

Методика

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612-15

Гришачёва Т.Г.¹, Михайлова И.А.¹, Петрищев Н.Н.¹, Кривченко А.И.², Струй А.В.¹

Мониторинг скорости кровотока в венах брыжейки крыс

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Л. Толстого, д. 6-8;

²ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова» Российской академии наук, 194223, г. Санкт-Петербург, Россия, пр. Тореза, д. 44

Разработка систем для регистрации и автоматической обработки информации о непосредственной реакции микрососудов на различные факторы является важной задачей для доклинического испытания новых препаратов, воздействующих на систему микроциркуляции. Цель исследования – модификация метода on-line-регистрации и обработки интравитальных изображений микрососудов для изучения динамики скорости кровотока при возмущающих воздействиях.

Методика. Представлена усовершенствованная методика регистрации скоростей линейного кровотока в микрососудах и обработки интравитальных изображений. Для визуальной фиксации изменения скорости кровотока использовали микроскоп (Wild M420, Швейцария), объектив (Makrozoom 6.3-32x), быстродействующую цифровую камеру (Basler acA2000-165uc USB3.0, Германия) с матрицей CMOSIS CMV2000. Камера позволяет получать полнокадровые изображения 2000×1000 пикселей с частотой 165 кадров/с, а линейные изображения с частотой 8000 кадров/с, что позволяет фиксировать достаточно широкий диапазон линейных скоростей кровотока. Масштаб полученного с помощью системы «микроскоп – камера изображения» составляет 0,7 микрона на пиксел, что дает возможность измерения скоростей от 0,1 до 150 мм/с. В работе был использован метод оцифровки и анализа изображений на основе пакета программ «МультиМедиа Каталог» версии 2.3 («ММCatalog», Россия). Анализ скорости кровотока основан на непосредственном измерении скорости движения потока клеток крови. При измерении скорости определяется смещение потока клеток крови между двумя измерениями через заданный промежуток времени. Для этого на изображение кровотока в выбранном участке микрососуда наносится линейный маркер, ориентированный вдоль русла сосуда. После запуска процесса измерений камера каждую секунду переводится в режим линейной съемки вдоль маркера. Производится съемка серии из 5–6 измерений линейных изображений с заданным интервалом времени, по ним строятся оптические срезы и измеряется относительное смещение кривой. Смещение кривой определяется методом оценки суммы разностей одного массива яркостей графика от другого при сканировании от –20 до +20% от текущей позиции. Позиция, соответствующая минимальной сумме разностей, считается величиной смещения графиков. Эта процедура проводится для всех 5–6 пар измерений. Из полученных значений смещения графиков выбирается медиана, которая и используется как результат измерения скорости. Затем камера опять переводится в режим съемки полнокадровых изображений, что позволяет контролировать положение маркера в реальном времени. Во время эксперимента могут происходить перемещения объекта из-за движения или дыхания животного. Для корректировки положения маркера на изображении сосуда есть возможность изменения его позиции во время измерений. Программа фиксирует полученные значения смещения графиков и, как следствие, скорость кровотока. В зависимости от скорости кровотока программа позволяет регулировать число измерений в единицу времени, что дает возможность поддерживать стабильность измерения скорости. Для снижения влияния высокочастотного шума проводится сглаживание графиков с помощью скользящего усреднения. Интенсивность усреднения регулируется в процессе измерений. Регистрация скорости кровотока в выбранном участке проводится непрерывно в течение всего эксперимента.

Схема проведения эксперимента:

- запись исходного кровотока в течение 180 с;
- регистрация кровотока во время лазерного облучения — 300 с;
- регистрация кровотока после воздействия – 300 с.

Результаты. Данный способ регистрации скорости кровотока позволяет фиксировать повышение скорости кровотока в венах как во время воздействия лазерным излучением (662 нм), так и после завершения облучения.

Заключение. Предложенная методика обработки интравитальных изображений кровотока дает возможность регистрации в режиме реального времени быстрых изменений скорости кровотока в микрососудах при возмущающих воздействиях.

Ключевые слова: микроциркуляция; скорость линейного кровотока; вены; лазерное облучение.

