

· 老年人周围血管疾病诊治专栏 ·

## 聚多卡醇泡沫硬化剂稳定性在下肢浅静脉曲张治疗中的研究进展

胡海洋, 梅家才\*

(上海交通大学附属第六人民医院血管外科, 上海 200233)

**【摘要】** 下肢浅静脉曲张是临床常见的静脉疾病, 发病率随年龄增长而升高。随着微创技术的发展, 泡沫硬化疗法广泛应用于静脉曲张的治疗。泡沫稳定性是泡沫硬化疗法中的关键问题, 与临床治疗效果和安全性密切相关。目前聚多卡醇硬化剂的临床应用较为广泛, 研究发现多种因素都会对聚多卡醇泡沫稳定性产生影响, 如温度、气体成分、液气比例、硬化剂浓度、表面活性剂、制备方法等。本文主要对聚多卡醇泡沫硬化剂稳定性的相关研究进行综述, 以期对泡沫硬化剂能更安全、有效的应用于临床提供参考。

**【关键词】** 静脉曲张; 聚多卡醇; 泡沫硬化剂; 泡沫稳定性

**【中图分类号】** R654.4

**【文献标志码】** A

**【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2021.12.199

## Research progress in polidocanol foam stability in treatment of superficial varicose veins of lower extremities

HU Hai-Yang, MEI Jia-Cai\*

(Department of Vascular Surgery, Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China)

**【Abstract】** Superficial varicose veins of lower extremities is a common venous condition clinically. The incidence of varicosity increases with age. The development of minimally invasive technology leads to wide application of foam sclerotherapy in the treatment of varicose veins. Foam stability, the key in foam sclerotherapy, is closely related to the therapeutic effect and safety. At present, polydocanol sclerosant is commonly used for sclerotherapy. Studies have shown that stability of polydocanol foam is affected by multiple factors such as temperature, gas composition, liquid-gas ratio, concentration of sclerosant, surfactant and preparation. This article mainly reviews recent research on the stability of polidocanol sclerosant foam with a view to providing evidence for safe and effective clinical application of polydocanol sclerosant foam.

**【Key words】** varicose veins; polidocanol; sclerosing foam; foam stability

Corresponding author: MEI Jia-Cai, E-mail: meijiacai@126.com

下肢浅静脉曲张是临床常见的静脉疾病, 发病率随年龄增长而升高, 人群总发病率约 10%<sup>[1]</sup>。高龄造成的静脉壁结构变化和小腿肌泵功能减退, 可导致静脉返流和静脉高压, 从而诱发下肢浅静脉曲张。研究发现, 高龄人群的下肢浅静脉曲张发生率明显升高<sup>[2]</sup>。目前, 下肢浅静脉曲张的治疗方法有传统外科手术及激光、射频消融、泡沫硬化疗法等微创技术<sup>[3,4]</sup>。在 Tessari 提出简便易行的泡沫硬化剂制备方法之后, 过去的 20 年内, 泡沫硬化疗法在静脉曲张治疗中得到了广泛应用, 该疗法效果确切, 且操作简单、费用较低、不造成大的手术切口<sup>[5]</sup>。多项临床研究、国际共识会议和指南已将泡沫硬化疗法确定为治疗静脉曲张的一种重要选择, 并将其作为复发的静脉曲张和老年患者的一线治疗方案<sup>[6]</sup>。

泡沫硬化疗法使用液体硬化剂, 如聚多卡醇、聚桂醇、十四烷基硫酸钠 (C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>SO<sub>4</sub>Na, sodium tetradecyl sulfate, STS), 将其以一定的比例与气体混合后注入曲张静脉, 使静脉腔内产生炎症和纤维性闭塞, 从而达到治疗目的<sup>[7]</sup>。稳定的泡沫能更有效地驱赶和屏蔽血流, 使硬化剂能有更长时间与静脉壁接触并发挥作用。但多项研究显示, 泡沫硬化剂性质不够稳定、容易降解, 而在临床应用过程中, 泡沫硬化剂稳定性与治疗效果密切相关, 多种因素导致泡沫稳定性差而引起的并发症不容忽视<sup>[8,9]</sup>。研究中通常使用以下 3 个概念描述泡沫稳定性: (1) 泡沫半衰期 (foam halflife time, FHT), 是泡沫排空率为 50% 所用的时间; (2) 泡沫排空时间 (foam drainage time, FDT), 是硬化剂液体可见的时长; (3) 泡沫聚

