволяет определить дефекты, повреждение клеток РПЭ, а также нарушения контактов между клетками [9, 10]. Аутофлюоресценция (АФ) и ее интенсивность зависят от содержания флуорофоров в гранулах липофусцина, отражают метаболическое состояние РПЭ и выявляют участки с активными дегенеративными процессами. Поэтому данный метод может быть рекомендован к применению при неэкссудативных поражениях ХРК и метаболических изменениях РПЭ [9, 14].

Вместе с тем на цифровых изображениях, полученных в результате стандартных диагностических исследований, нередко сложно различить тонкие дефекты и изменения картины после лазерного воздействия на ткань, в особенности в субпороговом режиме. В настоящее время в различных областях науки и техники получили широкое распространение компьютерные программы, позволяющие повысить качество изображений исследуемого объекта после цифровой обработки, одной из которых является программа «Фемтоскан». Эта программа предназначена для анализа изображений сканирующей зондовой микроскопии, электронной и оптической микроскопии и прочих изображений в стандартных форматах. Таким образом, для повышения разрешающей способности диагностических приборов в офтальмологии представляется интересным использовать компьютерную обработку полученных данных.

Цель исследования – оценить возможности и разрешающую способность современных методов диагностики с компьютерной обработкой изображений при помощи программы «Фемтоскан» для выявления слабых термических повреждений клеток РПЭ.

Материал и методы

Для определения порогового повреждения РПЭ проводили цифровую фоторегистрацию в отраженном ИК-свете (820 нм), исследование коротковолновой АФ (488 нм), ФАГ и оптическую когерентную томографию (ОКТ) на ретиноангиографе Spectralis® HRA с программным пакетом ОКТ (Heidelberg Engineering, Германия). Дополнительно выполняли цветную фоторегистрацию глазного дна на ретинальной камере Visucam (Zeiss, Германия). Воздействие на клетки РПЭ осуществляли селективным микроимпульсным режимом. Для этого с помощью компьютерного моделирования были определены диапазоны энергетических параметров, оказывающие подпороговое, пороговое и надпороговое воздействия [1, 5].

Исследование проведено на 7 пациентах в возрасте от 32 до 47 лет с центральной серозной хориоретинопатией, которым подбирали индивидуальные энергетические параметры, необходимые для лечения заболевания. Во всех случаях оптические среды были прозрачны и отмечалась средняя степень пигментации глазного дна. Предварительно, до нанесения повреждающего воздействия на РПЭ, выполняли цветную фоторегистрацию

глазного дна. Затем получали качественные изображения в отраженном ИК-свете (820 нм) и исследование АФ (488 нм). Для достижения контрастных снимков фоторегистрацию проводили многократно, с разными точками фокусировки и углами поворота камеры. Затем осуществляли воздействие на РПЭ с помощью 6 селективных микроимпульсных режимов на лазере IQ 577 (IRIDEX). Параметры воздействия: длительность микроимпульса – 50 мкс, количество микроимпульсов в пакете – 1–3, интервал между импульсами – 10 000 мкс, диаметр пятна – 50–100 мкм, мощность – 1,5–2 Вт. Аппликаты наносили в области верхней или нижней сосудистой аркады.

После тестирования выполняли фоторегистрацию глазного дна в отраженном ИК-свете, исследование АФ, ФАГ, ОКТ и цветную фоторегистрацию глазного дна. Для оценки результатов тестирования проводили прямое и не прямое (косвенное) измерение. Анализировали участки сетчатки с определенным типом воздействия, подсчитывали количество видимых лазерных аппликатов, определяли пороги повреждения РПЭ с различной поверхностной плотностью энергии (ED) по алгоритму, примененному в работе по определению механизмов и различных типов повреждения клеток РПЭ [13]. Прямое измерение и статистическая обработка результатов проведены на 210 аппликатах. Дополнительно для косвенного измерения нанесено по 30 аппликатов на тестируемую зону для 3 режимов.

При прямом измерении оценивали качество визуализации аппликатов и выставляли вес. Если аппликат не визуализировался, то выставлялся вес 0. В затруднительном случае, когда сложно было выявить аппликат, оценивали как вес 0,5. При наличии четкого очага в зоне воздействия – вес 1. Затем подсчитывали сумму веса нанесенных аппликатов и результаты вносили в соответствующие таблицы по каждому методу диагностики. Поскольку на флюоресцентных ангиограммах определить участки воздействия на представленных параметрах прямым способом достаточно затруднительно, то эффективность воздействия оценивали с помощью непрямого (косвенного) измерения. Для этого выделяли несколько контрольных и одну тестируемую зону. Наносили 30 аппликатов в выбранном режиме на тестовую зону. Затем сравнивали уровень фона тестируемой и контрольных зон на снимках, полученных с помощью сканирующей лазерной офтальмоскопии. Для усиления контрастности и эффективности визуализации использовали метод вычитания и обработки изображений с помощью компьютерной программы «Фемтоскан».

