ИМПУЛЬСНЫЙ РЕЖИМ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЛУПРОВОДНИКОВОГО ЛАЗЕРА С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 445 НМ В ФОНОХИРУРГИИ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

М.А. Рябова[1], Л.Б. Митрофанов[2], М.Ю. Улупов[1], В.А. Степанова[1], К.А. Стерхова[2]
[1]ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
[2]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Представлены результаты экспериментального исследования, посвященного выбору оптимального режима импульсного контактного лазерного воздействия полупроводникового лазера с длиной волны 445 нм в хирургии голосовых складок. Эндоларингеальная фонохирургия позволяет максимально сохранить анатомически и функционально значимые структуры гортани в сочетании с радикальностью вмешательства. С позиции мукоундулярной теории голосообразования волнообразные колебания голосовых складок возможны за счет подвижности покровного слоя голосовой складки относительно ее тела. Следовательно любая травматизация на уровне покровного слоя сопряжена с риском его избыточного рубцевания и потерей способности к волнообразному скольжению. Голосовые складки свиньи, по данным ряда авторов, имеют схожее строение с человеческими как по гистологическому строению (толщина слоев, соотношение коллагеновых и эластических волокон), так и по акустическим параметрам, что обосновывает рациональность их использования в качестве экспериментальной модели. В серии экспериментов с использованием лазера с длиной волны 445 нм проведены контактные импульсные воздействия на биологическую модель с длительностью импульсов 10, 20, 50 и 100 мс с последующей оценкой по данным гистологических срезов следующих параметров: глубина и ширина кратера абляции, ширина зоны бокового термического повреждения. Установлены наиболее оптимальные для фонохирургических вмешательств режимы импульсных воздействий лазера с длиной волны 445 нм.

Ключевые слова: фонохирургия, лазер с длиной волны 445 нм, дисфония, лазерная хирургия, ларингология.

Контакты: Степанова В.А., e-mail: valeriia.stepanova15@gmail.com

Для цитирования: Рябова М.А., Митрофанова Л.Б., Улупов М.Ю., Степанова В.А., Стерхова К.А. Импульсный режим воздействия полупроводникового лазера с длиной волны 445 нм в фонохирургии: экспериментальное исследование // Biomedical Photonics. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 11–15. doi: 10.24931/2413–9432–2023–12–2–11–15.

PULSED EXPOSURE MODE OF THE 445 NM SEMICONDUCTOR LASER IN PHONOSURGERY: AN EXPERIMENTAL STUDY

Ryabova M.A.[1], Mitrofanova L.B.[2], Ulupov M.Y.[1], Stepanova V.A.[1], Sterkhova K.A.[2]
[1]Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia
[2]Almazov National Medical Research Centre, Russia, Saint-Petersburg, Russia

Abstract

The study presents the results of an experimental study devoted to the choice of the most optimal mode of pulsed contact laser exposure of semiconductor laser with a wavelength of 445 nm in phonosurgery, which implies maximum preservation of anatomically and functionally significant structures of the larynx combined with radical approach to the pathological process. From the standpoint of the mucoundular theory of voice formation, wave-like oscillations of the vocal folds are possible due to the mobility of the cover layer of the vocal fold (epithelium, superficial layer of the lamina propria) relative to its body (deep layer of the lamina propria, vocal muscle). Thus, any injury at the level of the integumentary layer is associated with the risk of its excessive scarring and loss of the ability to wave-like sliding. Pig vocal folds, according to a number of authors, have a structure similar to human ones in terms of both histological structure and acoustic parameters, which justifies the rationality of their use as an experimental model. In a series of experiments using a 445 nm laser, contact pulsed impacts on a biological model were carried out with pulse durations of 10, 20, 50, and 100 ms, followed by evaluation of the following parameters based on the data of histological sections: the depth and width of the ablation crater, the width of the zone of lateral thermal damage. Thus, the most optimal for phonosurgical interventions modes of pulsed laser exposures with a wavelength of 445 nm are described.

Key words: phonosurgery, laser 445 nm, dysphonia, laser surgery, laryngology

Contacts: Stepanova V.A., e-mail: valeriia.stepanova15@gmail.com

For citations: Ryabova M.A., Mitrofanova L.B., Ulupov M.Y., Stepanova V.A., Sterkhova K.A. Pulsed exposure mode of the 445 nm semiconductor laser in phonosurgery: an experimental study, *Biomedical Photonics*, 2023, vol. 12, no. 2, pp. 11–15. doi: 10.24931/2413–9432–2023–12-2-11–15.