Для цитирования: Гришачёва Т.Г., Михайлова И.А., Петрищев Н.Н., Кривченко А.И., Струй А.В. Мониторинг скорости кровотока в венах брыжейки крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64 (3): 156-162.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.156-162

Для корреспонденции: Гришачёва Татьяна Георгиевна, e-mail: laser82@mail.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Петрищев Н.Н., Кривченко А.И.; проведение экспериментов, работа с животными, сбор и обработка материала – Гришачёва Т.Г., Струй А.В., Михайлова И.А.; статистическая обработка – Гришачёва Т.Г.; написание текста – Михайлова И.А.; редактирование – Петрищев Н.Н., Кривченко А.И. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.09.2019

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Grishacheva T.G.¹, Mikhailova I.A.¹, Petrishchev N.N.¹, Krivchenko A.I.², Strui A.V.¹

Monitoring blood flow velocity in rat mesenteric venules

¹Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University,
L'va Tolstogo Str. 6-8, St. Petersburg 197022, Russia;

²I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Prospekt Toreza 44, St. Petersburg, 194223, Russia

Development of systems for recording and automatic processing of information about direct microvascular responses is an important task for a preclinical study of drugs influencing the microcirculation.

The aim was to modify the method for on-line recording and processing of intravital images of microvessels to study changes in the blood flow velocity under disturbing impacts.

Method. This article presents an improved technique for recording linear blood flow velocity in microvessels and for processing intravital images.

Macroscope (Wild M420, Switzerland), lens (Makrozoom 6.3-32x), and high-speed digital camera (Basler acA2000-165uc USB3.0, Germany) with a CMOSIS CMV2000 matrix were used for visual tracking of changes in blood flow velocity. The camera allows obtaining full-frame, 2000x1000 pixel images with a frequency of 165 fps, and linear images with a frequency of 8000 fps to capture a wide range of linear blood flow velocities. The scale of an image obtained with the microscope-camera system is 0.7 microns per pixel, which makes it possible to measure velocities of 0.1 to 150 mm/s.

Digitizing and analyzing images were performed with a MultiMedia Catalog software, Version 2.3 (MMCatalog, Russia). The analysis of blood flow velocity is based on direct measurement of the blood cell flow velocity. The velocity is measured by estimation of the shift of blood cell flow for a predetermined time period between two measurements. To this purpose, a linear marker oriented along the vessel is applied to the blood flow image in a selected section of the microvessel. Following the measurement onset, the camera switches to a linear mode along the marker every second. A series of 5–6 measurements of linear images is taken at definite time intervals. Then measurements are used for construction of optical slices and measurement of the relative shift of the curve. The curve shift is determined by estimating the sum of differences between two arrays of curve brightness in scanning from –20 to +20% of the current position. The position corresponding to the minimum sum of differences is considered the value of curve shift. This procedure is performed for all 5–6 pairs of measurements. From the obtained values of curve shifts a median is selected, which is used as a result of measuring the velocity. Then the camera is again switched to the full-frame shooting mode, which allows you to control the position of the marker in real time. During the experiment, the object may move due to movements or breathing of the animal. To adjust the marker position on the image, it is possible to change its position during the measurements.

The program captures the obtained values of curve shifts and, thereby, the blood flow velocity. Based on the blood flow velocity, the program allows adjusting the number of measurements per unit time, which makes it possible to maintain stability of velocity measurements. To reduce the effect of high-frequency noise the curves are smoothed using moving averages. The averaging intensity can be adjusted in the process of measurement.

Recording of blood flow velocity in a selected area is performed continuously during the entire experiment.

Experimental protocol:

- recording of the initial blood flow for 180 s;
- recording of blood flow during laser irradiation for 300 s;
- recording of blood flow after the exposure for 300 s.

Results. This method of recording blood flow velocity allows recording increases in venular blood flow velocity both during and after an exposure to laser irradiation (662 nm).

Conclusion. The proposed technique for processing intravital images of blood flow makes it possible to record fast changes in blood flow velocity in microvessels under disturbing impacts in real time.

Keywords: microcirculation; linear blood flow velocity; venules; laser irradiation.