Результаты исследования и обсуждение

При биомикроофтальмоскопии и цветной фоторегистрации глазного дна видимых изменений после лазерного воздействия в диапазоне вышеуказанных параметров ни в одном случае отмечено не было. На ОКТ повреждения РПЭ также не определялись. Следовательно, данные методы не обладают достаточной чувствительностью для визуализации слабого термического повреждения РПЭ. Характерные изменения ХРК удалось зафиксировать на снимке в отраженном ИК-свете и при исследовании АФ.

Таблица

Вероятность визуализации (частота выявления) лазерных аппликатов различными диагностическими методами до и после вычитания и обработки изображений программой «Фемтоскан» при различных параметрах микроимпульсного режима

Режимы	1	2	3	4	5	6
Параметры	100 мкм, 1,5 Вт, 1 импульс	100 мкм, 2,0 Вт, 1 импульс	100 мкм, 1,5 Вт, 3 импульса	100 мкм, 2,0 Вт, 2 импульса	50 мкм, 1,5 Вт, 1 импульс	50 мкм, 2,0 Вт, 1 импульс
ED, мДж/см ²	960	1270	$\sim 960 \times \sqrt{3}$	$\sim 1270 \times \sqrt{2}$	3820	5100
ИК (820 нм)	0,00	0,00	0,04	0,14	0,14	0,35
ИК + «Фемтоскан»	0,00	0,02	0,13	0,27	0,27	0,58
Кв-АФ (488 нм)	0,00	0,01	0,07	0,29	0,29	0,74
Кв-АФАФ + «Фемтоскан»	0,00	0,02	0,14	0,50	0,40	0,88

Поэтому на полученных изображениях анализировали участки сетчатки с определенным типом воздействия, определяли количество и качество видимых аппликатов при использовании различных режимов (9). Для каждого метода диагностики результаты вносились в соответствующие таблицы: снимок в отраженном ИК-свете (820 нм); снимок в отраженном ИК-свете (820 нм) после вычитания и обработки изображений программой «Фемтоскан»; исследование коротковолновой АФ (Кв-АФ) (488 нм); исследование Кв-АФ (488 нм) после вычитания и обработки изображений программой «Фемтоскан». Затем все данные были объединены в одну итоговую таблицу, где количество аппликатов было преобразовано в вероятность их визуализации (табл.).

Исходя из данных, представленных в таблице, в изучаемых режимах наблюдаются переходные процессы. При минимальных значениях ED вероятность обнаружения аппликатов равна 0, а с повышением энергии воздействия увеличивается и приближается к 100%. При ED 960 мДж/см² в режиме единичного импульса повреждения РПЭ невозможно зафиксировать ни одним из имеющихся методов получения изображений. Однако по результатам компьютерного моделирования при таких значениях происходит термическая денатурация РПЭ [4, 13]. При дальнейшем повышении мощности (режим 2) удалось зарегистрировать возмущения в зоне лазерного воздействия. Таким образом, минимальный порог воздействия, который определялся представленными

прямыми методами измерения при прозрачных оптических средах и средней степени пигментации глазного дна, составил ED 1270 мДж/см². Применение нескольких импульсов в пакете приводит к повышению ED [3, 12]. Поэтому в режимах 3 и 4 увеличилась вероятность обнаружения аппликатов (табл.). Таким образом, термическое повреждение РПЭ зарегистрировано на снимке в отраженном ИК-свете, АФ, а также на поздней фазе ФАГ. Важно отметить, что обработка изображений программой «Фемтоскан» повышает вероятность визуализации аппликатов практически в 2 раза (рис. 1).

Дальнейшее повышение ED или применение большего количества импульсов в пакете приводит к тому, что лазерное воздействие можно отчетливо визуализировать на снимке в отраженном ИК-свете, АФ и ФАГ (ранняя и поздняя фазы). В режимах 5 и 6 воздействие более сильное, происходит разрушение меланина и физическое повреждение клетки РПЭ, что подтверждается просветом хориоидеи на ранней фазе ФАГ. Появляется окончательный дефект РПЭ в зоне лазерного воздействия, через который просвечивается покрашенная сосудистая оболочка.

