

М. А. ВАСЮТИНА¹, А. Е. ПЕТРОВА³, В. В. БОЙКОВА¹,
Л. В. БОЙКОВ¹, В. Г. СКОПИЧЕВ¹, Д. В. КОРОЛЕВ^{1, 2}

Исследование микроциркуляции сосудов брыжейки и кишечника крыс микроскопическим методом на оригинальной установке локальной абдоминальной декомпрессии

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия 197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

³ Акционерное общество «Российский научный центр „Прикладная химия (ГИПХ)“», Санкт-Петербург, Россия Россия, Санкт-Петербург, ул. Крыленко, д. 26
E-mail: raluwow@gmail.com

Статья поступила в редакцию 20.04.22 г.; принята к печати 28.05.22 г.

Резюме

Введение. Известно, что применение локального отрицательного давления, в частности, локальной абдоминальной декомпрессии, способствует интенсивности капиллярного кровотока, улучшает функциональное состояние микроциркуляторного русла. Авторами предложена разработка, которая может быть использована для прижизненного исследования изменений микроциркуляции непосредственно в условиях локального отрицательного давления. **Цель** – исследование изменений микроциркуляции в кишечнике и брыжейке крыс в условиях локального отрицательного давления в сочетании с фармакологическим воздействием. **Материалы и методы.** Для работы была использована установка для биомикроскопии сосудов брыжейки и кишечная крыс в условиях локальной абдоминальной декомпрессии, принцип работы которой заключается в возможности непрерывной видеозаписи записи поля зрения микроскопа до, во время и после сеанса декомпрессии. В исследовании использовались крысы стока Wistar, самцы весом 300–450 г, распределенные на пять групп по 5 животных. Животные были разделены на группы в зависимости от фармакологического воздействия: атропин, пилокарпин, дротаверин и хлоропирамин, и контрольная группа. **Результаты.** Показано, что динамика расширения и сужения сосудов микроциркуляторного русла при используемом диапазоне разрежения варьирует в присутствии определенных агентов, что позволяет судить об участии определенных рецепторных полей. Была проанализирована динамика изменения количества сосудов в кадрах видеозаписи для обозначенных групп животных на разных этапах воздействия: до декомпрессии, во время декомпрессии, в течение 1 мин после воздействия, а также на отрезке от 1 до 5 мин и от 5 до 19 мин после воздействия. Во всех группах декомпрессии предшествовало сужение сосудов (т. е. уменьшение количества сосудов в кадре), а также расширение сосудов (увеличение количества сосудов в кадре) в 1-ю минуту после декомпрессии. Интересно, что в группе с применением дротаверина оказалась наиболее выражена динамика изменений: в отличие от других групп, сужение сосудов ($0,24 \pm 0,177\%$) продолжалось и во время декомпрессии, а расширение сразу после воздействия также было наиболее быстрым ($1,034 \pm 0,997\%$). **Заключение.** В ходе работы было показано, что гиперемические изменения на фоне воздействия локального отрицательного давления и выраженность их пролонгации различаются в зависимости от типа фармакологического воздействия на подопытное животное.

Ключевые слова: микроциркуляция, биомикроскопия, локальная абдоминальная декомпрессия, гиперемия

Для цитирования: Васютина М. А., Петрова А. Е., Бойкова В. В., Бойков Л. В., Скопичев В. Г., Королев Д. В. Исследование микроциркуляции сосудов брыжейки и кишечника крыс микроскопическим методом на оригинальной установке локальной абдоминальной декомпрессии. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2022;21(2):51–63. Doi: 10.24884/1682-6655-2022-21-2-51-63

M. L. VASYUTINA¹, A. E. PETROVA³, V. V. BOYKOVA¹,
L. V. BOYKOV¹, V. G. SKOPICHEV¹, D. V. KOROLEV^{1, 2}

Laboratory rats mesenteric vessel and intestine microcirculation intravital microscopy using original local abdominal decompression unit

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

2, Akkuratova str., Saint Petersburg, Russia, 197341

² Pavlov University, Saint Petersburg, Russia

6-8, L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russia, 197022

³ Russian Research Center Applied Chemistry (GIPH) JSC

26, Krilenko str., Saint Petersburg, Russia

E-mail: raluwow@gmail.com

Received 20.04.22; accepted 28.05.22

Summary

Introduction. The local decompression therapy (including local abdominal decompression) is known to contribute to the intensity of capillary blood flow and improve the functional state of the microvasculature. We have proposed a development could be used for intravital investigation of changes in microcirculation directly under local negative pressure conditions. **Purpose.** Investigation of microcirculatory changes under the conditions of local negative pressure in the rat intestine and mesentery combined with pharmacological effects. **Materials and methods.** Unit for vital microscopy under local negative pressure was used for this work. The specific of the unit is the ability of continuous record the field of view of the microscope before, during and after the decompression session. In the experiment there were used Wistar rat males weighing 300–450 g, distributed into 5 groups of 5 animals. The animals were divided into groups depending on the pharmacological impact: atropine, pilocarpinum, drotaverine and chloropyramine and the control group. **Results.** It has been shown that dynamics of vascular constriction and dilatation after decompression session varies in response of certain agents suggested the involvement of certain receptor fields. The changing vessel number within the video recording frames by groups of animals was analyzed at different stages of exposure: before decompression, during decompression, within 1 minute after exposure, as well as in the interval from 1 to 5 minutes and from 5 to 19 minutes after exposure. In all groups vasoconstriction preceded decompression (i. e., reduced number of vessels in the frame), but in all of them vasodilation (increased number of vessels in the frame) occurred in the first minute after decompression. Interestingly, in the «drotaverine» group, the dynamics of changes was most pronounced: unlike other groups, vasoconstriction ($0.24 \pm 0.177\%$) continued during decompression, and expansion right after exposure was also highly expressed ($1.034 \pm 0.997\%$). **Conclusion.** hyperemic changes and the severity of prolongation of these changes was shown to be different depending on the type of pharmacological effect and could be recorded by the experimental unit developed by the authors.

Keywords: microcirculation, intravital microscopy, local abdominal decompression, hyperemia

For citation: Vasyutina M. L., Petrova A. E., Boykova V. V., Boykov L. V., Skopichev V. G., Korolev D. V. Laboratory rats mesenteric vessel and intestine microcirculation intravital microscopy using original local abdominal decompression unit. *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2022;21(2):51–63. Doi: 10.24884/1682-6655-2022-21-2-51-63.

Введение

За последние десятилетия изучение микроциркуляции стало одной из важнейших фундаментальных проблем биомедицины. Можно утверждать, что характером микроциркуляции в немалой мере определяется функциональное состояние сердечно-сосудистой системы в целом, чем и обуславливается выраженный интерес исследователей к изучению строения, особенностей, механизмов регуляции функционирования микрососудов.

Расстройства микроциркуляции лежат в основе большого числа заболеваний, поэтому при лечении необходимо восстановление функций микрососудов с помощью различных средств. Многие ученые заинтересованы в изучении способов воздействия на микроциркуляторное русло [1–6]. Таким образом, в настоящее время является актуальным поиск неинвазивных, безлекарственных, физиотерапевтических

методов воздействия с достижением клинически эффективных результатов [7]. Одним из таких методов является вакуум-градиентная терапия, в том числе локальная абдоминальная декомпрессия [8]. Применение локальной декомпрессии (или локального отрицательного давления, ЛОД) способствует увеличению интенсивности капиллярного кровотока, улучшает функциональное состояние микроциркуляторного русла, что создает необходимые условия для адаптации кровоснабжения к потребностям органов и тканей в доставке кислорода, питательных веществ и разгрузке их от конечных продуктов метаболизма.

Суть метода заключается в создании отрицательного давления вокруг каудальной половины тела, благодаря которому усиливается кровоток, улучшается микроциркуляция, снимаются спазмы с сосудов, и, следовательно, увеличивается поступление питательных веществ и кислорода к тканям. Также происходит

и детоксикация организма за счет растяжения поркапилляров и увеличения фильтрации крови [9].

На данный момент локальная абдоминальная декомпрессия применяется:

- в токсикологии и наркологии;
- в акушерстве и гинекологии;
- для лечения при заболеваниях печени, ЖКТ, почек.

Также имеют место перспективы использования метода в неврологии и кардиологии.

Клинические результаты физиотерапевтического воздействия ЛОД на абдоминальную область при различных патологиях уже были отмечены ранее [4, 10–12].

Цель работы – исследование изменений микроциркуляции в условиях ЛОД в кишечнике и брыжейке крыс с применением предложенной авторской методики и в сочетании с фармакологическим воздействием. Протокол исследования 18-12ПЗ#V1 был одобрен Комиссией по содержанию и использованию лабораторных животных ИЭМ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России 06.07.2018 г. Для изучения прижизненных изменений микроциркуляции в кишечнике и брыжейке крыс по время локальной абдоминальной декомпрессии нами представлена собственная разработка, относящаяся к области медицины и биологии, в частности, к экспериментальной медицине.

В настоящее время известно несколько способов, позволяющих провести биомикроскопию микрососудов брыжейки и кишечника лабораторных животных. Один из них – нагревательный столик А. М. Гусейнова из плексигласа для биомикроскопии микрососудов брыжейки крысы [4], который представляет собой цельный блок, состоящий из подогреваемой платформы для наркотизированного животного и камеры для извлеченной кишечной петли. Основу камеры составляет плексигласовый корпус со световодом. Подогрев платформы, на которой фиксируется животное, может осуществляться как с помощью циркуляционного термостата, так и электронагревателем с автоматической регулировкой температурного режима. Температура изучаемого объекта контролируется ртутным термометром или контактным электротермометром.

К недостаткам известного нагревательного столика относится то, что для поддержания температуры и предотвращения высыхания приходится осуществлять орошение брыжейки подогретыми растворами, например, раствором Рингера, физиологическим раствором, фосфатным буфером.

