

ИССЛЕДОВАНИЕ РИТМИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТ КОЖНОЙ МИКРОГЕМОДИНАМИКИ У МЫШЕЙ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ДОППЛЕРОВСКОЙ ФЛОУМЕТРИИ

© 2018 г. М.Е. Асташев, Д.А. Серов*, А.В. Танканаг

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

**Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 2*

E-mail: astashev@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.10.17 г.

Проведено исследование кожного кровотока методом лазерной доплеровской флоуметрии с использованием 14 мышей-самцов линии BALB/c. Кожный кровоток регистрировали на подушечке задней левой лапы. Для проведения измерений кожной микрогемодинамики предложен протокол иммобилизации животного наркозом, включающим два компонента: золетил инъекционно и закись азота ингаляционно. Определены границы низкочастотных диапазонов колебаний периферической микрогемодинамики для мышей, которые совпадают с границами, определенными для человека и крысы.

Ключевые слова: лазерная доплеровская флоуметрия, колебания кожной микрогемодинамики, адаптивный спектральный вейвлет-анализ, лабораторные животные, анестезия.

Оценка параметров микроциркуляции крови методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) – перспективный неинвазивный метод диагностики состояния микрососудистого русла [1]. В настоящее время основная часть работ по исследованию микроциркуляции методом ЛДФ проводится с участием добровольцев и пациентов, при этом такие исследования имеют ряд методических и методологических ограничений, поэтому необходимо привлечение физиологических моделей [2]. Исследование кожного кровотока на физиологических моделях с использованием лабораторных животных позволяет экспериментально проверять гипотезы, недоступные при работе с добровольцами-людьми. Однако, в отличие от добровольцев, исследование кожной микрогемодинамики у животных требует искусственного обездвижения животного, поскольку известно, что кровоток очень лабилен, а метод ЛДФ чувствителен к механическому движению во время измерений. Традиционные препараты, используемые для общего наркоза, такие как кетамин, закись азота, изофлуран, действуют на передачу нервного импульса через синапс, тем самым нарушая в основном, но не исключительно, работу центральной нервной системы. Также, вероятно, они вызывают нарушения в аффе-

рентной и эфферентной инервации, что может в конечном итоге приводить к нарушениям нормальной ритмики кровотока, особенно в области низких частот. Более того, влияние общего наркоза на ритмические компоненты микроциркуляторного кровотока может объяснить ряд побочных эффектов при погружении пациентов в состояние длительного наркоза, например, при искусственной коме, что может приводить к пролежням и т.д.

В настоящее время комбинации инъекционных и ингаляционных анестетиков широко используются для иммобилизации и наркоза таких животных, как крысы, мыши, морские свинки [2–4]. Традиционно в ветеринарной практике широко используется золетил, который представляет собой композицию из тилетамина и золезипама. Механизм анестетического действия тилетамина основан на ингибировании NMDA-рецепторов. Однако золетил обладает достаточно существенным побочным эффектом в виде судорог [5,6]. Для устранения этого эффекта золетил комбинируют с анестетиками, являющимися агонистами α -2-адренергических рецепторов (например, ксилазином). Наши предварительные эксперименты показали, что ксилазин, являясь миорелаксантом, снижает, а иногда и полностью блокирует, формирование низкочастотных ритмов в кожном кровотоке наркотизированных животных. Таким образом,

Сокращение: ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия.

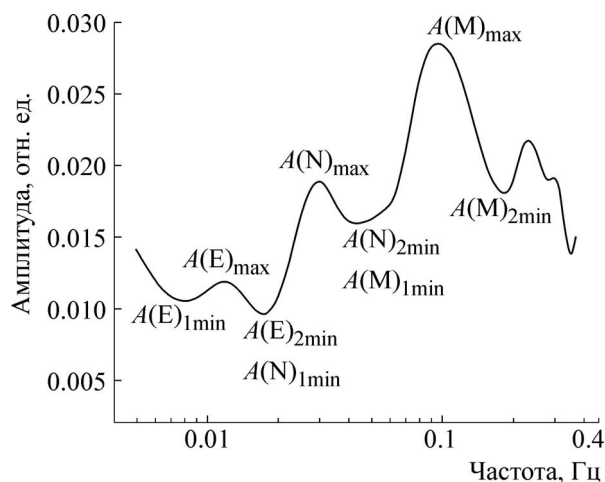


Рис. 1. Методика определения границ низкочастотных интервалов. Описание параметров A_{max} , A_{1min} и A_{2min} приведено в тексте.