Таким образом, наиболее чувствительным методом диагностики слабых термических повреждений РПЭ является коротковолновая АФ с вычитанием фона после обработки изображений программой «Фемтоскан». Изменения в ХПК для селективного микроимпульсного режима лазера IRIS Medical IQ 577 определялись с ED

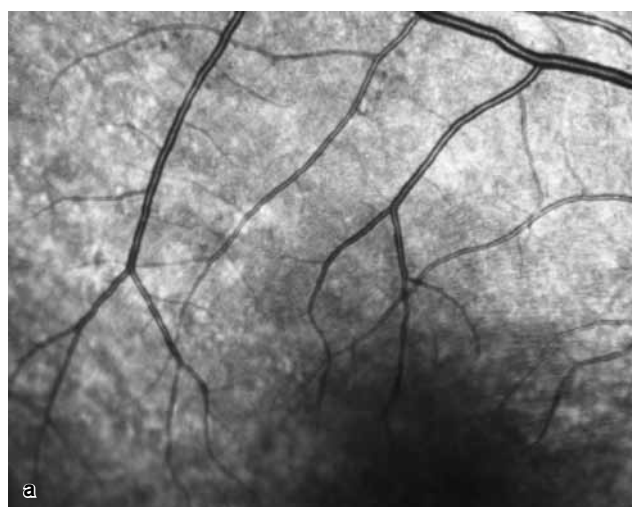


Рис. 1. Пример обработки изображения с помощью программы «Фемтоскан». Снимок в отраженном ИК-свете: а – через 2 часа после тестирования; б – через 2 часа после тестирования и обработки изображений «Фемтоскан»

1270 мДж/см². Возможно, причина заключается в том, что АФ зависит от содержания флюорофоров в гранулах липофусцина, сконцентрированных преимущественно во внутреннем слое РПЭ, который наиболее сильно прогревается и поражается лазерным излучением, чем ниже расположенные структуры. Поэтому изменения структуры ХРК слабее затенены, более контрастны и лучше визуализируются. Для низких энергетических параметров применение вычитания и обработки изображений компьютерной программой «Фемтоскан» повышает чувствительность метода приблизительно в 2 раза. Однако, как показала практика, большое значение имеет качество фотографий, как исходной, так и после тестирования. При наличии четких и контрастных снимков, возможности полного совмещения обоих изображений до и после воздействия метод становится особенно наглядным и эффективным.

Для проверки, является ли ED 1270 мДж/см² пороговой для воздействия на клетки РПЭ, а также для уточнения чувствительности метода диагностики мы применили косвенное измерение на поздней фазе ФАГ для 3 режимов. Для этого дополнительно нанесли сетку из 30 лазерных аппликатов на зону, одиночным импульсом, длительность 50 мкс, диаметром 100 мкм с различной мощностью – 1,0 Вт, 1,5 Вт и 2,0 Вт. Отбирались 4 контрольных и одна тестовая зона. В тестовой зоне наносилось 30 лазерных аппликатов, не перекрывая друг друга. Проводилась ФАГ с регистрацией большого количества изображений, начиная с первой секунды введения красителя. Затем отбирался 1 снимок на ранней фазе (15–30 с) и 1 снимок – на поздней фазе (более

5 мин). После чего изображения совмещались таким образом, чтобы все пять зон максимально совпали. Затем из поздней стадии вычиталась ранняя как контрольное изображение с такими коэффициентами, чтобы средняя дельта яркости пикселей в контрольных зонах была равна 0. Высчитывалась разница средней яркости пикселей тестовой и контрольной зон, а также p-value.

При проведении ФАГ в ранних фазах (менее 1,5 минуты) патологическая флюоресценция не определялась ни в одной из исследуемых зон. Следовательно, полное разрушение клеток РПЭ в области приложения лазерного излучения не произошло, так как отсутствовал характерный (предполагаемый) окончательный дефект, соответствующий точке нанесения лазерного аппликата. По-видимому, в зоне воздействия меланопротеиновые гранулы сохранились в достаточном количестве и блокировали флюоресценцию подлежащей хориоидеи [9]. В поздней фазе ФАГ (от 2 до 8 мин) для ED 1270 мДж/см² отмечалось наглядное изменение фона, особенно заметное после обработки программой «Фемтоскан». В данной методике тестирования для режима с мощностью 2 Вт наблюдалось значимое изменение фона ($p = 0$), а в режимах 1,0 и 1,5 Вт – незначимое (рис. 2, 3).