Введение

Доброкачественные новообразования гортани – наиболее часто встречаемая патология гортани, приводящая к стойкой дисфонии, которая обусловливает снижение качества жизни человека и зачастую утрату продуктивности его профессиональной деятельности. Лечение данной патологии возможно только с использованием хирургических техник.

Эндоларингеальная фонохирургия подразумевает собой максимальную сохранность анатомически и функционально значимых структур гортани в сочетании с радикальностью в отношении патологического процесса. Говоря о максимальной сохранности структур, в первую очередь имеется в виду покровный слой голосовой складки. С позиции биомеханики вибрационных колебаний, необходимых для возникновения голоса, структуру голосовых складок разделяют на так называемый «покровный слой» и «тело». Слизистая оболочка (эпителий и поверхностный слой собственной пластинки) являются «покровным слоем» и представляют собой единую морфофункциональную единицу, способную к самоподдерживающимся колебаниям относительно «тела», которое образовано глубоким слоем собственной пластинки, лежащим на голосовой мышце, средний же слой собственной пластинки обозначается как «переходная зона». Позднее были предложены несколько иные разделения, различия в которых в основном касаются положения промежуточного слоя собственной пластинки, но в любом случае, основная идея заключается в том, что «покров» и «тело» обладают разной биомеханикой [1]. Поверхностный слой собственной пластинки содержит наименьшее количество фибриллярных белков (коллагена и эластина), что определяет его высокую подвижность. Таким образом, любая травма на этом уровне и стимуляция активности фибробластов может приводить к избыточному рубцеванию и ограничению подвижности покровного слоя голосовой складки.

При фонохирургии доброкачественных поражений голосовых складок всегда необходимо учитывать, что хирургический разрез ткани, иссечение или абляция сами по себе могут вызывать избыточное рубцевание ткани как следствие ее заживления [2]. Перед хирургом всегда стоит задача свести к минимуму травмирование тканей голосовых складок во время операции, что подтверждает обоснованность поиска и внедрения в практику новых, более щадящих, методик фонохирургических вмешательств [3].

Материалы и методы

В экспериментальном исследовании была проведена оценка воздействия излучения полупроводникового лазера 445 нм на биологическую ткань. В качестве биологической модели использовались голосовые складки свиней *ex vivo* (Sus scrofa domesticus), забор которых осуществлялся в течение 2 ч после гуманной гибели животных на скотобойне с последующим сохранением их при температуре 2°С для избегания деградации биологической ткани до проведения эксперимента.

Для лазерного облучения использовалась лазерная установка IPG Photonics (Россия) с длиной волны 445 нм. В качестве оптического волокна использовался многоразовый нестерильный волоконный инструмент IPG Surgical Fiber Reusable (Россия) с диаметром сердцевины 400 мкм.

Эксперимент проводился после предварительного естественного согревания биологической ткани до комнатной температуры. В ходе эксперимента полупроводниковый лазер с длиной волны 445 нм использовался в импульсном режиме. Методика включала нанесение отдельных точечных лазерных воздействий в контактном режиме на максимальной мощности 13 Вт с длительностью отдельных импульсов 10, 20, 50 и 100 мс. Для каждого импульсного режима было выполнено 10 отдельных лазерных воздействий по медиальному краю одной голосовой складки. В эксперименте использовано 5 свиных гортаней, 4 из которых для экспериментальной части, 1 – в качестве контроля.

После завершения облучения образцы биологической ткани были препарированы (рис.1), материал фиксировался в 10% растворе забуференного нейтрального формалина в течение 48 ч (соотношение фиксатора и исследуемых образцов 10:1), затем биологический материал нарезался на пластины толщиной 5 мм и укладывался в гистологические кассеты. Далее проводились декальцинация срезов в кислотном растворе (соотношение декальцинатора и исследуемых образцов 50:1) и стандартная спиртовая проводка с заливкой в парафин по общепринятой методике [4]. Из блоков изготавливали срезы толщиной 2 мкм на световом микротоме Leica DM1000 (Германия) с последующей окраской их гематоксилином и эозином по стандартной методике. Гистологические срезы оцифровывали на сканирующем микроскопе Aperio AT2 (Германия).