Известен также металлический нагревательный столик для биомикроскопии сосудов брыжейки крысы [13], содержащий собирательную линзу, контактный термометр, спираль нагревателя, световод из оптического стекла. Особенностью этой конструкции является расположение световода, который имеет цилиндрическую форму и верхним своим торцом выступает над поверхностью подогреваемой пластины, служа основанием, на котором располагают брыжейку с кишечной петлей.

Однако недостатком известного нагревательного столика также является то, что требуется постоянное орошение исследуемого фрагмента вручную.

Дополнение к этому методу было предложено В. С. Котляровым [14]. Целью дополнения метода является предотвращение нарушений микроциркуляции в изучаемом участке, что достигается за счет проведения через исследуемый участок кишки фиксируемого пружинного каркаса. Такой метод позволяет достичь равномерного распрямления брыжеечного сегмента на предметном столике.

Материалы и методы исследования

Описание экспериментальных групп. Животные были распределены на пять групп, по 5 голов в каждой.

1. Контроль – животные этой группы не получали дополнительного фармакологического воздействия перед сеансом локальной абдоминальной декомпрессии.

2. Атропин – животные этой группы получали атропин в дозе 0,05 мг/кг в виде внутримышечной инъекции за 10 мин до начала сеанса ЛОД.

3. Пилокарпин – животные этой группы получали пилокарпин в дозе 3–5 мг/кг в виде подкожной инъекции за 10 мин до начала сеанса ЛОД.

4. Дротаверин – животные этой группы получали дротаверин (препарат Но-Шпа) в дозе 5 мг/кг в виде внутримышечной инъекции за 10 мин до начала сеанса ЛОД.

5. Хлоропирамин – животные этой группы получали хлоропирамин (препарат Супрастин) в дозе 20 мг/кг в виде внутримышечной инъекции за 10 мин до начала сеанса ЛОД.

Общая схема эксперимента. Наркотизация животного путем внутрибрюшинного введения смеси ксилазина и зоветила 100, по 0,1 мл каждого препарата на голову. Эти препараты были выбраны благодаря сравнительно малому влиянию на общую гемодинамику [15]. Введение расчетной дозы специфического для данной подопытной группы препарата осуществлялось за 10 мин до сеанса локальной абдоминальной декомпрессии (кроме контрольной группы).

1. Обеспечение хирургического доступа к кишечнику и брыжейке животного, помещение кишечной петли в декомпрессионную камеру.

2. Начало биомикроскопии и видеорегистрации.

3. Проведение сеанса локальной абдоминальной декомпрессии (5 мин, разрежение 1,2–1,4 Кпа (0,2–0,4 PSI)). Видеорегистрация после сеанса продолжалась не менее 15 мин.

4. Выведение животного из эксперимента. Для эвтаназии животного применялся метод передозировки анестетика. Контроль эвтаназии осуществляется с помощью цервикальной дислокации [16]. Оценка влияния фармакологического агента на возникновение и пролонгацию гиперемии осуществлялась в сравнении с контрольной группой.

Непрерывная видеосъемка позволила оценить и сравнить функциональные изменения микроциркуляторного русла кишечника и брыжейки крысы в исходном состоянии, во время сеанса локальной абдоминальной декомпрессии и после него.

Биомикроскопия. Нами сконструирована установка, интегрирующая накопленный опыт в этой сфере в единое решение [17]. Наиболее существенным и принципиальным отличием от идей, предложенных

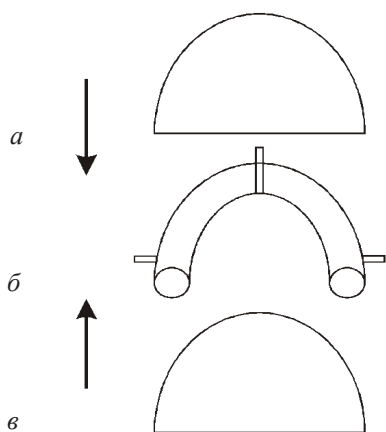


Рис. 1. Конструкция камеры декомпрессии: а, в – боковые стенки; б – рубашка обогрева

Fig. 1. Decompression chamber design: а, в – side walls; б – heating jacket

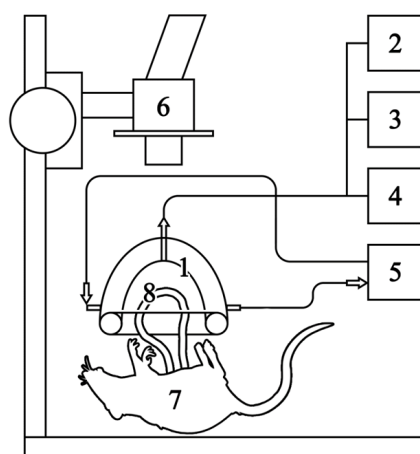


Рис. 2. Схема установки для биомикроскопии сосудов брыжейки и кишечника крыс в условиях локальной абдоминальной декомпрессии. Установка содержит камеру декомпрессии (1) в виде рубашки подогрева со стеклянными плоскостями и имеющую три фланца, с помощью одного из которых термостатируемая камера подключена к вакуумному насосу (2), вакуумметру (3) и ресиверу (4), с помощью двух других рубашка подогрева камеры подключена к циркуляционному термостату (5) LT-105A (Loip, Россия). Сосудистые изменения наблюдали при помощи операционного стереоскопического панкратического микроскопа (6) марки МСП-1 («ЛОМО», Россия). Микроскоп имел тринкулярную головку, оснащенную адаптером (C-mount) для фотоаппарата или видеокамеры. В камеру для декомпрессии выводилась петля кишечника (8) животного в эксперименте (7)

Fig. 2. Scheme of the unit for mesentery and intestinal vascular biomicroscopy of rats under local abdominal decompression conditions. The unit contains decompression chamber (1) in the form of a heating jacket with glass planes and having three flanges, one of the flanges is used to connect thermostated chamber to a vacuum pump (2), a vacuum meter (3) and a receiver (4), two other flanges are used to connect chambers heating jacket is connected to a circulation thermostat (5) LT-105A (Loip, Russia). Vascular changes were observed using an operational stereoscopic microscope (6) MSP-1 (LOMO, Russia). The microscope had a trinocular head equipped with an adapter (C-mount) for a camera. The intestinal loop (8) of the animal was placed into the decompression chamber in the experiment (7)

ранее, является наличие камеры декомпрессии особой конструкции (рис. 1), используемой для расположения участка брыжейки и кишечной петли и позволяющей создавать отрицательное давление воздуха определенной контролируемой величины. Это необходимо для изучения изменений сосудистого русла брыжейки и кишечника непосредственно в процессе локальной абдоминальной декомпрессии, что и является основной задачей, на решение которой направлена представленная методика.

Конструкция камеры декомпрессии. Сама камера декомпрессии представляет собой герметизируемую термостатируемую камеру и выполнена из пирексного стекла. Основу ее составляет рубашка обогрева, через которую с помощью циркуляционного термостата осуществляется подача воды определенной температуры. К рубашке с помощью акрилового герметика прикрепляются плоские боковые стенки. Конфигурация камеры позволяет манипулировать освещением, располагая источник света, как над исследуемым участком, так и под ним, что позволяет оценивать функционирование микрососудов брыжейки и кишечника на просвет и получать качественные данные с помощью микроскопа. При необходимости исследования небольших участков брыжейки и кишечника в условиях декомпрессии имеется возможность установить в камере перфорированную поликарбонатную перегородку, которая позволит ограничить исследуемую зону.

Конструкция установки. Конструкция установки для биомикроскопии сосудов кишечника и брыжейки крыс в условиях локальной абдоминальной декомпрессии представлена на рис. 2.

В качестве вакуумметра использовался прибор оригинальной конструкции, состоящий из датчика ST015PV1SPCF (Honeywell, США), микроконтроллера ATmega8535 16PU (Atmel, США) и матрицы трехразрядного семисегментного индикатора DC10EVA (Kingbright, Тайвань). В качестве вакуумного использовался поршневой насос китайского производства производительностью 0,3 л/мин. Ресивер имел емкость 5 л. Уровень вакуума в системе регулировался стравливанием его при помощи отвода с микрокраном.

Работа установки для биомикроскопии сосудов брыжейки и кишечника крыс при проведении локальной абдоминальной декомпрессии осуществлялась следующим образом.

Циркуляционный термостат обеспечивает температуру внутри камеры в пределах 36,5–37,5 °C. Это необходимо для минимизации побочных сосудистых реакций на фоне перепада температур. Перед началом работы края камеры обрабатываются вазелиновым маслом, что обеспечивает дополнительную герметизацию. Наркотизированное животное помещается на столик. Осуществляется разрез по белой линии живота. Затем петля кишечника извлекается из брюшной полости, помещается в камеру и фиксируется в ней. Предварительно исследуемый участок обрабатывается небольшим количеством вазелинового масла, что предотвращает его высыхание.

При включении насоса в камере создается разрежение воздуха. При выбранной программе разрежение составляло 1,2–2 КПа (0,2–0,3 PSI), продолжительность воздействия – 5 мин. Во время декомпрессии сосуды брыжейки и петли кишечника, выведенные в камеру, доступны для микроскопии с помощью операционного микроскопа.