For citation: Grishacheva T.G., Mikhailova I.A., Petrishchev N.N., Krivchenko A.I., Strui A.V. Monitoring blood flow velocity in rat mesenteric venules. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 156-162 (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.156-162

For correspondence: *Grishacheva Tatyana Georgievna*, Junior Researcher, Center for Laser Medicine, Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, e-mail: laser82@mail.ru

Contribution: the concept and design of the research – Petrishchev N.N., Krivchenko A.I.; conducting experiments, working with animals, collecting and processing material – Grishacheva T.G., Strui A.V., Mikhailova I.A.; statistical processing – Grishacheva T.G.; writing a text – Mikhailova I.A.; editing – Petrishchev N.N., Krivchenko A.I.

Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgment. The study had no sponsorship

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about the authors:

Grishacheva T.G., <https://orcid.org/0000-0002-9515-914X>

Mikhailova I.A., <https://orcid.org/0000-0003-4292-9654>

Petrishchev N.N., <https://orcid.org/0000-0003-4760-2394>

Krivchenko A.I., <https://orcid.org/0000-0001-5807-2021>

Strui A.V., <https://orcid.org/0000-0002-4874-0564>

Received 11.09.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

В настоящее время прижизненная микроскопия дает возможность проводить исследования сосудов микроциркуляторного русла с большой разрешающей способностью [1]. В случае использования конфокальной микроскопии перспективен метод совмещения оптического изображения микрососуда с изображением, получаемым при доплеровской оптической корреляционной томографии, что особенно важно для сильно рассеивающих тканей [2]. Для слабо рассеивающих сред, например, брыжейки тонкой кишки крыс, более информативны методы оцифровки и анализа оптических изображений, дающие возможность исследовать изменения скорости кровотока в отдельно выбранном участке сосудистого русла под воздействием различных факторов в режиме реального времени [3]. Развиваемые в последние годы методы обработки данных по скорости кровотока в отдельных участках системы микроциркуляции с помощью вживленных цифровых камер особенно эффективны при длительном наблюдении за животными [4]. Однако такие камеры обладают небольшой разрешающей способностью, что ограничивает спектр их применения для изучения микроциркуляции. Ультразвуковые методы измерения гидродинамических параметров малоэффективны для микрососудов малых диаметров (<100 мкм) [5]. Поэтому разработка систем для регистрации и автоматической обработки информации о непосредственной реакции микрососудов на различные факторы является важной задачей, способствующей, прежде всего, доклинической проверке новых препаратов, воздействующих на систему микроциркуляции.

Цель исследования – модификация метода on-line-регистрации и обработки интравитальных изображе-

ний микрососудов для изучения динамики скорости кровотока при возмущающих воздействиях, в частности, при лазерном облучении (662 нм).

Методика

Животные. Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 240–280 г, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово». Животные имели ветеринарный сертификат. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, и согласованы с Этическим комитетом ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

Животные содержались на неограниченном потреблении корма (К-120 «Информ-корм», Россия) и воды при фиксированном световом режиме 12.00:12.00 ч (свет:темнота). Температура поддерживалась в пределах 18–20 °С, относительная влажность — 50–70 %. Длительность акклиматизационного периода для всех животных 14 дней.

Экспериментальный протокол. Объектом исследования были вены брыжейки тонкой кишки крыс диаметром 20–40 мкм. Перед исследованием кровотока животных наркотизировали: смесь (2:1) золетил-50 (*Virbac Sante Animale*, Франция) и ксила (ксилазин гидрохлорид 20 мг/мл, *Interchemiewerken «De Adelaar» B.V.*, Нидерланды) вводили внутримышечно в дозе 0,75 мл/кг. Через нижнесрединный доступ извлекали петлю тонкой кишки, примыкающую к мезоаппендиксу. Животное в течение всего эксперимента находилось на термостатируемом столике (KEL-2000, Великобритания), имеющем окно для проходящего света, выполненное из кварцевого стекла, над которым размещали петлю

брыжейки тонкой кишки. Исследуемый участок брыжейки постоянно орошали с помощью шприцевого автоматизированного дозатора (SK-500I, КНР) стерильным физиологическим раствором (0,9 % NaCl), температура раствора 37,5 °С.