收稿日期: 2021-05-25; 接受日期: 2021-08-11

通信作者: 梅家才, E-mail: meijiacai@126.com

结时间(foam coalescence time, FCT),是硬化剂泡沫可见的时长<sup>[10]</sup>。近年来有许多学者对泡沫硬化剂稳定性进行了多种类型的研究,通过控制变量因素以获取更长的泡沫半衰期。通常来说,黏着力强且细密的泡沫更优,在注射后能有效驱赶、排空血液并减少被稀释的程度。这样,在制备成泡沫后,同等剂量的药物也能用于更长段静脉的治疗。此外,半衰期更长的泡沫代表泡沫更稳定,可达到更好的治疗效果,也可减少治疗所需的硬化剂剂量、浓度,并降低并发症发生率。

影响硬化剂泡沫稳定性的因素有很多,但目前关于泡沫稳定性的研究仍不够彻底。目前临床常见的硬化剂为聚多卡醇、STS和聚桂醇,其中STS在国内应用较少,而聚桂醇作为国产硬化剂在临床应用广泛,但有关聚桂醇泡沫稳定性的研究尚缺乏。因此,本文主要从影响聚多卡醇泡沫稳定性的因素如温度、气体成分、液气比例、硬化剂浓度、表面活性剂、制备方法等层面,对聚多卡醇泡沫硬化剂稳定性相关的研究结果进行综述,以期对泡沫硬化剂更安全、有效的应用于临床提供参考。

## 1 温度

多项研究证明温度对硬化剂泡沫的稳定性存在影响。Valenzuela等<sup>[11]</sup>在2013年研究了10℃~40℃范围内的温度对聚多卡醇泡沫稳定性的影响,结果表明,温度越低,泡沫稳定性越好。岳琳琳等<sup>[12]</sup>的研究同样证明,温度与硬泡沫稳定性负相关。这些研究虽证明不同的温度条件下泡沫稳定性会发生变化,但研究使用的温度条件仍与人体实际的温度变化不一致。为此,Bai等<sup>[13]</sup>在6℃~27℃7个温度梯度下制备泡沫,随后立即将其转移到37℃水浴中,以模拟不同温度条件下制备的泡沫注入人体内的过程,并观察泡沫稳定性的变化。该研究发现,环境温度突然变化可降低泡沫稳定性,且在制备温度升高时,泡沫半衰期缩短,即泡沫变得不稳定。泡沫的液体流动性增加及温度升高引起的黏度降低,可能是泡沫更易衰减的主要原因。因此,为使泡沫的稳定性增加,建议在较低的温度环境中制备泡沫,从而保证安全性。

## 2 气体成分及注射时间

多种气体成分可用于泡沫制备,气体成分的类型对泡沫稳定性和临床效果有一定影响。因为空气获取简单,目前临床上制备泡沫多使用空气,有研究使用无菌空气,亦有直接使用室内空气者,但尚无研究比较二者造成的临床安全性及泡沫稳定性差异。

Peterson等<sup>[14]</sup>在制备泡沫时分别采用空气、二氧化碳(carbon dioxide, CO<sub>2</sub>)、氧气(oxygen, O<sub>2</sub>)和CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>混合气体,发现在低浓度泡沫中,混合了空气或氧气的泡沫半衰期相近,分别为CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>混合泡沫半衰期的1.5倍和CO<sub>2</sub>泡沫半衰期的3倍。CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>气体混合物的使用增加泡沫稳定性,这可能是因为O<sub>2</sub>成分可促进泡沫的形成。有研究发现,将一定比例的氮气用于制备泡沫可造成较高的气体栓塞风险,因其在血液中溶解度极低<sup>[15]</sup>。而纯CO<sub>2</sub>和CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>混合物可以溶解在血液中,从而降低气体栓塞风险<sup>[16]</sup>。但是,由于CO<sub>2</sub>在血液中溶解度更高,因此泡沫的降解速度也更快。McMaster<sup>[17]</sup>比较了室内空气和CO<sub>2</sub>制备泡沫的稳定性,发现虽然CO<sub>2</sub>泡沫降解较快,但改变注入技术以缩短泡沫制备和注入之间的时间间隔,可使泡沫稳定性增加。笔者根据多年临床经验认可此观点,我们建议在硬化剂泡沫制备完成后,应在尽可能短的时间内完成注射。