Регистрация данных. Изменения, происходящие под действием отрицательного давления и вводимых препаратов, фиксировались при помощи режима видеосъемки цифрового фотоаппарата Nikon Coolpix

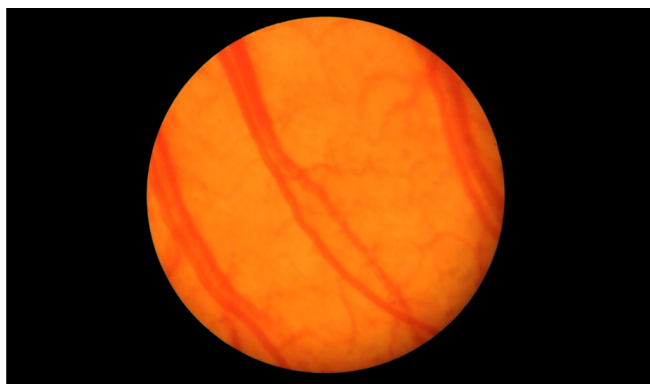


Рис. 3. Кадр видеозаписи до программной обработки.
Изображены микрососуды кишечника крысы
в поле зрения при витальной микроскопии

Fig. 3. Video recording frame before software processing. Figure shows rat intestinal microvessels in visual field during vital microscopy

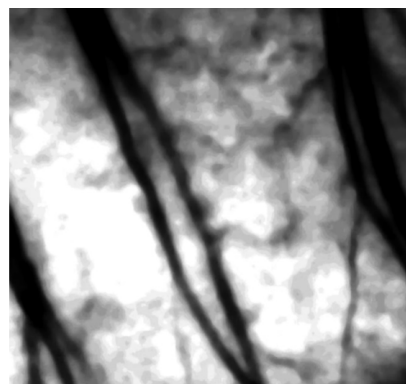


Рис. 4. Кадр видеозаписи после программной обработки,
полученной при биомикроскопии сосудов кишечника крысы,
после программной обработки и эквализации

Fig. 4. Video recording frame after software processing. Footage obtained from rat intestinal biomicroscopy after software treatment and equalization

Р340 (Япония), соединенного специальной муфтой с головкой операционного микроскопа.

Полученные видеофайлы анализировались, выделялись наиболее показательные и пригодные для обработки кадры, которые анализировались морфометрически при помощи программы, разработанной нами. Калибровка проводилась по микрофотографии объект-микрометра.

Обработка и анализ данных, полученных в ходе видеорегистрации. Нами была подготовлена программа, которая обрабатывает и регистрирует данные видеофайла. Программа написана на языке программирования python с использованием библиотеки обработки изображений OpenCv.

При цифровой обработке изображения обычно используется его представление в памяти в виде матрицы пикселей. Цветовая модель кадров полученных видеозаписей – RGB (0–255). Каждая буква этой кодировки обозначает соответствующий цвет (red, green, blue), который может принимать значение от максимально темного (0) до максимально светлого (255). Значения по этим каналам характеризуют общую яркость каждого кадра, которая, в свою очередь, отражает степень заполненности кадра сосудами.

Исходное изображение (рис. 3) кадрировалось, выделялась маска, являющаяся квадратом, вписанным в круг поля зрения микроскопа. Дальнейшей обработке подвергались данные, ограниченные этим квадратом.

При обработке кадрированной области в кадре выделялся зеленый канал (g). В случае анализа видеозаписи изменений сосудистого русла, когда преобладающим цветом является красный, зеленый канал является наиболее информативным.

Для отсеивания помех на видеозаписи применялся медианный фильтр – один из видов цифровых фильтров, широко используемый в цифровой обработке сигналов и изображений для уменьшения уровня шума [18], работающий по принципу размытия.

Для повышения контрастности кадра применялась эквализация гистограммы. Этот процесс не имеет большого значения для машинной обработки, но позволяет улучшить визуальное восприятие обработанного видео человеком (рис. 4).

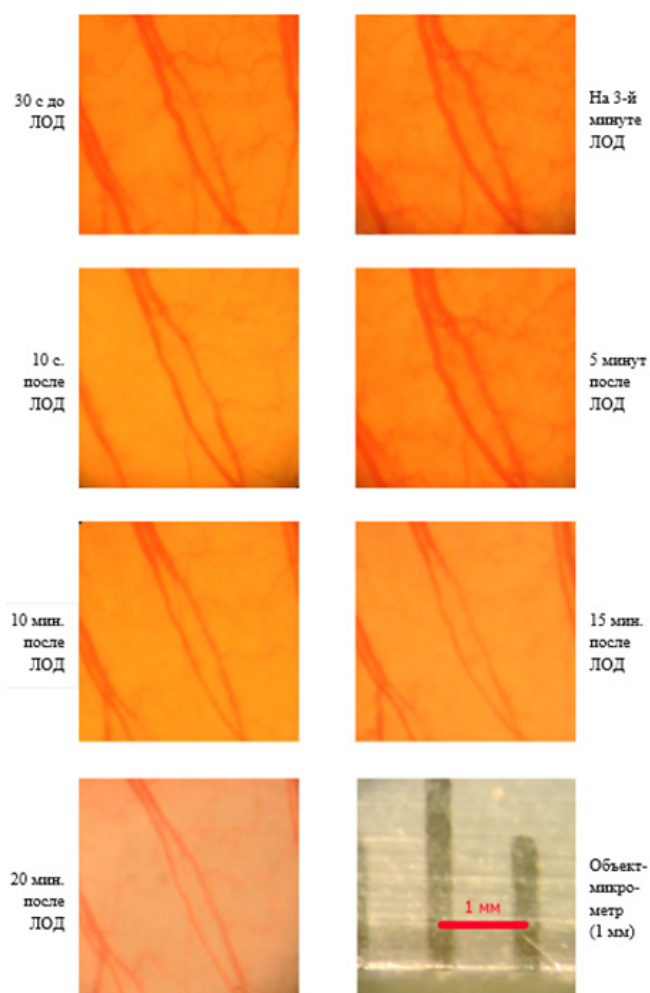


Рис. 5. Стоп-кадры, сделанные в обозначенных временных точках одной видеозаписи. Данные стоп-кадры показывают возможность анализа видеоданных, полученных в ходе биомикроскопии, на разных временных точках

Fig. 5. Freeze frames taken at designated time points of one video recording. Freeze frames show the possibility of analyzing video data obtained during biomicroscopy at different time points

Программа фиксировала минуты, секунды и номер кадра в секунде для нумерации каждого обрабатываемого кадра (формат `m_s_f`).

Суммировалась яркость всех пикселей кадра. Показатель яркости рассчитывался по одному каналу (g).

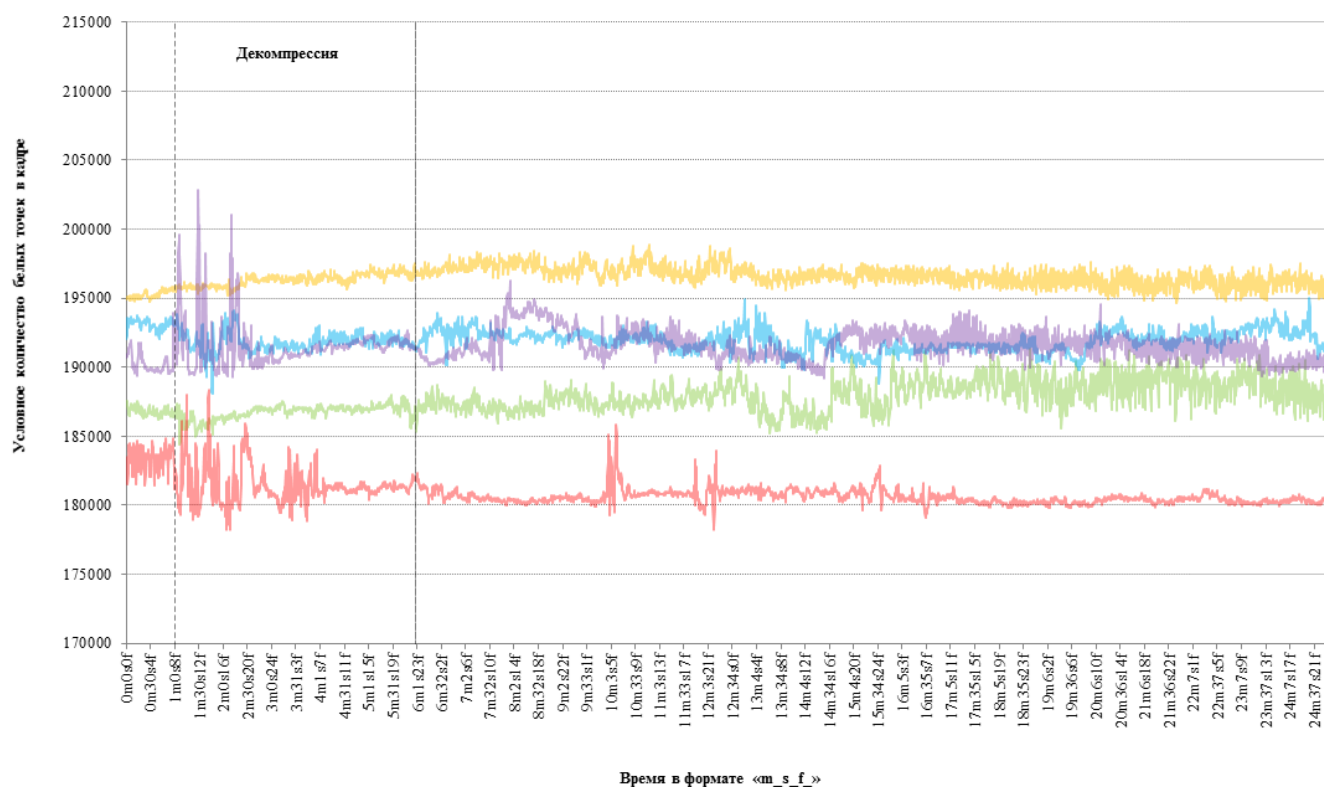


Рис. 6. Исходные данные для группы «контроль». Изменения условного количества белых точек в кадре на протяжении видеорегистрации. Отображено условное количество белых точек в кадрах обработанной видеозаписи с учетом времени для 5 животных в группе

Fig. 6. Initial data for the control group. Changes in the conditional number of white points in the frame while video recording. The conditional number of white dots in the frames of the processed video is displayed, for 5 animals in the group at different time points