для корректного исследования ритмических компонент кожной микрогемодинамики у животных возникла необходимость поиска других способов иммобилизации без подавления низкочастотной ритмики в процессе измерений. Целью настоящей работы было подобрать протокол для адекватной анестезии животного при исследовании кожного кровотока методом ЛДФ. Для этого в качестве наркоза была выбрана комбинация инъекционного анестетика – золетила с ингаляционным анестетиком – закисью азота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Измерения. Для исследования были использованы 14 мышей (самцы линии BALB/c массой 23–27 г, возраст 6–7 недель). Перед измерениями в течение одной недели мышей выдерживали в лаборатории в условиях 12-часового светового дня.

Перед измерением мыши проходили пре-кондицию с использованием газовой смеси из 77% N_2O и 23% O_2 (ООО «КсеМед», Химки Московской области) в течение 5 мин. Далее животным вводили золетил в дозе 50 мг/кг массы интраперитонеально. В течение 3–5 мин животное достигало степени наркотизации с полной потерей рефлексов и полной неподвижностью. Глубину наркоза проверяли путем проверки рефлексов на щипок пинцетом кожи хвоста и pedalный рефлекс на оттягивание лапы [7,8]. Животное переносили в измерительную камеру, располагали лежа на животе и присоединяли электроды электрокардиографа (передняя левая и задняя правая лапы, индифферентный электрод на хвосте), ЛДФ-зонд (на

подушке левой задней лапы), ректальный термометр, маску для подачи газовой смеси (77% N_2O и 23% O_2) и для измерения частоты дыхания.

Для измерения кожной микроциркуляции использовали лазерный доплеровский флоуметр ЛАКК-01 (НПП «ЛАЗМА», Москва), позволяющий проводить зондирование ткани в видимой красной области спектра (длина волны 630 нм) [1]. Место установки ЛДФ-зонда выбрано в соответствии с ранее опубликованными методическими подходами [2]. Электрокардиограммы регистрировали при помощи блока SparkFun Single Lead Heart Rate Monitor (SparkFun Electronics, США) во втором стандартном отведении. Блок был оснащен автономным питанием от батареи для исключения наводок от сети переменного тока. Частоту дыхания регистрировали при помощи термистора прямого нагрева, размещенного в лицевой маске, через которую животному подавали газовую смесь. Аналоговые сигналы с электрокардиографического блока, датчика дыхания, доплерографа и ректального термодатчика регистрировали при помощи аналогово-цифрового преобразователя L-791 («Л-кард», Москва) и программы сбора данных WinEDR 3.2.6 (J. Dempster, Strathclyde University, Великобритания). Частота квантования всех сигналов составляла 500 Гц, продолжительность регистрации – 20 мин. Записи электрокардиограмм и данных с датчика дыхания использовали для определения частоты сердечных сокращений и частоты дыхания с помощью процедуры «Event detection», входящей в состав программного обеспечения WinEDR.

Анализ экспериментальных данных. Амплитудно-частотные характеристики зарегистрированных ЛДФ-сигналов определяли при помощи непрерывного адаптивного вейвлет-преобразования [9,10]. Для каждого амплитудно-частотного спектра определяли положение и амплитуду максимальных значений (пиков) в низкочастотных диапазонах, а также положение и амплитуду минимумов между пиками следующим образом (рис. 1). В примерных границах низкочастотных диапазонов, определенных ранее для человека и крысы [11,12], определяли положение на частотной оси трех амплитуд: максимальной (пиковой) в диапазоне ($A(x)_{max}$) и двух соседних минимальных – слева и справа от $A(x)_{max}$ ($A(x)_{1min}$ и $A(x)_{2min}$ соответственно), где x – обозначает диапазон (E – эндотелиальный, N – нейрогенный, M – миогенный). Для частот, соответствующих $A(x)_{1min}$ и $A(x)_{2min}$, находили средние значения, которые затем использовали для определения левой и правой