## 3 液气比

液气比例决定泡沫的干湿状态,可能影响气体弥散速度从而影响泡沫稳定性。Cameron等<sup>[18]</sup>以1:2、1:3、1:4、1:8液气比的泡沫注入一种充满血液的静脉模型,并测定泡沫流入和扩散速率,发现除1:2液气比之外的其他比例都可充填管腔从而发挥作用。但van Deurzen等<sup>[19]</sup>发现不同的液气比对泡沫稳定性无影响。目前指南推荐制备泡沫时液体硬化剂和空气的比例为1:4(1单位液体硬化剂混合4单位空气)<sup>[20]</sup>,基本满足了临床使用的需求,但也不排除将来可能有更细致的研究,确定更精准的液气比例,甚至可按照此比例使用自动化器械,使制备的泡沫稳定性达到最佳状态。

## 4 泡沫硬化剂浓度

Wollmann等<sup>[21]</sup>发现聚多卡醇浓度为0.25%、1%和3%时,FHT分别为30s、130s和180s,表明聚多卡醇浓度越高,泡沫衰减越慢,稳定性越好。虽然1%聚多卡醇的溶液在治疗曲张静脉的疗效低于3%的溶液,但是3%溶液可能会产生更多不良反应<sup>[22]</sup>。van Deurzen等<sup>[19]</sup>发现使用不同浓度聚多卡醇制备的泡沫平均直径无差异,但高浓度药物会诱发皮肤色素沉着。由于研究的结果仅限于现象表层,尚未进一步探讨机制,最终结论仍需进一步验证。

## 5 表面活性剂

表面活性剂可通过改变泡沫黏度和表面张力来增强泡沫稳定性。有研究观察了5种表面活性剂对

泡沫稳定性的影响,发现表面活性剂可明显增强泡沫稳定性从而提高治疗效果<sup>[23]</sup>。Rial等<sup>[9]</sup>使用Tessari方法在3%聚多卡醇中添加了不同浓度的甘油,发现硬化泡沫中添加1.66%的甘油可获得理想的泡沫稳定性。随后另一项研究发现,将0.1 ml的1%透明质酸添加至1%聚多卡醇中,泡沫的半衰期延长173.38%,稳定性显著提高<sup>[24]</sup>。Critello等<sup>[25]</sup>使用了舒洛地特作为添加成分,以聚多卡醇/舒洛地特分别为1:0、1:1和1:3的比例制备泡沫,测得泡沫半衰期分别为(90.6±3.0)s、(106.8±2.6)s和(107.6±2.7)s,研究证明舒洛地特添入硬化剂可作为泡沫稳定剂,延长泡沫半衰期。由此可见,以往研究使用的表面活性剂对泡沫稳定性都具有增强作用,但目前尚未应用于临床。现有的制备泡沫硬化剂方法,在不添加表面活性剂的情况下也已经基本满足临床使用,因此,将来若出现优势更明显的表面活性剂,或许能对现有制备方式的改进产生积极影响。

## 6 泡沫制备方法

不同的泡沫制备方法影响泡沫的平均直径、均匀度及泡沫稳定性。通常,泡沫中的平均直径越小,泡沫越均匀,泡沫稳定性越好。目前常用泡沫制备方法包括经典的Tessari技术和双注射系统(dual syringe system, DSS),但这两种技术制备的泡沫稳定性仍不够理想。为制备更稳定的泡沫适用于不同的临床条件,多名学者改进和探索了新的制备方法。有研究认为在制备泡沫时使用3个注射器,可在泡沫注射过程中解决泡沫黏附和栓塞的问题。Xu等<sup>[26]</sup>在Tessari方法中使用一个2倍容量的注射器,发现该方法可产生更多的泡沫并改善泡沫稳定性。有研究使用了不同规格注射器制备泡沫,认为较小的注射器可产生的泡沫更均匀<sup>[23]</sup>,但McMaster<sup>[17]</sup>证明注射器尺寸与FHT之间无明显关系。McMaster<sup>[17]</sup>和van Deurzen等<sup>[19]</sup>也研究了不同型号的针头用于注射时对泡沫稳定性的影响,发现组间差异无统计学意义。