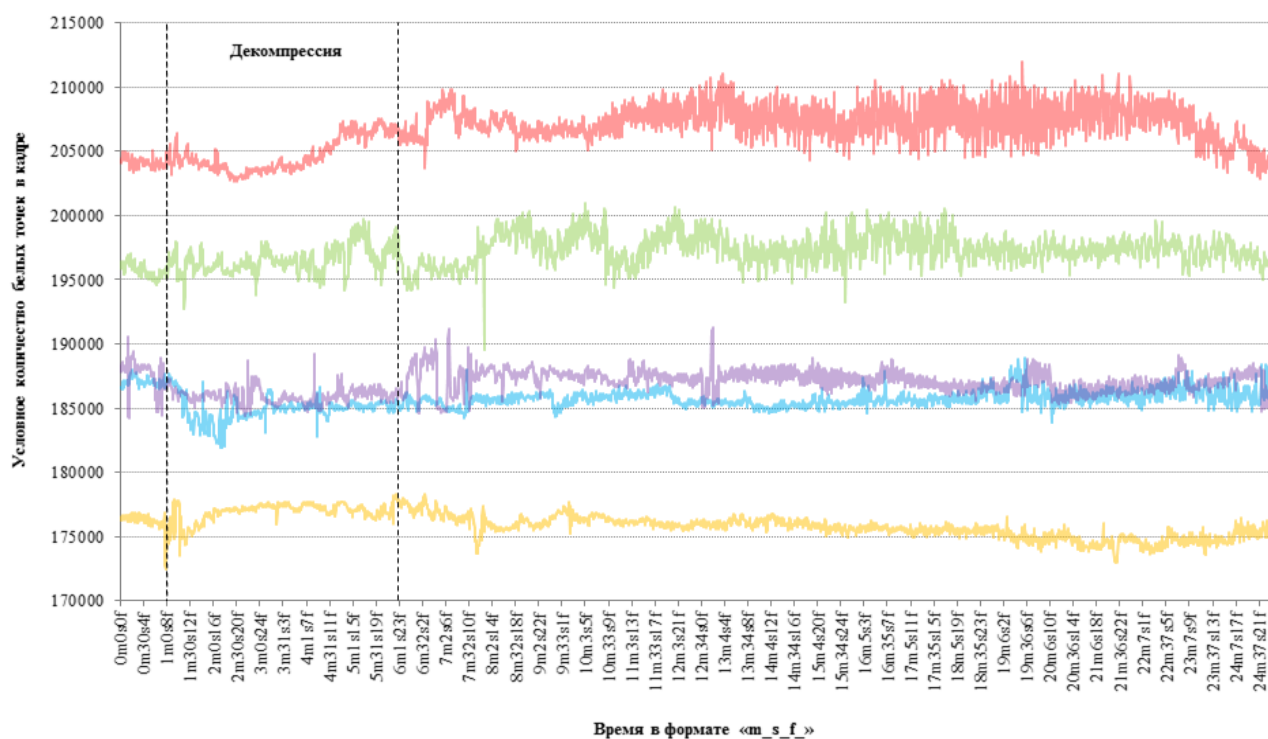


Рис. 7. Исходные данные для группы «атропин». Изменения условного количества белых точек в кадре на протяжении видеорегистрации. Отображено условное количество белых точек в кадрах обработанной видеозаписи с учетом времени для 5 животных в группе

Fig. 7. Initial data for atropine group. Changes in the conditional number of white points in the frame during video recording. The conditional number of white dots in the frames of the processed video is displayed, for 5 animals in the group at different time points

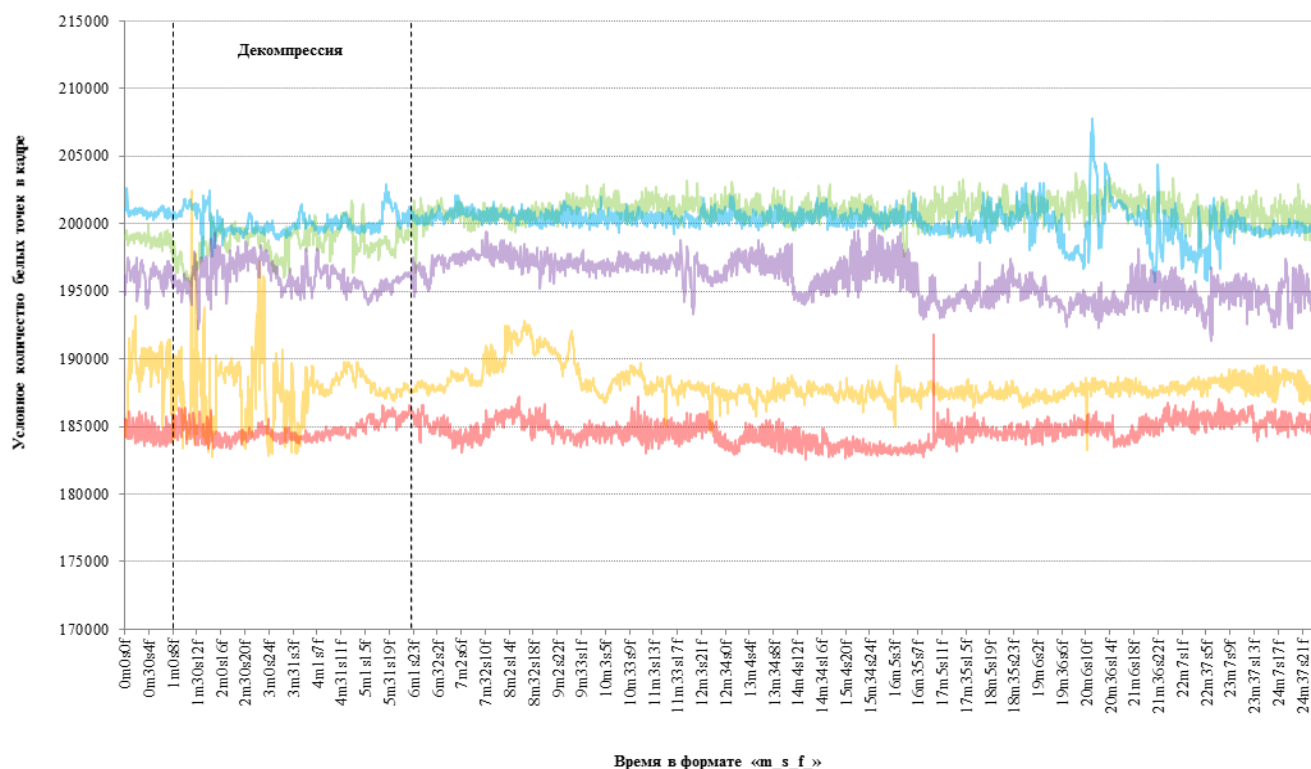


Рис. 8. Исходные данные для группы «пилокарпин». Изменения условного количества белых точек в кадре на протяжении видеорегистрации. Отображено условное количество белых точек в кадрах обработанной видеозаписи с учетом времени для 5 животных в группе

Fig. 8. Initial data for the pilocarpine group. Changes in the conditional number of white points in the frame while video recording. The conditional number of white dots in the frames of the processed video is displayed, for 5 animals in the group at different time points

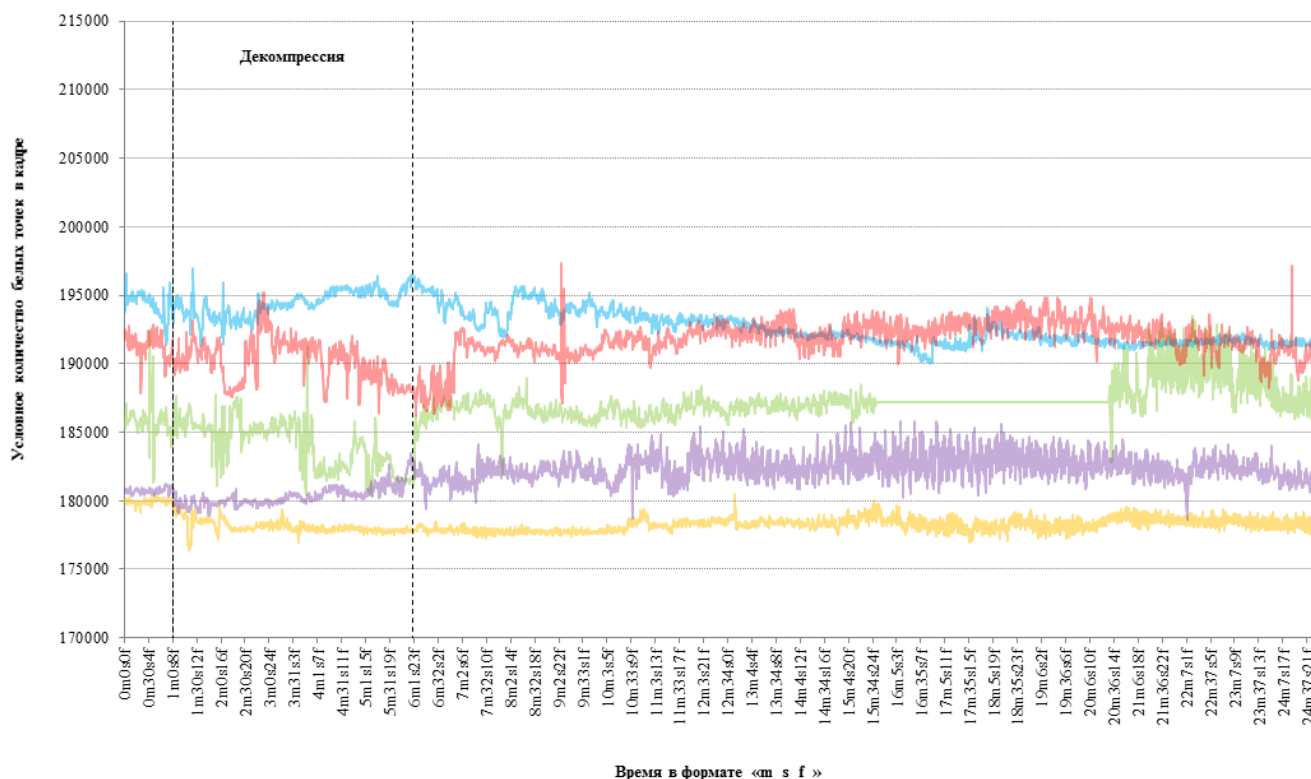


Рис. 9. Исходные данные для группы «дротаверин». Изменения условного количества белых точек в кадре на протяжении видеорегистрации. Отображено условное количество белых точек в кадрах обработанной видеозаписи с учетом времени для 5 животных в группе