Исследование гемомикроциркуляции. Для визуальной фиксации изменения скорости кровотока использовали микроскоп (Wild M420, Швейцария), объектив (Макроzoom 6.3-32'), быстродействующую цифровую камеру (Basler acA2000-165uc USB3.0, Германия) с матрицей CMOSIS CMV2000. Камера позволяет получать полнокадровые изображения 2000×1000 пикселей с частотой 165 кадров/с, а линейные изображения с частотой 8000 кадров/с, что позволяет фиксировать достаточно широкий диапазон линейных скоростей кровотока. Масштаб полученного с помощью системы «микроскоп – камера изображения» составляет 0,7 мк на пиксел, что дает возможность измерения скоростей от 0,1 до 150 мм/с.

В работе использован метод оцифровки и анализа изображений на основе пакета программ «МультиМедиа Каталог» версии 2.3 («ММCatalog», Россия). Анализ скорости кровотока основан на непосредственном измерении скорости движения потока клеток крови. При измерении скорости определяется смещение потока клеток крови между двумя измерениями через заданный промежуток времени. Для этого на изображении кровотока в выбранном участке микрососуда наносится линейный маркер (рис. 1, а), ориентированный вдоль русла сосуда. После запуска процесса измерений камера каждую секунду переводится в режим линейной съемки вдоль маркера. Производится съемка серии из 5–6 измерений линейных изображений с заданным интервалом времени, по ним строятся оптические срезы и измеряется относительное смещение кривой (рис. 1, б).

Смещение кривой определяется методом оценки суммы разностей одного массива яркостей графика от другого при сканировании от –20 до +20% от текущей позиции. Позиция, соответствующая минимальной сумме разностей, считается величиной смещения графиков. Эта процедура проводится для всех 5–6 пар измерений.

Из полученных значений смещения графиков выбирается медиана, которая и используется как результат измерения скорости (рис. 1, в). Затем камера опять переводится в режим съемки полнокадровых изображений, что позволяет контролировать положение маркера в реальном времени. Во время эксперимента могут происходить перемещения объекта из-за движения или дыхания животного. Для корректировки положе-

ния маркера на изображении сосуда есть возможность изменения его позиции во время измерений. Программа фиксирует полученные значения смещения графиков и как следствие скорость кровотока. В зависимости от скорости кровотока программа позволяет регулировать число измерений в единицу времени, что дает возможность поддерживать стабильность измерения скорости. Для снижения влияния высокочастотного шума проводится сглаживание графиков с помощью скользящего усреднения. Интенсивность усреднения регулируется в процессе измерений.

Дизайн исследования. Регистрация скорости кровотока в выбранном участке проводится непрерывно в течение всего эксперимента.

Схема проведения эксперимента:

- запись исходного кровотока в течение 180 с;
- регистрация кровотока во время лазерного облучения — 300 с;
- регистрация кровотока после воздействия — 300 с.

Животных разделили на 2 группы: 1-я группа — интактные крысы ($n=15$); 2-я группа — лазерное облучение сосудов ($n=15$). Для облучения венул брыжейки использовали полупроводниковый лазерный аппарат (Алод-01, Россия) с непрерывной генерацией ($\lambda=662$ нм). Лазерное излучение вводили в оптическую систему микроскопа с помощью световода («Полиорник», Россия) и фокусировали на одну венулу в зоне наблюдения: диаметр пятна 200 мкм. Мощность облучения в плоскости объекта (35 мВт) контролировали с помощью измерителя мощности (Advantest Q8230) перед каждым экспериментом. Плотность мощности в плоскости объекта составила 0,11 Вт/см²; суммарная плотность энергии облучения— 33 Дж/см². Используемая плотность мощности лазерного облучения была ниже пороговой, вызывающей тепловые эффекты для выбранной длины волны.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения SAS 9.4.0. Проводили дисперсионный анализ на рангах с последующим сравнением групп по критерию Данна. Данные представлены как медиана (нижний/верхний квартиль) и в виде процентов по отношению к исходному значению. Отличия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты исследования

В результате регистрации скорости кровотока формировался ряд значений с неравномерным временным шагом. Чтобы упорядочить значения по временной шкале была использована аналитическая программа «Deductor Studio» [6], с помощью которой все