Морфометрию производили с помощью анализатора изображения Aperio ImageScope 12.4.6.5003. За счет высокой плотности мощности в зоне контакта волокна с поверхностью ткани формируется очаг деструкции (абляции) ткани (кратер), диаметр и глубина которого были измерены в эксперименте, в результате чего получены диапазоны величин повреждения для каждой длительности импульсного воздействия. Зоной лазерного воздействия считали оптически пустую область, в которой происходило выпаривание нормальных гистологических структур, объективно отмечались как прерывание нормального многослойного плоского неороговевающего эпителия с формированием специфического кратера абляции, так и прилежащая к кратеру ткань (собственная пластин-

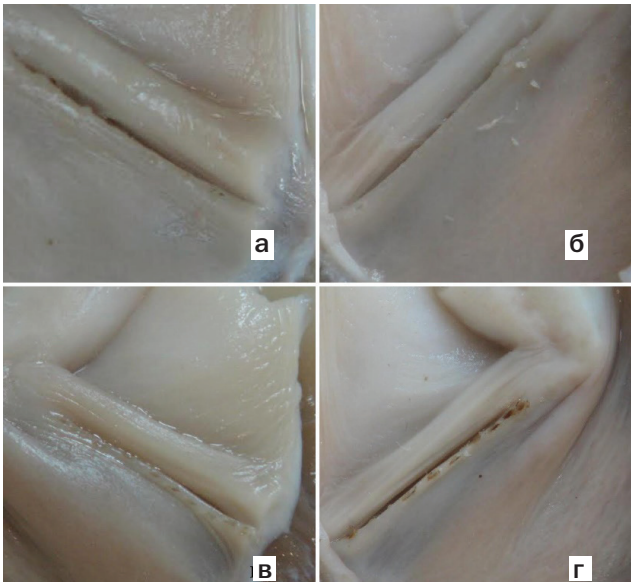

Рис. 1. Макроскопические препараты голосовых складок свиней после лазерного воздействия с длительностью импульса: а – 10 мс, б – 20 мс, в – 50 мс, г – 100 мс.
Fig. 1. Macroscopic preparations of the pig vocal folds after laser exposure: а – 10 ms, б – 20 ms, в – 50 ms, г – 100 ms.

ка голосовой складки, голосовая мышца) с признаками термического повреждения в виде нарушения ядерного строения и дезориентации хода эластических и коллагеновых волокон.

Статистическую обработку результатов проводили на платформе Jupyter notebook с использованием Python 3.9 с расчетом корреляции с использованием коэффициента (r) Спирмена.

Результаты и обсуждение

Золотыми стандартами фонохирургии являются вмешательства с использованием холодных микроинструментов и с использованием CO_2-лазера. Говоря о классической «холодной» фономикрохирургии, несмотря на активное внедрение малоинвазивных методик (microflap, mini-microflap), стоит отметить, что в отношении многих доброкачественных поражений голосовых складок объем хирургии исчисляется микрометрами. Это обусловливает сложность в расчете точности самим хирургом своих действий с использованием микрохирургических ножниц, скальпеля и других инструментов. Поэтому связанная с «холодным» вмешательством травма ткани голосовых складок потенциально более выражена из-за больших размеров инструментов по сравнению с реально необходимыми размерами в микронном диапазоне для достижения радикальности операции.

Как было сказано выше, в отношении максимально бережного восстановления вибрационных колебаний голосовой складки при фонохирургии принципиально проводить вмешательство в пределах эпителия и поверхностного слоя собственной пластинки, что в последующем позволит избежать избыточного рубцевания и нарушения подвижности покровного слоя складки относительно ее тела. По данным ряда публикаций поверхностный слой составляет порядка 30–40% от всей глубины собственной пластинки, толщина которой в среднем достигает 1 мм [5, 6, 7]. Глубина эпителия истинной голосовой складки при этом около 80–100 мкм [8] и, следовательно, глубина покровного слоя голосовой складки составляет в среднем 400–500 мкм. Во избежание связывания рубцовой ткани с телом голосовой складки и ограничения подвижности в этих пределах допускается проведение фонохирургического вмешательства.

Ряд исследователей считают, что у свиней можно выделить тенденцию к аналогичному трехслойному строению собственной пластинки голосовой складки с похожим соотношением коллагеновых и эластических волокон на протяжении всей глубины собственной пластинки. Толщина слизистой оболочки голосовых складок свиней в среднем составляет 0,9 мм [9]. По данным акустического анализа естественной фонации животных было обнаружено, что диапазон частот фонации у свиней наиболее близок к таковому у человека [10, 11].