Fig. 9. Initial data for the drotaverine group. Changes in the conditional number of white points in the frame while video recording. The conditional number of white dots in the frames of the processed video is displayed, for 5 animals in the group at different time points

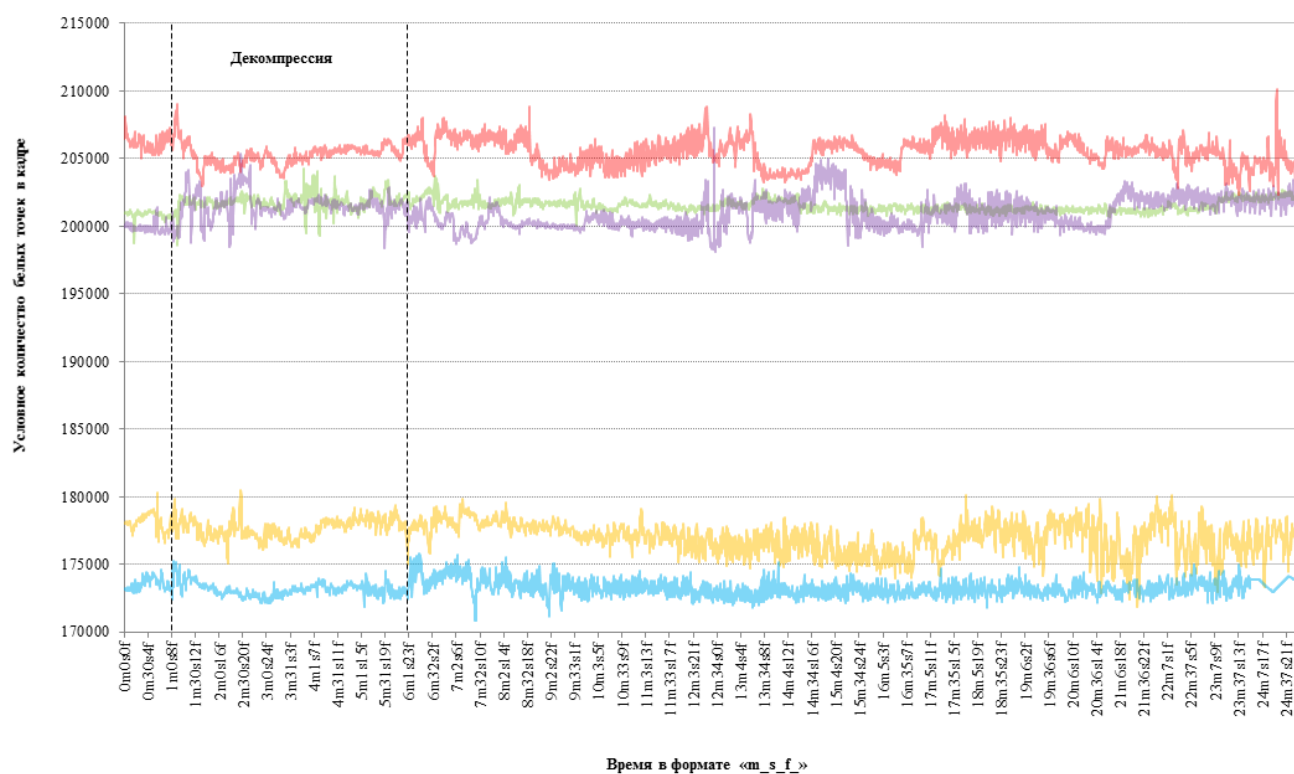


Рис. 10. Исходные данные для группы «хлоропирамин». Изменения условного количества белых точек в кадре на протяжении видеорегистрации. Отображено условное количество белых точек в кадрах обработанной видеозаписи с учетом времени для 5 животных в группе

Fig. 10. Initial data for the chloropyramine group. Changes in the conditional number of white points in the frame while video recording. The conditional number of white dots in the frames of the processed video is displayed, for 5 animals in the group at different time points

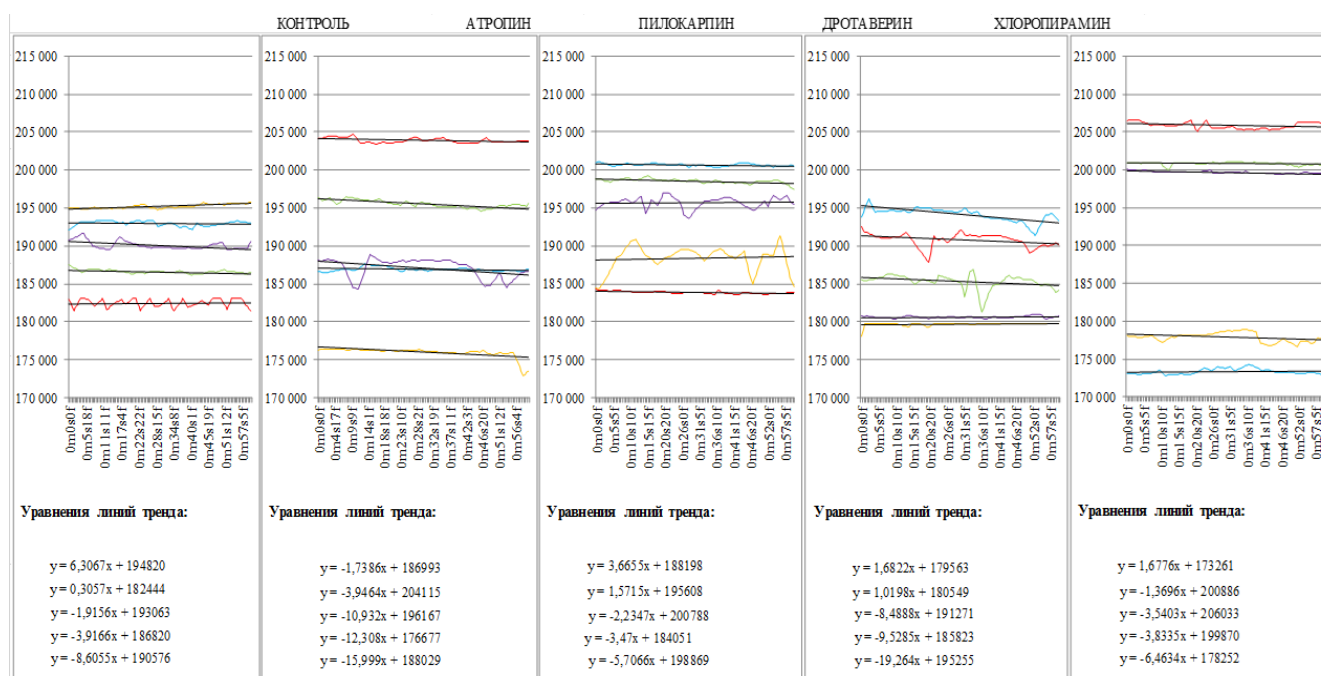


Рис. 11. Данные, полученные путем сглаживания недостоверных значений кривой исходных данных за период до декомпрессии. Отображено условное количество белых точек в кадрах обработанной видеозаписи для 5 животных в группе

Fig. 11. Data obtained by smoothing unreliable values of the original data curve for the period before decompression. The conditional number of white dots in the frames of the processed video is displayed, for 5 animals in the group at different time points

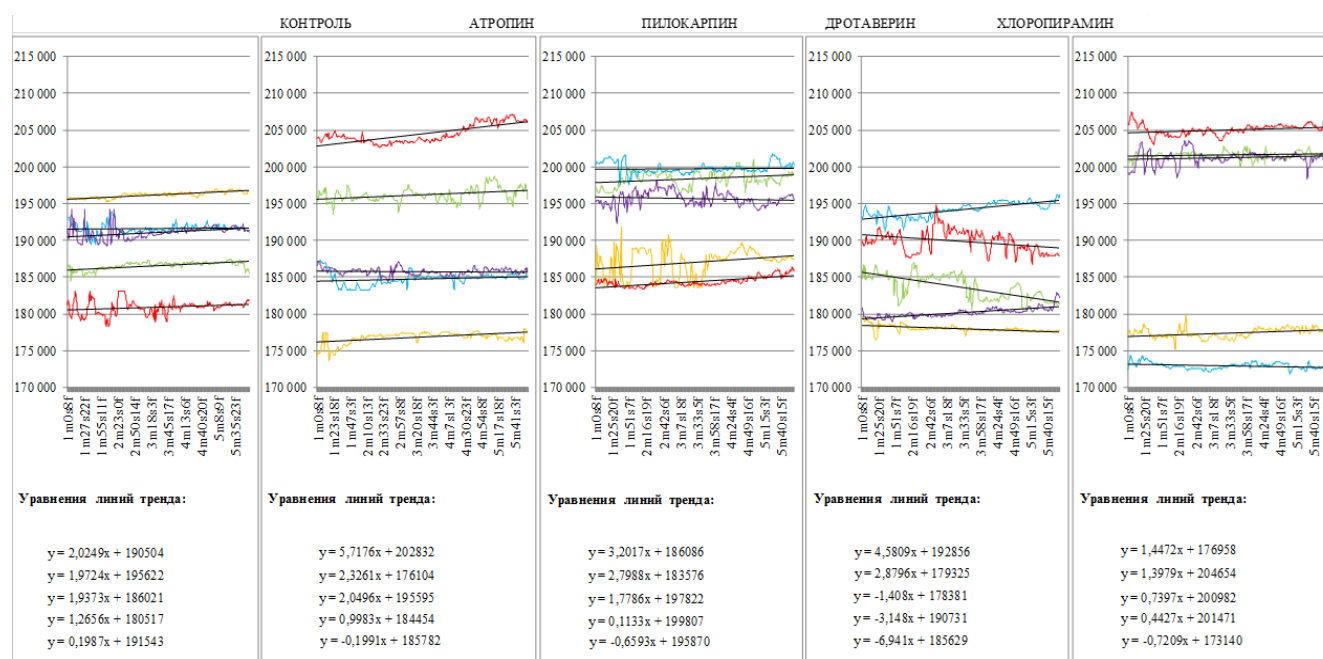


Рис. 12. Данные, полученные путем сглаживания недостоверных значений кривой исходных данных за период декомпрессии. Отображено условное количество белых точек в кадрах обработанной видеозаписи для 5 животных в группе

