

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**Измерение скорости микроциркуляции крови методами оптической
микроскопии**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 2 курса 2224 группы
направления 03.04.02 «Физика»
институт физики
Горелова Алексея Георгиевича

Научный руководитель

к.ф-м.н., доцент

И.В.Федосов

Зав. кафедрой

д.ф-м.н., профессор

Тучин В.В.

Саратов 2021 г.

1. ВВЕДЕНИЕ

Микроциркуляция представляет собой движение крови по сосудистой сети через артериолы, венулы, капилляры и артериовенозные анастомозы (АВА) [1]. Капилляры и мельчайшие венулы сформированы из единственного слоя эндотелиальных клеток, поддерживаемых снаружи богатым коллагеном базальным ламинарным слоем [1,2]. Микрососудистая сеть играет множество ключевых ролей в тканевом метаболизме, включая регулирование транспорта кислорода, поддержание гомеостаза, доставку питательных веществ, воспалительную реакцию и заживление ран.

Актуальность темы определена тем, что кровоток через микроциркуляцию как в простой, так и в сложной геометрии трудно предсказать из-за состава и сложного поведения крови на микромасштабе. В настоящее время отсутствует закон, позволявший бы связать микроскопическую структуру кровотока с макроскопическими реологическими измерениями крови [3]. Что делает особо важными *in vivo* исследования свойств кровотока в микроциркуляции.

Целью работы является исследование возможностей применения прижизненной оптической микроскопии для измерения скоростей микроциркуляции крови а также создание и отработка протоколов обработки и анализа изображений полученных с помощью конфокального микроскопа.

Для реализации цели были решены следующие задачи:

1. Изучение основ гемодинамики и гемореологии
2. Обзор методов оптической флоуметрии
3. Исследование протоколов измерений скорости методом трекинга не меченых эритроцитов
4. Исследование принципов конфокальной микроскопии и методов увеличения контраста конфокальных изображений
5. Обработка изображений, экспериментально полученных лазерным сканирующим конфокальным микроскопом, с целью увеличения их контраста

6. Применение изученных протоколов измерений скорости эритроцитов к обработанным изображениям

Предметом исследования выступают изображения сосудистых сетей коры головного мозга крысы, полученные с помощью лазерного сканирующего микроскопа Nikon Ni-E Microscope A1plus.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА СОДЕРЖАНИЯ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

В первой главе приведён общий обзор литературы на темы гемореологии, оптической флоуметрии, флуоресцентной микроскопии и протоколов измерений скорости кровотока методами трекинга не меченных эритроцитов.

Применимость уравнения Пуазейля к кровообращению нужно рассматривать с учётом того, что в методе, с помощью которого уравнение выводится теоретически, подразумевается ряд таких условий, как однородность жидкости, ламинарность потока, постоянство его скорости, круглое сечение трубки и постоянство диаметра сечения. Ни одно из этих условий не характерно для кровотока в целом. В отличие от плазмы, цельная кровь имеет нелинейное поведение и проявляет свойства псевдопластической жидкости (Рисунок 1.1.3). [3-5] Кажущаяся вязкость крови зависит от скорости сдвига и при высоких значениях напряжения сдвига достигает своего асимптотического значения. Вследствии чего в сосудах большого диаметра, представляющих макроциркуляцию (т.е. > 100 мкм), кровь можно рассматривать как однородный континуум с внутренними свойствами, характеризующимися «кажущейся вязкостью» и ограниченно описываемую уравнением пуазейля. [6,7]

Для измерения скорости кровотока применяется широкий спектр методов, доступных для визуализации микрососудов, с компромиссами между разрешением, проникновением сигнала и получением функциональных показателей, таких как кровоток и оксигенация тканей. Оптические методы визуализации и измерения измерения скорости потока крови делятся на три

категории: 1) методы на основе Доплера, такие как лазерная доплеровская флоуметрия, доплеровская оптическая когерентная томография и фотоакустическая доплеровская велосиметрия [8]. Эти методы являются количественными, но измерение в широком поле зрения с высокой частотой кадров ограничено. 2) Спекл-методы, такие как лазерная спекл-контрастная визуализация (LSCI) [8] и многоэкспозиционная спекл-визуализация (MESI).[8] 3) Измерения отслеживания эритроцитов (RBC), такие как прижизненная многофотонная лазерная сканирующая микроскопия (MPLSM), конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (CLSM) и голографическая фазовая микроскопия [8].