данные по времени усредняли с шагом 10 с. Данные по скорости в этом промежутке времени получали путем расчета среднего арифметического значения без учета случайных выбросов, связанных с чувствительностью камеры. Данные опытов каждой серии характеризовались существенным различием исходных значений скорости кровотока вследствие использования разных кровеносных сосудов у крыс. Исходная скорость кровотока во всех экспериментах колебалась в интервале от 2500 до 8000 мкм/с. Гистограмма скоростей в венулах ($d = 20\text{--}40$ мкм) микроциркуляторного русла брыжейки крыс в отсутствие внешних воз-

действий (контроль) показана на **рис. 2**. Полученные значения согласуется с данными литературы [7, 8]. При этом в группе интактных крыс скорость кровотока в венуле не была постоянной, имели место колебания скорости кровотока в пределах 20 % в течение всего периода наблюдения (13 мин), что также отмечается в работе [8].

Известно, что при лазерном облучении сосудов в красной области спектра отмечается некоторое увеличение скорости кровотока [9]. В группе с лазерным воздействием (662 нм) медиана исходной скорости кровотока в венулах составила 5976 (5887–7020) мкм/с.

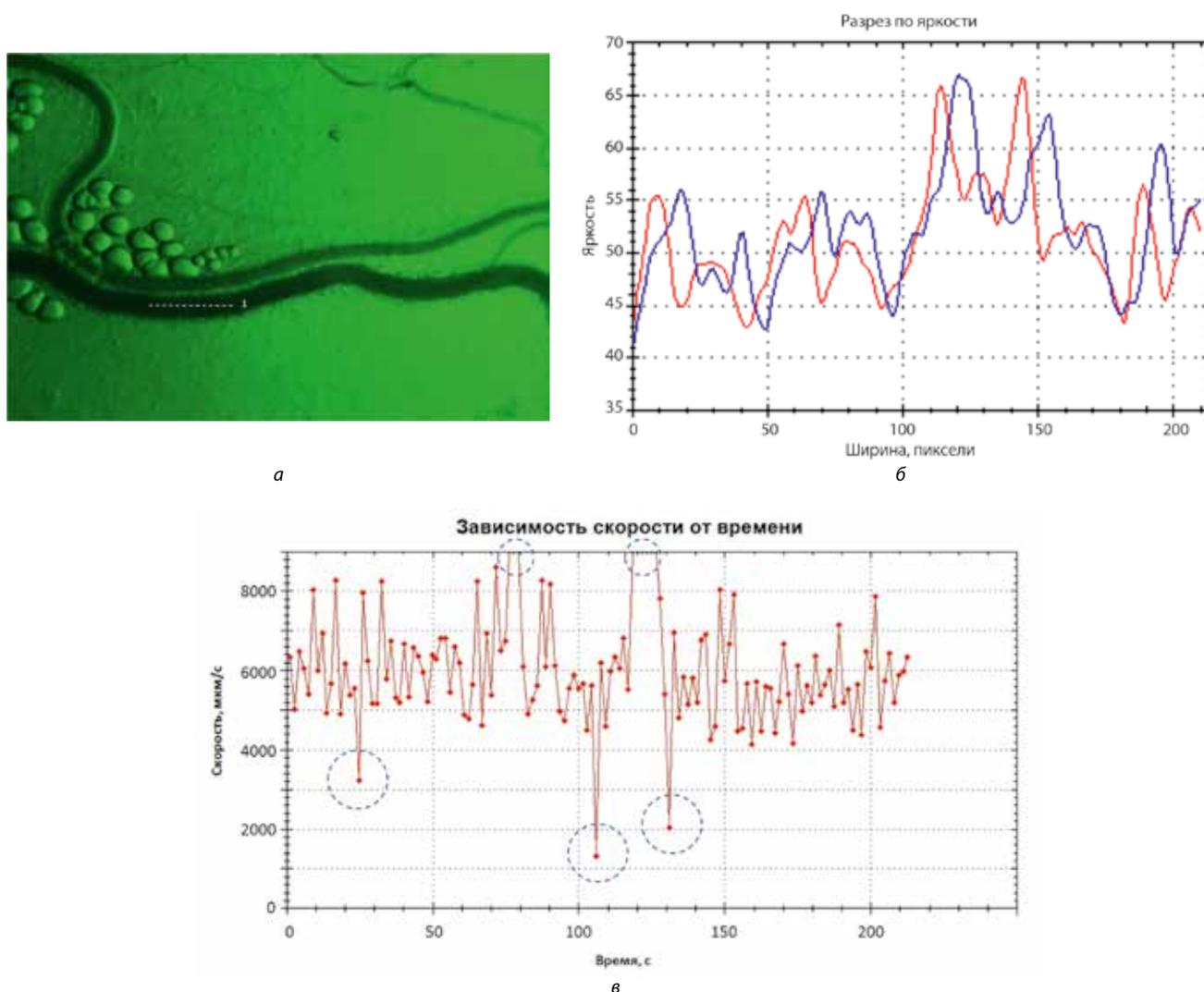


Рис. 1. Метод анализа изображений с помощью программы «МультиМедиа Каталог».