Границы низкочастотных диапазонов (Гц) у мыши, крысы и человека

Интервал	Мышь (наши результаты, $n = 14$)	Крыса [11]	Человек [12]
Эндотелиальная активность (E)	0,005 – 0,016	0,009 – 0,02	0,0095 – 0,021
Нейрогенная активность (N)	0,016 – 0,05	0,02 – 0,08	0,021 – 0,052
Миогенная активность (M)	0,05 – 0,2	0,08 – 0,2	0,052 – 0,145

границ низкочастотных интервалов колебаний кожной микрогемодинамики у мышей, предполагая, что они могут отличаться от таковых, полученных для человека и крысы.

Статистический анализ проводили при помощи статистического пакета SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице представлены усредненные границы низкочастотных диапазонов колебаний скорости микроциркуляторного кровотока, которые были определены на основе методики, описанной выше. Следует отметить, что границы диапазонов эндотелиальной (E), нейрогенной (N) и миогенной (M) активности приблизительно совпадают с границами, определенными для крысы [11] и человека [12]. Таким образом, характерные частоты в этих низкочастотных интервалах, в отличие от частоты сердечных сокращений и частоты дыхания, не зависят от размера тела и скорости метаболизма, а источник данных колебаний, по-видимому, имеет универсальную природу.

На рис. 2 представлены усредненные амплитудно-частотные спектры. Видно, что в пределах установленных нами границ низкочастотных интервалов (эндотелиальный (E), нейрогенный (N), миогенный (M)) наблюдаются характерные пики. В предварительных исследованиях со стандартной смесью инъекционных наркотиков «золетил + ксилазин» было обнаружено отсутствие характерных пиков в низкочастотных диапазонах. Кроме того, при использовании смеси «золетил + ксилазин» температура животного падала в среднем до 27°C (без внешнего обогрева), частота дыхания и сердцебиения замедлялась в среднем до $3,05 \pm 0,14$ и $2,78 \pm 0,26$ Гц соответственно. При использовании предлагаемой в данном исследовании методики анестезии смесью «золетил + оксид азота» температура тела животного уменьшалась незначительно (до $\sim 37^{\circ}\text{C}$). Частота сердечных сокращений ($6,26 \pm 0,50$ Гц) и частота дыхания ($3,34 \pm 0,53$ Гц) были близки к физиологически нормальным значениям, описанным в литературе для животных в бодрствующем

состоянии в покое (частота сердечных сокращений от 5,2 до 14 Гц и частота дыхания от 2,33 до 3,50 Гц) [13].

Кроме того, следует отметить, что при использовании предлагаемой анестезии «золетил + закись азота» наблюдался быстрый выход животного из наркоза хирургической глубины после прекращения подачи газовой смеси с закисью азота.

Таким образом, в ходе проведенного исследования предложена новая методика анестезии мышей для проведения измерения параметров кожной микрогемодинамики методом лазерной доплеровской флоуметрии. Разработанный протокол анестезии позволяет достигать хирургической глубины наркотизации, тем самым обеспечив полную неподвижность животного для адекватной регистрации параметров микроциркуляции. Традиционно используемый для анестезии животных золетил сам по себе характеризуется рядом побочных эффектов, которые обусловлены увеличением парасимпатической активности и подавлением симпатической и барорецепторной активности при анестезировании крыс кетамином/ксилазином [14].