Выявлялась диффузная флюоресценция на участках, где были нанесены лазерные аппликаты, то есть интенсивность флюоресценции тестовой зоны была прямо пропорциональна объему проникшего красителя, а диффузия красителя пропорциональна площади воздействия. Скорее всего, в результате воздействия произошли изменения транспортных характеристик клеток с нарушением наружного гематоретинального

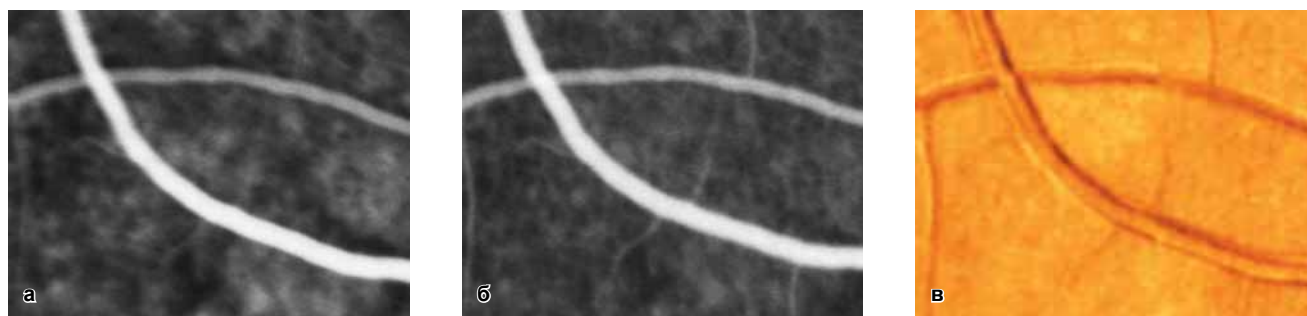


Рис. 2. Флюоресцентная ангиография (30 импульсов на зону; мощность – 1,5 Вт, диаметр пятна – 100 мкм, 1 импульс): а – ранняя фаза 0,27 с, флюоресценция отсутствует; б – поздняя фаза 2,32 с, флюоресценция отсутствует; в – поздняя фаза 2,35 с после обработки программой «Фемтоскан», поздняя фаза 2,32 с – флюоресценция отсутствует

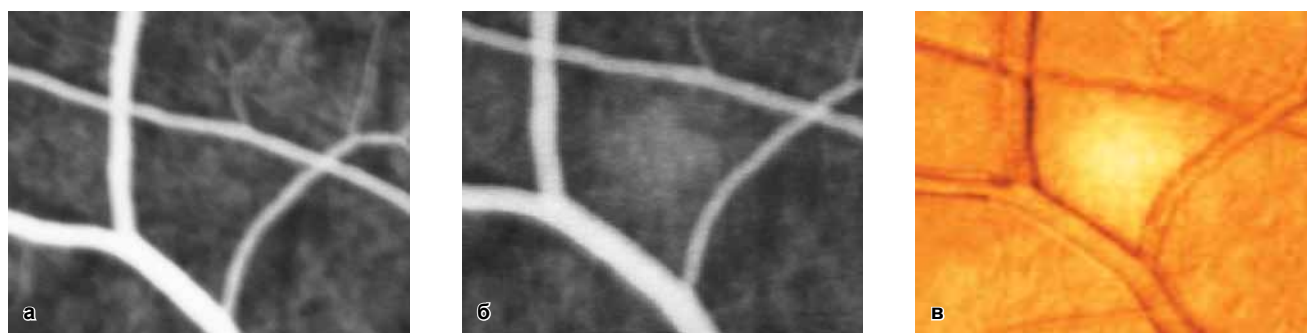


Рис. 3. ФАГ (30 импульсов на зону; мощность 2,0 Вт, диаметр пятна 100 мкм, 1 импульс): а – ранняя фаза 0,28 с, флюоресценция отсутствует; б – поздняя фаза 2,35 с, отмечается диффузная флюоресценция в зоне лазерного воздействия; в – поздняя фаза 2,35 с после обработки программой «Фемтоскан», поздняя фаза 2,35 с – флюоресценция видна лучше



Рис. 4. Пример восстановления ХРК через месяц после тестирования: а – АФ через 2 часа после тестирования; б – АФ + «Фемтоскан» через 2 часа после тестирования; в – АФ через 1 месяц после тестирования

барьера [9]. Для более детального анализа наблюдаемого феномена необходимо привлекать данные по фармакокинетике вводимого внутривенно флюоресцеина натрия. Таким образом, и эта методика указывает, что ED около 1300 мДж/см² является пороговой.

Во всем диапазоне применяемых энергетических параметров микроимпульсного режима видимые изменения на глазном дне отсутствовали. Через месяц после лазерного воздействия отмечено восстановление структур ХРК, аппликаты не выявлялись (рис 4).