Fig. 12. Data obtained by smoothing unreliable values of the original data curve over the decompression period. The conditional number of white dots in the frames of the processed video is displayed, for 5 animals in the group at different time points

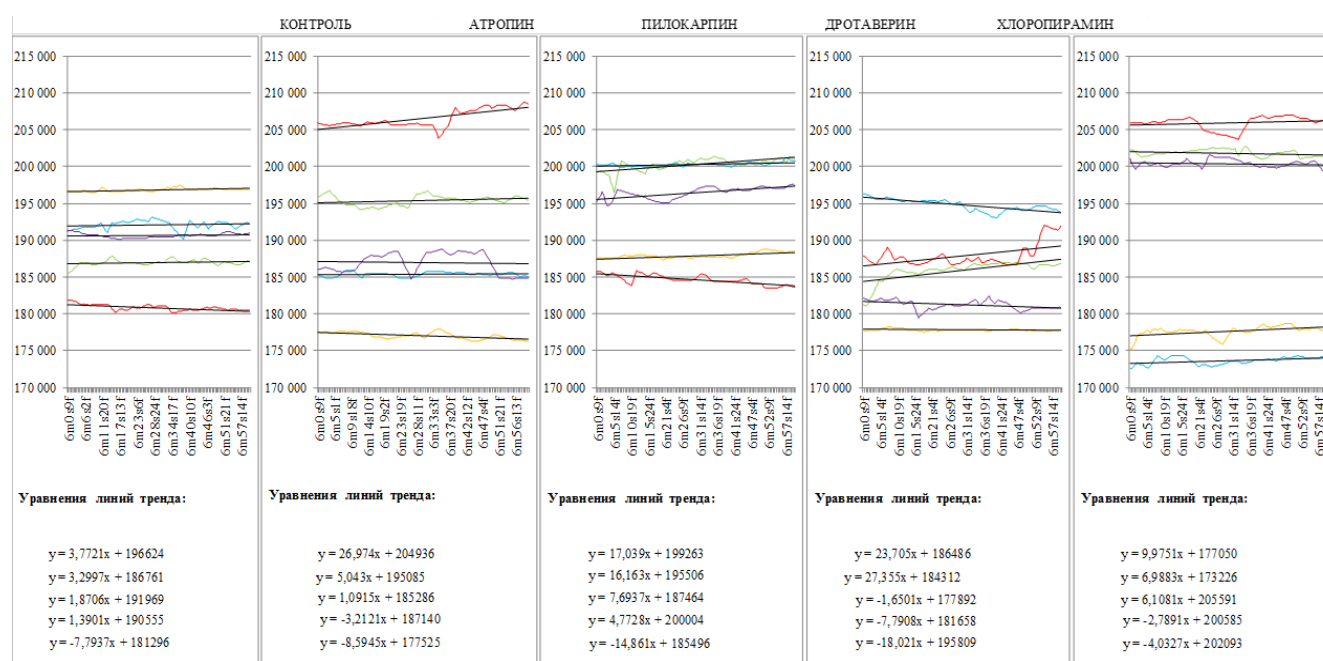


Рис. 13. Данные, полученные путем сглаживания недостоверных значений кривой исходных данных за 1-ю минуту после декомпрессии. Отображено условное количество белых точек в кадрах обработанной видеозаписи для 5 животных в группе

Fig. 13. Data obtained by smoothing unreliable values of the original data curve in the first minute after decompression. The conditional number of white dots in the frames of the processed video is displayed, for 5 animals in the group at different time points

Деление полученного значения на 255 (максимальное значение яркости пиксела) позволяло определить условное количество белых точек в кадре.

Программа записывала обозначенные выше данные в формате таблицы «Excel».

Результаты исследования и их обсуждение

Предложенная методика позволяет получить наглядный материал, пригодный к дальнейшей статистической обработке, и может быть внедрена в исследовательскую практику.

На рис. 5 приведены стоп-кадры полученных видеозаписей, сделанные в определенных временных точках.

Эти кадры позволяют говорить о том, что получаемые данные (видео и изображения) обладают высоким качеством и позволяют визуализировать изменения, происходящие в микроциркуляторном русле на фоне экспериментального воздействия, делая возможным применение программного метода для оценки динамики этих изменений.

Данные, полученные в результате биомикроскопии и видеорегистрации изменений микроциркуляции

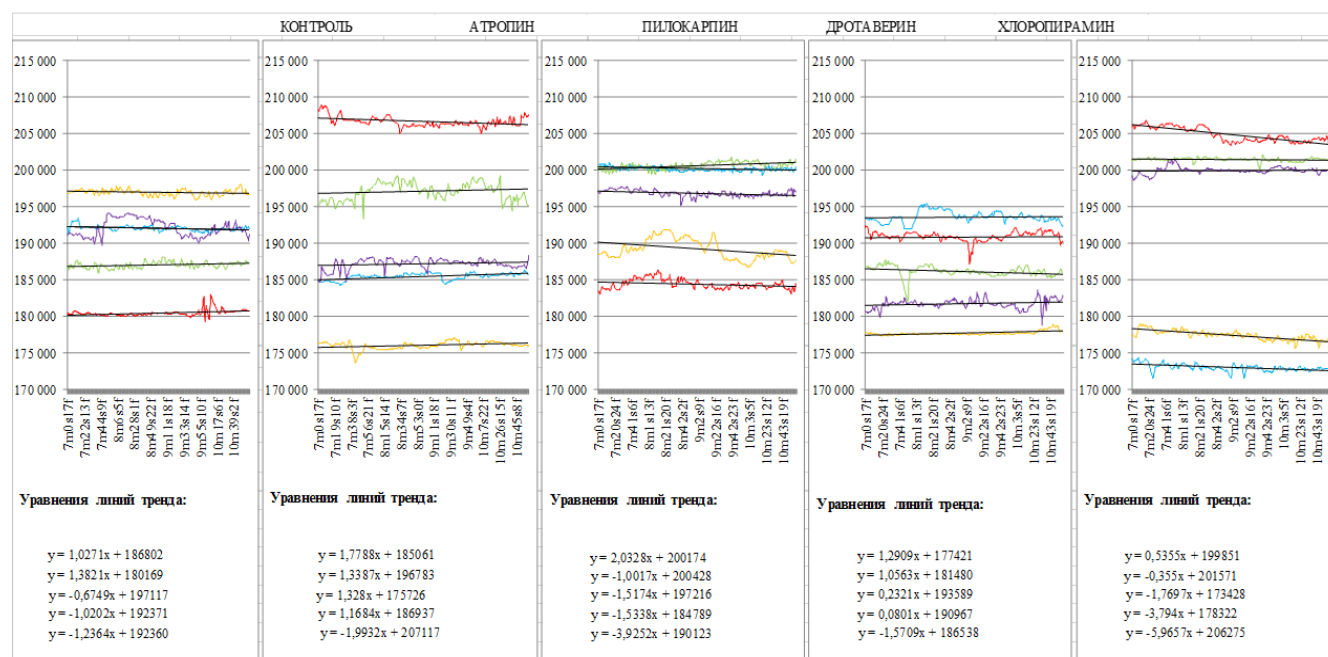


Рис. 14. Данные, полученные путем сглаживания недостоверных значений кривой исходных данных за период от 1 до 5 мин после декомпрессии. Отображено условное количество белых точек в кадрах обработанной видеозаписи для 5 животных в группе

Fig. 14. Data obtained by smoothing unreliable values of the original data curve from 1 to 5 minutes after decompression. The conditional number of white dots in the frames of the processed video is displayed, for 5 animals in the group at different time points