笔者在临床操作过程中发现,注射器数量和大小对泡沫稳定性并无绝对影响,而制备泡沫时泵速导致的涡旋变化,可能对泡沫稳定性的影响更大。泡沫制备过程中反复、快速混合出均匀的泡沫更能提高泡沫稳定性,减少泡沫的降解并提高治疗效果<sup>[3]</sup>。因此,便于调控的机械化制备方法可能具有更客观的研究意义和参考价值。

2015年,Carugo等<sup>[27]</sup>用仿生静脉模型比较了DSS、Tessari技术及市售的标准自动聚多卡醇注射微泡(polydocanol injection microbubbles, PIM)的泡

沫,发现FDT顺序为PIM>DSS>Tessari,PIM产生泡沫平均直径更小、更均匀,显示出较好的稳定性。2017年,Critello等<sup>[28]</sup>使用低频超声波制备泡沫,将其与Tessari方法制备的泡沫进行比较,发现超声制备的泡沫更稳定,平均直径远小于Tessari方法制备的泡沫。2020年Roche等<sup>[29]</sup>通过自动化磁力搅拌仪装置,其中包含自动化搅拌器械和一次性灭菌储气胶囊,采用不同的硬化剂、气体比例和参数设置组合制备泡沫,发现所有组合方式都可获取合适特性的硬化剂泡沫,且搅拌速度增加可提高气液比例,从而增加泡沫稳定性。

也有学者研究了过滤器对泡沫稳定性的影响,发现5 mm过滤器可获得FHT更高的泡沫,证明泡沫在通过过滤器时变得更加均匀和紧密,稳定性更好<sup>[30]</sup>。

以上多数研究只纳入了一个变量因素。Bai等<sup>[31]</sup>在前期基础上持续探索,研究了多因素条件下泡沫稳定性变化规律,并研究了各种因素和制备条件对泡沫半衰期的影响。这项研究发现,对于2.5 ml注射器,最佳泵速为250 mm/s。注射器尺寸、表面活性剂、制备温度和泵速这4个因素显著影响泡沫的半衰期,其中表面活性剂影响最大,而注射器尺寸影响最小。获得稳定泡沫的最佳条件是2.5 ml注射器尺寸、添加适当的表面活性剂、10°C制备温度和250 mm/s的注射速度。

## 7 总结与展望

下肢浅静脉曲张临床发病率随年龄增长而升高,泡沫硬化疗法在治疗中应用广泛,效果确切,但泡沫硬化剂性质不够稳定、容易降解。泡沫稳定性是泡沫硬化疗法中的关键问题,不仅关系到该疗法的安全开展,还关系到泡沫硬化疗法的进一步发展。温度、气体成分、液气比例、硬化剂浓度、表面活性剂、制备方法等因素都会对聚多卡醇泡沫稳定性产生影响。未来需要更多的安全有效的表面活性剂提高泡沫稳定性,更高效、均一稳定的机械化制备方法也值得期待。此外,硬化剂泡沫衰减的机制还需要更深入的研究,以获得更全面的评估泡沫稳定性的方法,促进泡沫硬化剂更安全、广泛的应用于临床。

### 【参考文献】

- [1] Cronenwett JL, Johnston KW. 卢惠福血管外科学[M]. 第8版. 北京:北京大学医学出版社, 2012: 823-824.
- [2] Cronenwett JL, Johnston KW. Rutherford's Vascular Surgery[M]. 8th Ed. Beijing: Peking University Medical Press, 2012: 823-824.
- [3] Ruckley CV, Evans CJ, Allan PL, et al. Chronic venous insuffi-