Несмотря на анатомическое и гистологическое преимущество модели свиных голосовых складок и рациональность их использования в качестве научного образца для отработки хирургических методик из-за их легкой доступности на скотобойне, в настоящее время имеется небольшое количество публикаций, в которых эта модель оценивается с точки зрения лазерного воздействия, применяемого в фонохирургии у человека.

Ни в одной из доступных публикаций нами не обнаружено гистологической оценки точечных лазерных воздействий на голосовые складки лабораторных биологических моделей при использовании лазерного излучения с длиной волны 445 нм, что определяет актуальность выполненного экспериментального исследования.

При точечных лазерных импульсных воздействиях с длиной волны 445 нм нарастание длительности импульса приводит к увеличению глубины кратера абляции и толщины зоны бокового термического повреждения (рис. 2). При этом значимого увеличения ширины кратера абляции нами не отмечалось (рис. 3).

Данные статистического анализа проведенных измерений представлены в табл.

При расчете коэффициентов корреляции Спирмена для определения взаимосвязи между длительностью импульса и глубиной кратера абляции данный коэффициент составил 0,81, для толщины зоны бокового термического повреждения – 0,74, для ширины кратера абляции – 0,45 ($p<0,05$). Из представленных данных следует, что взаимосвязь между длительностью импульса и каждым из оцениваемых параметров

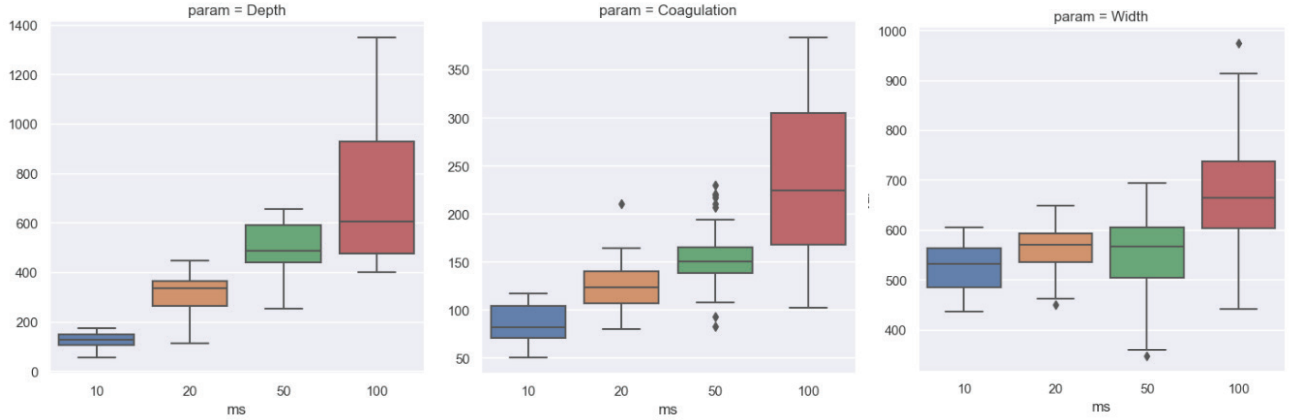

Рис. 2. Зависимость глубины кратера абляции (рис. а, ось y; мкм) и толщины зоны бокового термического повреждения в мкм (рис. б, ось y; мкм) от длительности импульса лазерного воздействия (ось x; мс).
Fig. 2. Dependence of the ablation crater depth (fig. a, y-axis; μm) and the thickness of the lateral thermal damage zone (fig. b, y-axis; μm) on the laser exposure pulse duration (x-axis; ms).

Рис. 3. Зависимость ширины кратера абляции (ось y; мкм) от длительности импульса лазерного воздействия (ось x; мс).
Fig. 3. Dependence of the ablation crater width (y-axis; μm) on the laser exposure pulse duration (x-axis; ms).

Таблица
Зависимость глубины, ширины кратера абляции и зоны бокового термического повреждения от длительности импульсного лазерного воздействия с длиной волны 445 нм.
Table
Dependence of the depth, width of the ablation crater and the zone of lateral thermal damage on the duration of pulsed laser exposure with wavelength of 445 nm.