a — нанесение линейного маркера (1) на выбранный участок венулы; *б* — график двух оптических срезов, иллюстрирующий смещение кровотока за выбранный интервал времени (синий график – оптический срез первого кадра; красный – оптический срез следующего за ним кадра); *в* — регистрация скорости кровотока с учетом случайных выбросов (отмечено пунктиром).

Как видно на **рис. 3**, значимые изменения скорости кровотока регистрируются через 3 мин после начала облучения (что соответствует плотности энергии 18 Дж/см²), т. е. имеет место латентный период. Увеличение скорости составляло 12,5 % ($p < 0,05$). К концу периода облучения (5 мин, 33 Дж/см²) скорость кровотока увеличилась на 22,1 % по сравнению с исходной и продолжала увеличиваться после лазерного воздействия. К концу наблюдения за кровотоком увеличение скорости составило 28,5 % по сравнению с ис-

ходной ($p < 0,01$). Значения медианы скоростей кровотока в ходе эксперимента приведены в **таблице**.

Заключение

Предложенная методика обработки интравитальных изображений кровотока дает возможность регистрировать в режиме реального времени быстрые изменения скорости кровотока в микрососудах при возмущающих воздействиях, в частности облучении микрососудов лазерным излучением. Данный способ регистрации скоро-

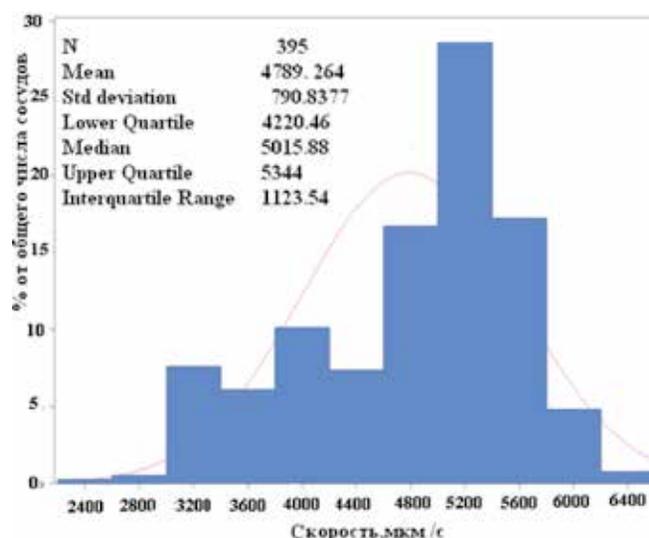


Рис. 2. Распределение скоростей в венах микроциркуляторного русла брыжейки крыс (d = 20–30 мкм).