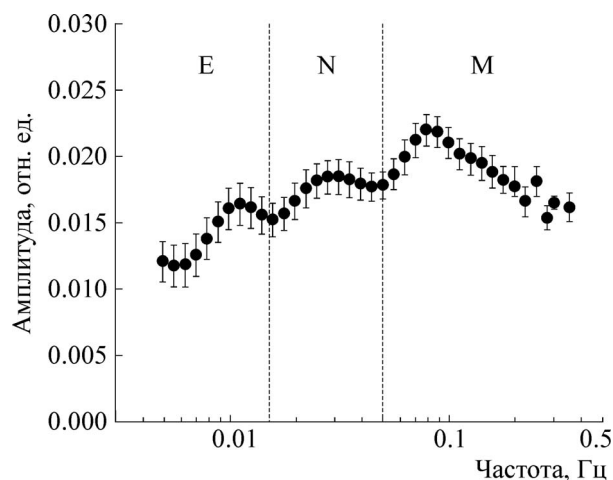


Рис. 2. Фрагмент усредненных амплитудно-частотных спектров колебаний скорости микроциркуляторного кровотока мыши ($n = 14$). Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка. Вертикальными линиями обозначены границы диапазонов: E – эндотелиального, N – нейрогенного, M – миогенного, по нашим данным.

Предлагаемый нами протокол характеризуется снижением нейрогенной активности у анестезированных животных (уменьшением судорожной активности), что может быть результатом подавления симпатической активности закисью азота, для которой показан сдвиг симпатико-парасимпатического баланса к парасимпатической доминанте посредством подавления симпатической активности [15]. Использование закиси азота в качестве второго компонента анестезии позволяет сохранять низкочастотную динамику и корректно анализировать амплитуды колебаний в микроциркуляторном кровотоке мыши в диапазонах эндотелиальной, нейрогенной и миогенной активности.

Разработанный протокол анестезии позволил определить границы низкочастотных интервалов (эндотелиальный, нейрогенный, миогенный) для мышей. Показано, что границы этих интервалов приблизительно совпадают с границами, определенными для крысы и человека, т.е. не зависят от размера тела и скорости метаболизма.

Исследование проведено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-00248).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. И. Крупаткин и В. В. Сидоров, *Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови. Руководство для врачей* (Медицина, М., 2005).
2. S. Gargiulo, M. Gramanzini, and R. Liuzzi, *BMC Vet. Res.* **9**, 255 (2013).
3. E. F. Machado, A. C. Normand, L. A. Nunes, et al., *Braz. J. Med. Biol. Res.* **42**, 1035 (2009).
4. C. Jacobson, *Lab. Anim.* **35**, 271 (2001).
5. T. Klockgether, L. Turski, M. Schwarz, and K. H. Sontag, *J. Brain Res.* **461**, 343 (1988).
6. H. C. Lin, J. C. Thurmon, and G. J. Benson, *Vet. Pharmacol.* **16**, 383 (1993).
7. S. Kawai, Y. Takagi, S. Kaneko, and T. Kurosawa, *Exp. Animals* **60**, 481 (2011).
8. A. Tsukamoto, K. Serizawa, R. Sato, et al., *Exp. Animals* **64**, 57 (2015).
9. A. Tankanag, N. Chemeris, *Phys. Med. Biol.* **53** (21), 5967 (2008).
10. А. В. Танканаг и Н. К. Чемерис, *Биофизика* **54** (3), 537 (2009).
11. J. M. Newman, R. M. Dwyer, and P. St-Pierre, *J. Physiol.* **587**, 2579 (2009).
12. T. Söderström, A. Stefanovska, M. Veber, and H. Svensson, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**, H1638 (2003).
13. И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария и Б. В. Западнюк, *Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте* (Вища школа, Киев, 1983).
14. P. Svorc, Jr., I. Bačová, P. Svorc, and M. Buzga, *Prague Med. Rep.* **114**, 72 (2013).
15. K. Okushima, A. Kohjitani, and Y. Asano, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **106**, e1 (2008).

Study of Oscillatory Components of Skin Microhaemodynamics in Mice by Laser Doppler Flowmetry

M.E. Astashov*, D.A. Serov**, and A.V. Tankanag*

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The skin blood flow was studied by laser Doppler flowmetry. Fourteen male BALB/c mice were used. Skin blood flow in the left hind paw was registered. To measure skin microhaemodynamics, we proposed the protocol of animal immobilization with two types of anesthesia – injection of zoletil and inhaling nitrous oxide. The boundaries of the low-frequency oscillation intervals of peripheral microvascular blood flow dynamics for mice were determined. They coincide with the boundaries determined early for human beings and rats.

Keywords: laser Doppler flowmetry, oscillations of skin microhaemodynamics, adaptive wavelet transform, laboratory animals, anesthesia