Длительность импульсного воздействия, мс Duration of impulse exposure, ms	Результаты статистической обработки Results of statistical processing	Глубина кратера абляции, мкм The depth of the ablation crater, μm	Зона бокового термического повреждения, мкм The lateral thermal damage zone, μm	Ширина кратера абляции, мкм The width of the ablation crater, μm
10	Среднее значение (стандартное отклонение) Mean value (standard deviation)	124,8 (32,9)	85,2 (20,0)	526,6 (55,2)
	Мин; макс (min; max)	104; 148	71; 104	485; 563
20	Среднее значение (стандартное отклонение) Mean value (standard deviation)	312,5 (83,8)	126,8 (27,8)	564,0 (51,7)
	Мин; макс (min; max)	262; 365	107; 140	536; 593
50	Среднее значение (стандартное отклонение) Mean value (standard deviation)	498,6 (93,7)	152,4 (30,6)	548,7 (90,1)
	Мин; макс (min; max)	440; 592	138; 165	504; 604
100	Среднее значение (стандартное отклонение) Mean value (standard deviation)	730,3 (313,9)	235,7 (82,6)	673,4 (115,7)
	Мин; макс (min; max)	475; 926	168; 304	602; 737

есть и является статистически значимой. При этом для ширины абляционного кратера эта взаимосвязь характерна в меньшей степени, что объяснимо физическими свойствами лазерного излучения: при контактном режиме воздействия поглощение излучения в основном происходит вглубь биологической ткани.

На представленных гистологических срезах наглядно продемонстрировано увеличение глубины и ширины зоны бокового термического повреждения (рис. 4, а – г). Установлено, что при длительности импульса в 100 мс (рис. 4, г) зона повреждения преодолевает все слои собственной пластинки и большую

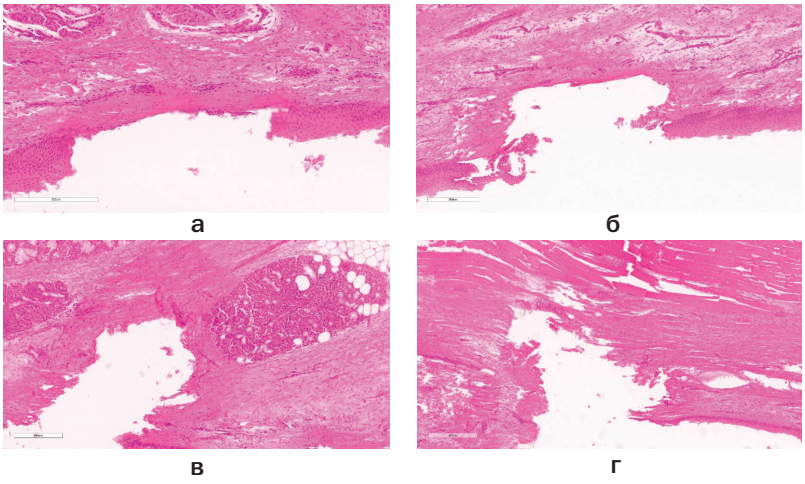

Рис 4. Микрофотографии гистологических срезов голосовых складок свиней после лазерного воздействия: а – длительность импульса 10 мс, масштаб 200 мкм; ареактивный (без воспалительного инфильтрата) язвенный дефект с некрозом всех слоев плоскоклеточного эпителия; б – длительность импульса 20 мс, масштаб 200 мкм; очаговый некроз ¼ собственной пластинки слизистой оболочки; в – длительность импульса 50 мс, масштаб 200 мкм; очаговый некроз голосовой складки с распространением на 2/3 глубины собственной пластинки слизистой оболочки; г – длительность импульса 100 мс, масштаб 400 мкм; увеличение очага некроза за счет вовлечения большей площади эпителия и некроза 1/3 мышечных волокон голосовой складки. Окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 4. Micrographs of histological sections of the vocal folds of pigs after laser exposure, stained with hematoxylin and eosin: a – pulse duration 10 ms, scale 200 μm; areactive (without inflammatory infiltrate) ulcerative defect with necrosis of all layers of the squamous epithelium; б – pulse duration 20 ms, scale 200 μm; focal necrosis of the lamina propria and ¼ of the muscle fibers of the vocal fold; в – pulse duration 50 ms, scale 200 μm; focal necrosis of the vocal fold extending to 2/3 of the depth of the mucosal lamina propria; г – pulse duration 100 ms, scale 400 μm; an increase in the focus of necrosis due to the involvement of a larger area of the epithelium and necrosis of 1/3 of the muscle fibers of the vocal fold.

часть мышечных волокон голосовой складки.