- ciency: clinical and duplex correlations. The Edinburgh Vein Study of venous disorders in the general population [J]. *J Vasc Surg*, 2002, 36(3): 520-525. DOI: 10.1067/mva.2002.126547.
- [3] 梅家才, 郑月宏, 马保金, 等. 实用静脉曲张治疗学 [M]. 南京: 东南大学出版社, 2017: 191-220.
- Mei JC, Zheng YH, Ma BJ, *et al.* Practical Therapeutics in Varicosities [M]. Nanjing: Southeast University Press, 2017: 191-220.
- [4] 郑月宏, 梅家才, 汪涛. 下肢静脉曲张治疗精要 [M]. 南京: 东南大学出版社, 2016: 4-6.
- Zheng YH, Mei JC, Wang T, *et al.* Essentials of Treatment in Varicosities of the Lower Extremities [M]. Nanjing: Southeast University Press, 2016: 4-6.
- [5] Tessari L. Nouvelle technique d'obtention de la sclero-mousse [J]. *Phlebologie*, 2000, 53: 129.
- [6] Breu FX, Guggenbichler S, Wollmann JC. 2nd European consensus meeting on foam sclerotherapy 2006, Tegernsee, Germany [J]. *Vasa*, 2008, 37(Suppl 71): 1-29.
- [7] Michiels C, Bouaziz N, Remacle J. Role of the endothelium and blood stasis in the appearance of varicose veins [J]. *Int Angiol*, 2002, 21(1): 1-8.
- [8] Gillet JL, Guedes JM, Guex JJ, *et al.* Side-effects and complications of foam sclerotherapy of the great and small saphenous veins; a controlled multicentre prospective study including 1,025 patients [J]. *Phlebology*, 2009, 24(3): 131-138. DOI: 10.1258/phleb.2008.008063.
- [9] Rial R, Hervas LS, Monux G, *et al.* Polidocanol foam stability in terms of its association with glycerin [J]. *Phlebology*, 2014, 29(5): 304-309. DOI: 10.1177/0268355513477858.
- [10] Li L, Feng J, Zeng XQ, *et al.* Fluoroscopy-guided foam sclerotherapy with sodium morrhuate for peripheral venous malformations: preliminary experience [J]. *J Vasc Surg*, 2009, 49(4): 961-967. DOI: 10.1016/j.jvs.2008.10.037.
- [11] Valenzuela GC, Wong K, Connor DE, *et al.* Foam sclerosants are more stable at lower temperatures [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2013, 46(5): 593-599. DOI: 10.1016/j.ejvs.2013.08.012.
- [12] 岳琳琳, 王逸飞, 董建勇, 等. 温度对聚桂醇泡沫稳定性的影响 [J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2017, 15(3): 198-201. DOI: 10.19438/j.cjoms.2017.03.002.
- Yue LL, Wang YF, Dong JY, *et al.* Influence of temperature on the stability of lauromacrogol foam for sclerotherapy [J]. *China J Oral Maxillofac Surg*, 2017, 15(3): 198-201. DOI: 10.19438/j.cjoms.2017.03.002.
- [13] Bai T, Chen Y, Jiang W, *et al.* Studies on foam decay trend and influence of temperature jump on foam stability in sclerotherapy [J]. *Vasc Endovascular Surg*, 2018, 52(2): 98-106. DOI: 10.1177/1538574417741786.
- [14] Peterson JD, Goldman MP. An investigation into the influence of various gases and concentrations of sclerosants on foam stability [J]. *Dermatol Surg*, 2011, 37(1): 12-17. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2010.01832.x.
- [15] Coleridge SP. Sclerotherapy and foam sclerotherapy for varicose veins [J]. *Phlebology*, 2009, 24(8): 260-269. DOI: 10.1258/phleb.2009.009050.
- [16] Xu J, Wang YF, Chen AW, *et al.* A modified Tessari method for producing more foam [J]. Springerplus, 2016, 5: 129. DOI: 10.1186/s40064-016-1769-5.
- [17] McMaster S. Sodium tetradecyl sulphate foam stability prior to injection; factors affecting liquid reformation [J]. *Phlebology*, 2011, 26(6): 222-226. DOI: 10.1258/phleb.2010.010025.
- [18] Cameron E, Chen T, Connor DE, *et al.* Sclerosant foam structure and stability is strongly influenced by liquid air fraction [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2013, 46(4): 488-494. DOI: 10.1016/j.ejvs.2013.07.013.