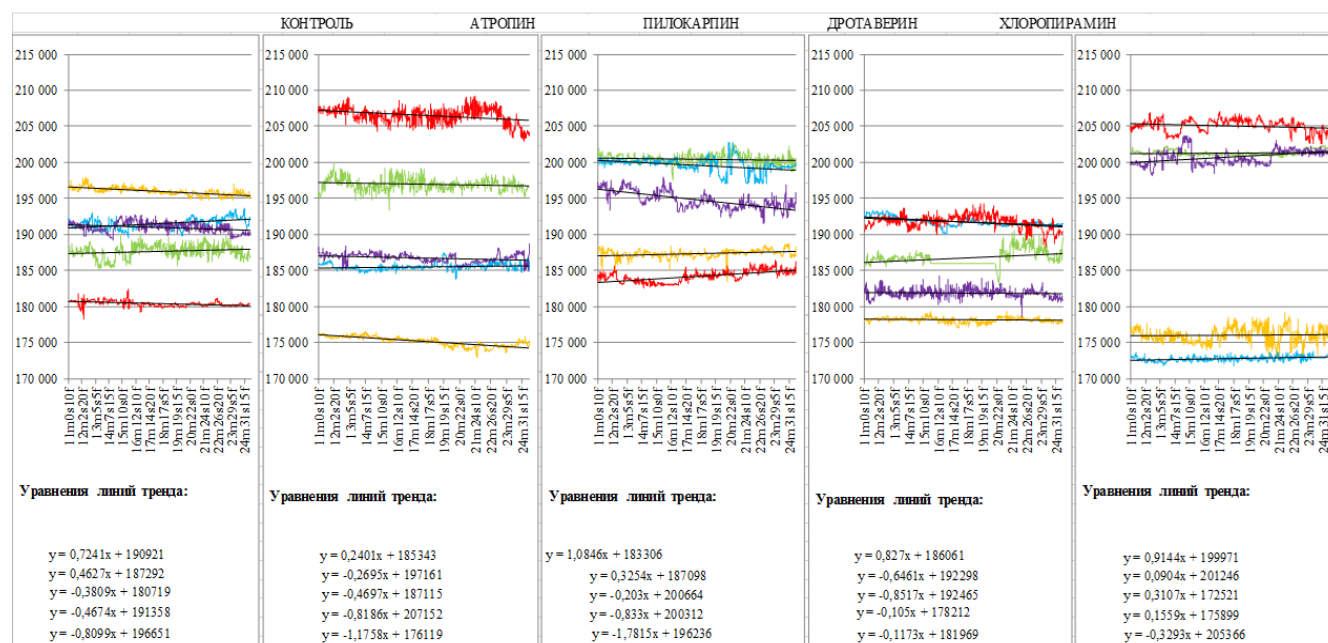


Рис. 15. Данные, полученные путем сглаживания недостоверных значений кривой исходных данных за период от 5 до 19 мин после декомпрессии. Отображено условное количество белых точек в кадрах обработанной видеозаписи для 5 животных в группе

Fig. 15. Data obtained by smoothing unreliable values of the original data curve from 5 to 19 minutes after decompression. The conditional number of white dots in the frames of the processed video is displayed, for 5 animals in the group at different time points

в сосудах брыжжейки и кишечника крыс в условиях локальной абдоминальной декомпрессии и после нее. Видеорегистрация в ходе биомикроскопии позволила оценить и сравнить функциональные изменения микроциркуляторного русла кишечника и брыжжейки крысы в исходном состоянии, во время сеанса локальной абдоминальной декомпрессии и после него.

Полученные видеофайлы анализировались с помощью программы, которая фиксирует яркость каждого кадра в установленные моменты времени.

Значения яркости, которые отображают степень заполнения кадра сосудами, фиксировались в числовом формате с пересчетом на условное количество белых точек в кадре (одна белая точка численно равна 255). Время, соответствующее каждому кадру, фиксировалось в формате «m_s_f» – минуты, секунды и номер кадра в секунде для нумерации каждого обрабатываемого кадра. Данные, полученные после программной обработки видеофайлов, показаны на рис. 6–10.

Динамика изменения количества сосудов

Dynamics of changes in the amount of vessels

Период	Группа									
	контроль		атропин		пилокарпин		дротаверин		хлоропирамин	
До декомпрессии	Сужение		Сужение		Сужение		Сужение		Сужение	
	Среднее	-0,22 %	Среднее	-0,56 %	Среднее	-0,23 %	Среднее	-0,55 %	Среднее	-0,23 %
	SD	0,23 %	SD	0,38 %	SD	0,10 %	SD	0,50 %	SD	0,14 %
	n	4	n	5	n	3	n	4	n	4
Декомпрессия	Расширение		Расширение		Расширение		Сужение		Расширение	
	Среднее	0,09 %	Среднее	0,13 %	Среднее	0,12 %	Среднее	-0,24 %	Среднее	0,06 %
	SD	0,05 %	SD	0,13 %	SD	0,09 %	SD	0,18 %	SD	0,03 %
	n	5	n	5	n	4	n	3	n	4
1-я минута после декомпрессии	Расширение		Расширение		Расширение		Расширение		Расширение	
	Среднее	0,16 %	Среднее	0,19 %	Среднее	0,68 %	Среднее	1,03 %	Среднее	0,33 %
	SD	0,07 %	SD	0,16 %	SD	0,36 %	SD	0,10 %	SD	0,35 %
	n	4	n	2	n	4	n	3	n	4
От 1 до 5 мин после декомпрессии	Сужение		Расширение		Сужение		Расширение		Сужение	
	Среднее	-0,06 %	Среднее	0,09 %	Среднее	-0,12 %	Среднее	0,04 %	Среднее	-0,14 %
	SD	0,02 %	SD	0,02 %	SD	0,08 %	SD	0,04 %	SD	0,15 %
	n	3	n	4	n	4	n	4	n	5
От 5 до 19 мин после декомпрессии	Сужение		Сужение		Сужение		Сужение		Расширение	
	Среднее	-0,03 %	Среднее	-0,04 %	Среднее	-0,06 %	Среднее	-0,03 %	Среднее	0,02 %
	SD	0,01 %	SD	0,03 %	SD	0,05 %	SD	0,02 %	SD	0,000 %
	n	3	n	3	n	3	n	4	n	4

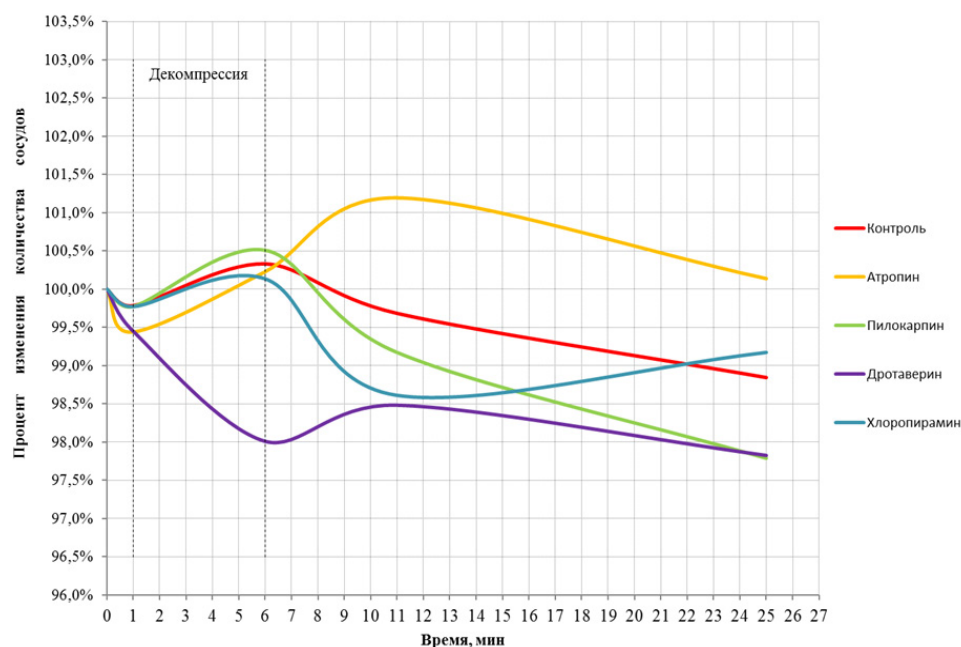


Рис. 16. Динамика изменения количества сосудов. Представлен обобщенный график, отображающий усредненный по группам процент изменения количества сосудов в кадрах видеозаписи, полученной в ходе биомикроскопии микроциркуляторного русла брыжейки и кишечника крыс, т. е. скорость или динамику изменения количества сосудов в поле зрения

Fig. 16. Dynamics of changes in the amount of vessels. A generalized graph showing the group-averaged percent change in the number of vessels in the video footage obtained by biomicroscopy of the mesentery and intestine microvasculature of rats, i.e., the rate or dynamics of the change in the number of vessels in the field of view

Искажающие факторы (сокращения кишечника, смещение изображения и автонастройка баланса белого) и недостоверные значения были исключены с помощью компьютерного анализа.

После этого данные были разбиты на пять временных интервалов (рис. 11–15).

Выполнив анализ на основании коэффициентов уравнений линий тренда, построенных на приведенных ранее графиках, определили основные тенденции изменения количества функционирующих микрососудов в поле зрения.

Яркость для видеозаписей экспериментов различна, поэтому учитывалось относительное изменение числа белых точек, т. е. отношение изменения яркости к ее начальному значению.

На основании результатов этих вычислений, исключив недостоверные значения, было определено достоверное значения динамики изменения количества сосудов.

Результаты, полученные после статистической обработки экспериментальных данных, приведены в таблице и на рис. 16.

Таким образом, был исследован механизм физиологического ответа на сеанс локальной абдоминальной декомпрессии. Статистический анализ подтверждает гипотезы о том, что приведенные фармакологические субстанции оказывают влияние на микроциркуляцию в условиях ЛОД:

1) локальная абдоминальная декомпрессия вызвала увеличение кровенаполнения и расширение сосудов (капилляров, венул) микроциркуляторного русла брыжейки и кишечника во всех исследуемых группах, кроме той, где применялся дротаверин;

2) в некоторых группах ЛОД-индуцированная гиперемия имела постэффект (продолгование).

Показано, что продолгование эффекта гиперемии при используемом диапазоне разрежения в камере достигается только в присутствии определенных агентов, что позволяет судить о задействованности определенных рецепторных полей.