Выводы

1. Современные методы визуализации глазного дна позволяют начать диагностировать термическое повреждение РПЭ лазерным излучением в микроимпульсном режиме при прозрачных оптических средах и средней степени пигментации глазного дна по достижении поверхностной плотности энергии 1270 мДж/см².
2. Коротковолновая аутофлюоресценция (488 нм) является наиболее чувствительным способом определения слабых термических повреждений РПЭ. Поэтому данный метод диагностики предпочтительно использовать для выявления воздействия на РПЭ селективным микроимпульсным режимом.
3. Применение метода вычитания и цифровой обработки изображений программой «Фемтоскан» повышает чувствительность визуализации участков лазерного воздействия на снимках в отраженном ИК-свете и АФ приблизительно в 2 раза и значительно увеличивает разрешающую способность диагностических приборов.

Литература

1. Володин П.Л., Желтов Г.И., Иванова Е.В., Соломин В.А. Калибровка параметров микроимпульсного режима лазера IRIDEX IQ 577 с помощью компьютерного моделирования и методов диагностики глазного дна // Современные технологии в офтальмологии. – 2017. – № 1. – С. 52–54.
2. Володин П.Л., Иванова Е.В., Соломин В.А., Письменская В.А., Хрисанфова Е.С. Первый опыт применения селективного микроимпульсного лазерного воздействия (577 нм) с индивидуальным подбором параметров у пациентов с острой центральной серозной хориоретинопатией // Практическая медицина. – 2017. – Т. 2. – № 9 (110). – С. 55–59.
3. Желтов Г.И., Глазков В.Н., Иванова Е.В. Селективное действие лазерных импульсов на ретиальный пигментный эпителий. Физические основы // ARS-MEDICA. – 2012. – № 3 (58). – С. 78–85.
4. Иванова Е.В. Влияние лазерного лечения на структурно-функциональные нарушения центральной зоны сетчатки, выявленные после микроинвазивной эндовитреальной хирургии отслойки сетчатки: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2010. – 153 с.
5. Качалина Г.Ф., Желтов Г.И., Иванова Е.В. Оптимизация режимов лазера IRIS Medical IQ 577 для избирательного воздействия на пигментный эпителий сетчатки // Офтальмология. Восточная Европа. – 2015. – № 4 (27). – С. 69–77.
6. Качалина Г.Ф., Желтов Г.И., Иванова Е.В. Современные подходы применения микроимпульсного режима при лечении заболеваний центральной зоны сетчатки // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15. – № 3-3. – С. 225–227.
7. Тахчиди Х.П., Качалина Г.Ф., Желтов Г.И., Иванова Е.В. Новая технология восстановления зрительных функций, основанная на избирательном воздействии коротких импульсов лазерного излучения на пигментный эпителий сетчатки // Офтальмология в Беларуси. – 2010. – № 4 (07). – С. 79–83.
8. Тахчиди Х.П., Качалина Г.Ф., Желтов Г.И., Касмынина Т.А., Горшков И.М., Иванова Е.В. Эффективность новой лазерной технологии микроимпульсного воздействия в лечении структурно-функциональных нарушений после эндовитреальной хирургии отслойки сетчатки // Офтальмохирургия. – 2010. – № 2. – С. 35–41.
9. Хайман Х., Кельнер У., Ферстер М. Атлас по ангиографии глазного дна // М.: МЕДпрессинформ, 2008. – 192 с.
10. Framme C., Schüle G., Brinkmann R. et al. Fundus autofluorescence after selective RPE laser treatment // Ophthalmology. – 2002. – Vol. 99. – № 11. – P. 854–860.
11. Ivanova E.V., Volodin P.L., Zheltov G.I. New technique of treatment acute central serous chorioretinopathy based on selective influence of short laser pulses on retinal pigment epithelium // European Journal of Ophthalmology. – 2017. – Vol. 27. – Issue 2. – Mar-Apr 2017. – P. 67e.
12. Roeder J., Hillenkamp F., Flotte T.J., Birngruber R. Microphotocoagulation: selective effects of repetitive short laser pulses // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90. – P. 8643–8647.
13. Schuele G., Rumohr M., Huettmann G., Brinkmann R. RPE damage thresholds and mechanisms for laser exposure in the microsecond-to-millisecond time regimen // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2005. – Vol. 46. – № 2. – P. 714–719.
14. Yung M., Klufas M.A., David S. Clinical applications of fundus autofluorescence in retinal disease // International Journal of Retina and Vitreous. – 2016. – Vol. 2. – № 12. – P. 1–25.

Поступила в редакцию 27.12.17 г.

Для контактов: Володин Павел Львович
E-mail: volodinpl@mntk.ru