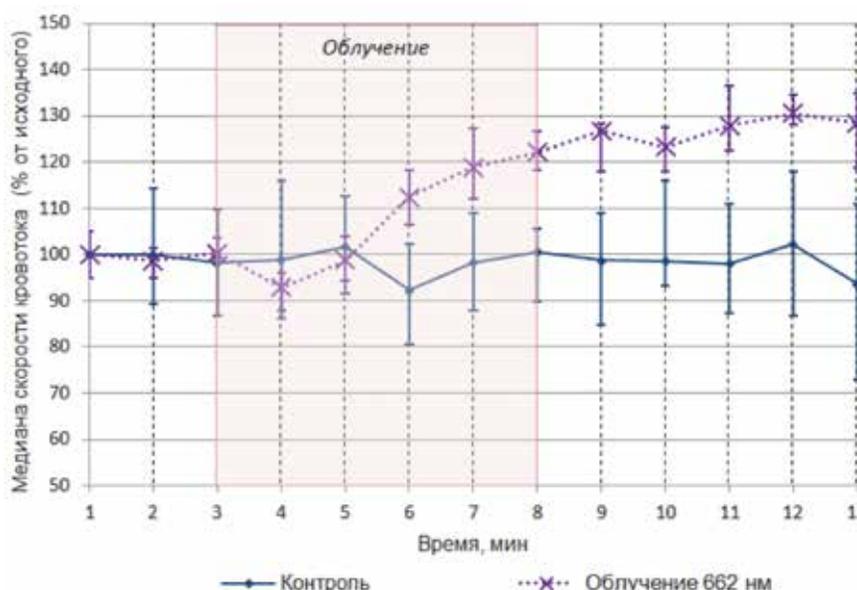


Рис. 3. Изменение медианы распределения линейной скорости кровотока в венах брыжейки тонкой кишки крыс при лазерном облучении (662 нм), % от исходной.

Значения медианы скоростей кровотока в ходе эксперимента, мкм/с

Время эксперимента, мин	Контроль (n=15)			Облучение 662 нм (n=15)		
	медиана	нижний квартиль	верхний квартиль	медиана	нижний квартиль	верхний квартиль
1-я	5083	4795	5185	5976	5887	7020
2-я	5079	5007	5224	5899	5147	6297
3-я (начало облучения)	4988	4880	5253	5997	5102	6299
4-я	5026	3979	5127	5547	4927	6247
5-я	5165	4844	5182	5901	5583	6301
6-я	4689	4216	5099	6723	6516	6938
7-я	4996	4830	5170	7100	6972	7485
8-я (конец облучения)	5105	4544	5357	7295	6515	7991
9-я	5018	4311	5395	7572	7051	7626
10-я	5005	3960	5272	7365	6957	7681
11-я	4981	4174	5228	7640	7570	7746
12-я	5199	4038	5466	7802	7709	7905
13-я	4759	4440	5215	7679	7443	7907

Примечание. Наблюдаемые изменения можно рассматривать как результат фотобиостимулирующего влияния лазерного излучения (662 нм) на сосуды микроциркуляторного русла.

сти кровотока позволил зафиксировать повышение скорости кровотока в венулах как во время воздействия лазерным излучением (662 нм), так и после его окончания.

Литература

(п.п. 1-4; 7; 8 см. References)

- Мацеевский Д.Д. Измерения кровотока в исследованиях макро- и микроциркуляции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2004; 138(12): 612–16.
- Белик А.Г., Цыганенко В.Н. *Информационные технологии анализа данных*. Омск: Изд-во ОмГТУ, 2015.
- Дворецкий Д.П., Тимошенко Т.Е., Белобокова Н.К. Влияние низкоинтенсивного излучения гелий-неонового лазера на микроциркуляцию в брыжейке крыс. *Российский физиолог. журн. им. И.М. Сеченова*. 2004; 90(11): 1356–62.

References

- Eriksson S., Nilsson J., Stureson C. Non-invasive imaging of microcirculation: a technology review. *Medical Devices: Evidence and Research*. 2014; 7: 445–52.
- Khurana M., Moriyama E.H., Mariampillai A., Wilson B.C. Intravital high-resolution optical imaging of individual vessel response to photodynamic treatment. *JBO Letters*. 2008; 13(4): 040502-1–3.

Сведения об авторах:

Гришачёва Татьяна Георгиевна, мл. науч. сотр. Центра лазерной медицины Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, e-mail: laser82@mail.ru;

Михайлова Ирина Анатольевна, доктор биол. наук, проф. каф. физики, математики и информатики Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, e-mail: fisika45@mail.ru;

Петричев Николай Николаевич, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, e-mail: lasmed@ya.ru;

Кривченко Александр Иванович, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. сравнительной физиологии дыхания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Санкт-Петербург, e-mail: allkriv@ya.ru;

Струй Андрей Владимирович, мл. науч. сотр. Центра лазерной медицины Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, e-mail: as@mmcatalog.com