Заключение

Таким образом, длительность импульса при проведении фонохирургических вмешательств должна быть выбрана непосредственно хирургом в зависимости от патологического образования голосовой складки. На наш взгляд, наиболее оптимальными режимами лазерного воздействия являются излучения с длительностью одиночного импульса 10 мс и 20 мс, при воздействии которых с большой вероятностью можно эффективно удалить эпителиальные или субэпителиальные образования в пределах поверхностного слоя собственной пластинки голосовой складки. В случаях объемных образований на широком основании может быть рекомендован режим с длительностью одиночного импульса 50 мс, в то время как длительность импульса 100 мс следует избегать при фонохирургическом вмешательстве, учитывая большую вероятность проникновения лазерного излучения на всю толщину собственной пластинки голосовой складки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hirano M. Vocal mechanisms in singing: Laryngological and phoniatric aspects // Journal of Voice. – 1988. – Vol. 2(1). – P. 51-69.
2. Allen J. Cause of Vocal Fold Scar // Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. – 2010. – Vol.18. – P. 475-480
3. Карпищенко С.А., Рябова М.А., Улупов М.Ю. Лазерная хирургия в оториноларингологии на современном этапе // Consilium medicum. – 2014. – Т. 16, №11. – С. 73-76.
4. Саркисов, Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. – М.: Медицина. – 1996. – С. 544.
5. Nick J I Hamilton. The life-cycle and restoration of the human vocal fold // Laryngoscope Investig Otolaryngol. – 2023. – Vol. 8(1). – P. 168-176.
6. Woodson G. Developing a Porcine Model for Study of Vocal Fold Scar // Journal of Voice. – 2012. – Vol. 26(6). – P. 706-710.
7. Laszlo Peter Ujvary et al. Experimental model for controlled endoscopic subepithelial vocal fold injury in rats // Acta Cir Bras. – 2022. – Vol. 37(1). – P. e370106.
8. Kaiser M.L. et al. Laryngeal epithelial thickness: a comparison between optical coherence tomography and histology // Clinical Otolaryngology. – 2009. – Vol. 34(5). – P. 460-466.
9. Alipour F., Finnegan E.M. & Jaiswal S. Phonatory Characteristics of the Excised Human Larynx in Comparison to Other Species // Journal of Voice. – 2013. – Vol. 27(4). – P. 441-447.
10. Schlegel P. et al. Objective Assessment of Porcine Voice Acoustics for Laryngeal Surgical Modeling // Appl Sci (Basel). – 2021. – Vol. 11(10). – P. 4489.
11. Connor M. P. et al. Effect of Vocal Fold Injection of Cidofovir and Bevacizumab in a Porcine Model // JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery. – 2014. – Vol. 140(2). – P. 155.

REFERENCES

1. Hirano M. Vocal mechanisms in singing: Laryngological and phoniatric aspects. *Journal of Voice*, 1988, vol. 2(1), pp. 51-69.
2. Allen J. Cause of Vocal Fold Scar. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010, vol.18, pp. 475-480.
3. Karpishchenko S.A., Ryabova M.A., Ulupov M.Yu. Laser surgery in otorhinolaryngology at the present stage. *Consilium medicum*, 2014, vol. 16(11), pp. 73-76.
4. Sarkisov, D.S. Microscopic technique / D. S. Sarkisov, Yu.L. Perov. – M.: Medicine, 1996, p. 544.
5. Nick J.I. Hamilton. The life-cycle and restoration of the human vocal fold. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 2023, vol. 8(1), pp. 168-176.
6. Woodson G. Developing a Porcine Model for Study of Vocal Fold Scar. *Journal of Voice*, 2012, vol. 26(6), pp. 706-710.
7. Laszlo Peter Ujvary et al. Experimental model for controlled endoscopic subepithelial vocal fold injury in rats. *Acta Cir Bras*, 2022, vol. 37(1), p. e370106.
8. Kaiser M.L. et al. Laryngeal epithelial thickness: a comparison between optical coherence tomography and histology. *Clinical Otolaryngology*, 2009, vol. 34(5), pp. 460-466.
9. Alipour F., Finnegan E.M. & Jaiswal S. Phonatory Characteristics of the Excised Human Larynx in Comparison to Other Species. *Journal of Voice*, 2013, vol. 27(4), pp. 441-447.
10. Schlegel P. et al. Objective Assessment of Porcine Voice Acoustics for Laryngeal Surgical Modeling. *Appl Sci (Basel)*, 2021, vol. 11(10), p. 4489.
11. Connor M.P. et al. Effect of Vocal Fold Injection of Cidofovir and Bevacizumab in a Porcine Model. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 2014, vol. 140(2), p. 155.