- [19] van Deurzen B, Ceulen RP, Tellings SS, *et al.* Polidocanol concentration and time affect the properties of foam used for sclerotherapy [J]. *Dermatol Surg*, 2011, 37(10): 1448-1455. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2011.02095.x.
- [20] 中华医学会外科学分会血管外科学组, 中国医师协会血管外科医师分会, 中国医疗保健国际交流促进会血管外科分会, 等. 中国慢性静脉疾病诊断与治疗指南 [J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(39): 3047-3061. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.39.003.
- Vascular Surgery Group, Society of Surgery, Chinese Medical Association, Vascular Surgery Branch of Chinese Medical Doctor Association, Vascular Surgery Branch of China International Exchange and Promotive Association for Medical and Health Care, *et al.* Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of chronic venous diseases [J]. *Natl Med J China*, 2019, 99(39): 3047-3061. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.39.003.
- [21] Wollmann JC. The history of sclerosing foams [J]. *Dermatol Surg*, 2004, 30(5): 694-703. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2004.30208.x.
- [22] 白逃萍, 蒋文涛, 赵武, 等. 推注速度对静脉曲张用泡沫硬化剂稳定性影响的实验研究 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2016, 33(5): 890-895. DOI: 10.7507/1001-5515.20160144.
- Bai TP, Jiang WT, Zhao W, *et al.* Experimental study on influence of driving speed on foam stability in sclerotherapy for the treatment of varicose veins [J]. *J Biomed Eng*, 2016, 33(5): 890-895. DOI: 10.7507/1001-5515.20160144.
- [23] Bai T, Liu Y, Liu J, *et al.* A comparison of different surfactants on foam stability in foam sclerotherapy *in vitro* [J]. *J Vasc Surg*, 2019, 69(2): 581-591. DOI: 10.1016/j.jvs.2018.02.033.
- [24] Chen AW, Liu YR, Li Kai, *et al.* An investigation on the influence of hyaluronic acid on polidocanol foam stability [J]. *Dermatol Surg*, 2016, 42(1): 56-58. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000595.
- [25] Critello CD, Fiorillo AS, Cristiano MC, *et al.* Effects of sulodexide on stability of sclerosing foams [J]. *Phlebology*, 2019, 34(3): 191-200. DOI: 10.1177/0268355518779844.
- [26] Xu J, Wang YF, Chen AW, *et al.* A modified Tessari method for producing more foam [J]. Springerplus, 2016, 5: 129. DOI: 10.1186/s40064-016-1769-5.
- [27] Carugo D, Ankrett DN, O'Byrne V, *et al.* The role of clinically-relevant parameters on the cohesiveness of sclerosing foam in a biomimetic vein model [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2015, 26(11): 258. DOI: 10.1007/s10856-015-5587-z.
- [28] Critello CD, Fiorillo AS, Matula TJ. Size of sclerosing foam prepared by ultrasound, mechanical agitation, and the handmade Tessari method for treatment of varicose veins [J]. *J Ultrasound Med*, 2017, 36(3): 649-658. DOI: 10.7863/ultra.16.02052.
- [29] Roche E, Pons R, Roche O, *et al.* A new automated system for the preparation of sclerosant foam; a study of the physical characteristics produced and the device settings required [J]. *Phlebology*, 2020, 35(9): 724-733. DOI: 10.1177/0268355520937615.
- [30] Shirazi AR, Goldman M. The use of a 5- $\mu$ m filter hub increases foam stability when using the double-syringe technique [J]. *Dermatol Surg*, 2008, 34(1): 91-92. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2007.34017.x.
- [31] Bai T, Jiang W, Chen Y, *et al.* Effect of multiple factors on foam stability in foam sclerotherapy [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 15683. DOI: 10.1038/s41598-018-33992-w.