По данным статистического анализа:

– отмечена тенденция к сужению микрососудов во время ЛОД при использовании дротаверина (миотропный спазмолитик, ингибитор ФДЭ IV). Тем не менее в период 5 мин после декомпрессии отмечена тенденция к расширению микрососудов;

– при использовании М-холинолитика атропина ЛОД имеет наиболее выраженный пост-эффект – расширение сосудов продолжается в течение 5 мин после декомпрессии;

– при использовании блокатора H1-гистаминовых рецепторов с М-холинолитическим эффектом (хлоропирамина) пост-эффект ЛОД в первые 5 мин после сеанса не выявлен – сосуды сужаются, но есть стойкая тенденция к их расширению по истечении этого периода;

– при использовании М-холиномиметика пилокарпина, как и в контрольной группе, отмечается постепенное сужение микрососудов после ЛОД.

Исследование проведено в рамках государственного задания «Разработка технологии изготовле-

ния липосомальных форм кардиопротекторов для направленной доставки в миокард»

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Аванесов В. У. Применение локального отрицательного давления в подготовке спортсменов: монография. – М.: СпортАкадемПресс, 2001. – 84 с. – (Медицина – спорт). [Avanesov VU. Local Negative Pressure Application in the Training of Athletes: Monograph. Moscow, SportAcademPress, 2001:84. (In Russ.)].
2. Длигач Д. Л., Иоффе Л. А., Коробков А. В. Физиологические механизмы функциональных сдвигов при локальной декомпрессии // Материалы итоговой науч. конф. – М.: ВНИИФК, 1975. – 110 с. [Dligach DL, Ioffe LA, Korobkov AV. Physiological Mechanisms of Functional Shifts Due to Local Decompression // Materials of the final scientific conference. Moscow, VNIIFK, 1975:110. (In Russ.)].
3. Михайличенко П. П. Основы вакуум-терапии: теория и практика. – М.: АСТ; СПб.: Сова, 2005. – 318 с. [Mikhaylichenko PP. Basics of Vacuum-therapy: Theory and Practice. Moscow, AST, 2005:318. (In Russ.)].
4. Чернух А. М., Александров П. Н., Алексеев О. В. Микроциркуляция. – М.: Медицина, 1984. – 432 с. [Chernukh AM, Aleksandrov PN, Alekseev OV. Microcirculation. Moscow, Medicin, 1984:432. (In Russ.)].
5. Adrill B, Fentem P, Finley R et al. K2Adrill B. Some effects on the blood vessels of the human forearm of local exposure to pressure below sub atmospherica // J. Physiol. 1969;80:31. Doi: 10.1113/jphysiol.1969.sp008847.
6. Muenchow S, Horch RE, Dragu A. Effects of topical negative pressure therapy on perfusion and microcirculation of human skin // Clin Hemorheol Microcirc. 2019;72(4):365–374. Doi: 10.3233/CH-180536. PMID: 30909192.
7. Прижизненная микроциркуляция сосудов брыжейки крыс до и после воздействия ЛОД // Л. В. Жичкина, В. Г. Скопичев, М. К. Касумов, М. Л. Васютина // Трансляцион. мед. – 2015. – № 1. – С. 46–51. [Zhichkina LV, Skopichev VG, Kasumov MK, Vasutina ML. Vital Microcirculation of Vessels of A Mesenterium of Rats Before And After Influence of Local Negative Pressure // Translational Medicine. 2015;(1):46–51. (In Russ.)]. Doi: 10.18705/2311-4495-2015-0-1-46-51.
8. Скопичев В. Г., Жичкина Л. В. Физиология локального отрицательного давления // В Абдоминальная декомпрессия в медицине: теория и практика. – СПб., 2004. – С. 29–51. [Skopichev VG, Zhichkina LV. Physiology of Local Negative Pressure // Abdominal Decompression in Medicine. Theory and Practice. SPb., 2004:29–51. (In Russ.)].
9. Семенова А. Е., Марьяновская Ю. В. Разработка методов вакуум-градиентной физиотерапии при заболеваниях конечностей // Вестн. Новгород. гос. ун-та. – 2015. – № 3-1 (86). – С. 72–75. [Semenova AE, Mar'yanovskaya YuV. The development of methods of vacuum gradient physiotherapy for diseases of the extremities // Vestnik NovSU. 2015;3(86):72–75. (In Russ.)].
10. Гайдуков С. Н., Прохорович Т. И., Скопичев В. Г. Абдоминальная декомпрессия – стационарзамещающая технология для акушерства и гинекологии // Абдоминальная декомпрессия в медицине: теория и практика. – СПб., 2004. – С. 6–11. [Gaydukov SN, Prokhorovich TI, Skopichev VG. Abdominal Decompression - Stationary Replacement Technology for Obstetrics and Gynecology // Abdominal Decompression in Medicine. Theory and Practice. SPb., 2004:6–11. (In Russ.)].

11. Henry, Reynold & Ghafil, Cameron & Golden, Adam & Berry, Emily & Grabo, Daniel & Matsushima, Kazuhide & Clark, Damon & Inaba, Kenji & Carey, Joseph & Strumwasser, Aaron. A Novel Abdominal Decompression Technique to Treat Compartment Syndrome After Burn Injury // *Journal of Surgical Research*. 2020;(260). Doi: 10.1016/j.jss.2020.11.019.

12. Thomas Auer, Siegfried Sauseng, Pavle Delcev and Peter Kohek. Effect of Negative Pressure Therapy on Open Abdomen Treatments. Prospective Randomized Study With Two Commercial Negative Pressure Systems // *Front. Surg.* 2021. Doi: 10.3389/fsurg.2020.596056.

13. Смоличев Е. П., Володин В. М. Метод прижизненного изучения капиллярного кровообращения с фотоэлектрической регистрацией диаметра сосудов и определением скорости кровотока // *Патолог. физиология и эксперимент. терапия*. – 1968. – № 3. – С. 74–75. [Smolichev EP, Volodin VM. A Method of Intravital Capillary Circulation Study with Photoelectric Registration of the Diameter of the Vessels and Determination of the Blood Flow Rate // *Patol Fiziol Eksp Ter.* 1968;12(3):72–77. (In Russ.)]. PMID: 5747739.

14. Патент № 662070. «Пособ фиксация кишечной петли при витальной микроскопии» / Котляров В. С. 1977. [Patent № SU662070A1. Method of Intestinal Loop Fixation in Vital Microscopy / Kotlyarov V. S. 1977. (In Russ.)].

15. Васютина М. Л., Смирнова С. В. Сравнительный анализ препаратов, используемых для общей анестезии у крыс. // *Вестн. Новгород. гос. ун-та им. Ярослава Мудрого*. – 2015. – № 3-1 (86). – С. 41–43. [Vasyutina ML, Smirnova SV. Comparative Analysis of Drugs Used for General Anesthesia in Rats // *Vestnik NovSU*. 2015;3(86):41–43. (In Russ.)].

16. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals / American Veterinary Medical Association. 2013.

17. Патент № 170951. Установка для биомикроскопии сосудов брыжейки крыс при проведении локальной абдоминальной декомпрессии / Королев Д. В., Васютина М. Л., Скопичев В. Г., Петрова А. Е. 2017 г. [Patent № RU170951U1. Unit for Rat Mesentery Vascular Biomicroscopy During Local Abdominal Decompression / Korolev DV, Vasyutina ML, Skopichev VG, Petrova AE. 2017. (In Russ.)].

18. Каламбет Ю. А., Козьмин Ю. П., Самохин А. С. Фильтрация шумов. Сравнительный анализ методов // *Аналитика*. – 2017. – № 5 (36). – С. 88–101. [Kalambet, Yuri & Kozmin, Y. & Samokhin, A. (2017). Noise filtering. Comparative analysis of methods // *Analytics*. 2017;(5(36)):88–101. (In Russ.)]. Doi: 10.22184/2227-572X.2017.36.5.88.101.

Информация об авторах

Васютина Марина Львовна – научный сотрудник НИЛ биопротезирования и кардиопротекции, главный ветеринарный врач Ветеринарной службы, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алма-

зова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: raluwow@gmail.com.

Петрова Александра Евгеньевна – ведущий инженер-архитектор, АО «Российский научный центр „Прикладная химия (ГИПХ)“», Санкт-Петербург, Россия, e-mail: petrova_ae.spb@mail.ru.

Бойкова Валерия Викторовна – лаборант-исследователь Ветеринарной службы, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: mzk.taru@gmail.com.

Бойков Леонид Владимирович – лаборант-исследователь Ветеринарной службы, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: leonid.v.boikov@gmail.com.

Скопичев Валерий Григорьевич – доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: Fysiology@yandex.ru.

Королев Дмитрий Владимирович – доктор химических наук, зав. НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: office@cardioprotect.spb.ru.

Authors information

Vasyutina Marina L. – research associate of Research Laboratory of Bioprosthesis and Cardiac Protection, Chief Veterinarian of Veterinarian department, Federal State Budgetary Institution «Almazov National Medical Research Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia, e-mail: raluwow@gmail.com.

Petrova Aleksandra E. – Lead architect engineer, Russian Research Center Applied Chemistry (GIPH) JSC, Saint-Petersburg, Russia, e-mail: petrova_ae.spb@mail.ru

Boykova Valeriya V. – laboratory research assistant of Veterinary department, Federal State Budgetary Institution «Almazov National Medical Research Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia, e-mail: mzk.taru@gmail.com.

Boikov Leonid V. – laboratory research assistant of Veterinary department, Federal State Budgetary Institution «Almazov National Medical Research Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia, e-mail: leonid.v.boikov@gmail.com.

Skopichev Valeriy G. – Doctor of Biological Sciences, Professor, Department of Physiology Federal State Budgetary Institution «Almazov National Medical Research Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia, e-mail: Fysiology@yandex.ru.

Королев Дмитрий Владимирович – Doctor of Chemical Sciences, Head of the Research Laboratory of Nanotechnology, Federal State Budgetary Institution «Almazov National Medical Research Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia, e-mail: office@cardioprotect.spb.ru.