Из них MPLSM и CLSM обладают одним из лучших разрешений и позволяют количественно измерять абсолютные значения скорости эритроцитов множеством методов трекинга эритроцитов.

Во второй главе приведено описание методов повышения контраста и проведения измерений в конфокальных изображениях.

Перед экспериментом крысе предварительно было имплантировано в череп специальное окно для доступа света к сосудистым сетям коры головного мозга. Крыса была введена в медикаментозный сон и в хвостовую вену через катетер ей был введён краситель FITC. После чего конфокальным микроскопом Nikon A1plus были засняты два файла разрешением 512x512 пикселей: 1 ый - двумерный скан в резонансном режиме сканирования с частотой кадров 30 fps и калибровкой 0,61 микрон на пиксель, и второй - z-stack 3-х мерная микроангиограмма с частотой кадров ~0,72 fps, калибровкой 0,51 микрон на пиксель и шагом 1,2 мкм по оси z.

В результате того, что свет поглощается и рассеивается проходя через среду, срезы имеют тенденцию к постепенному затемнению с увеличением глубины. Так

как процесс поглощения и рассеивания света в среде описывается экспоненциальным законом Бугера-Ламбера-Бера (Выражение 2.2.1) [1] то падение интенсивности вдоль записанного стака было аппроксимировано экспоненциальной функцией.

PSF микроскопа может быть определена теоретически с использованием математической модели дифракции или эмпирически путем получения трехмерного изображения флуоресцентного шарика. [9-11] PSF были рассчитаны теоретически плагином Diffraction PSF 3D [12] для Fiji ImageJ [13]

Развёртка была произведена плагином DeconvolutionLab2 [15] для Fiji ImageJ [13] методом Ричардсона-Люси. Число итераций было выбрано равным семи так как достигалось оптимальное значение между увеличением резкости структур вдоль оси z и появлением артефактов в нижних слоях.

После чего были произведены измерения в Fiji ImageJ [13]. Размеры покоящихся эритроцитов были измерены по изображениям эритроцитов, прилипших к стенкам толстых сосудов в файле z-stack (Рисунок). Размеры же движущихся в потоке крови эритроцитов были получены из файла двумерного скана. Так же скорости эритроцитов в обоих файлах были измерены frame и in-frame методом RVDM [14] который позволяет измерять скорость потока практически всех сосудов в большом поле зрения из одного кадра видео. Суть метода заключается в анализе полученных в результате медленного сканирования (1-0.2 fps) изображений кровяных телец которые в зависимости от направления и скорости их движения относительно линии сканирования либо растягиваются либо сокращаются.

В третьей главе приведены результаты измерений размеров эритроцитов и скоростей кровотока в микроциркуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании был произведён обзор методов измерения скоростей эритроцитов конфокальным микроскопом. Также было проведено исследование возможностей улучшения качества изображения таких систем и опробованы два метода измерения скоростей для широкого поля при высоких и низких скоростях сканирования. Оба метода показали свою эффективность и хорошую точность для количественной оценки скорости микроциркуляции. При выполнении работы были получены навыки работы с пакетами обработки научных изображений.

Быстрое двумерное сканирование позволяет относительно легко рассчитывать скорость эритроцитов и имеет большой потенциал для автоматизации (например использования *micro PIV* для измерений). Однако плохо показало себя в применении к большому полю зрения из-за сложности фокусировки на большом количестве сосудов. Также большим минусом является отсутствие информации об ориентации сосудов относительно оси *z*. Тем не менее метод также обладает большим потенциалом для измерений профиля кровотока в крупных сосудах.

Измерения же в *z*-стаке обладают огромным преимуществом, позволяя количественно оценить абсолютные значения скоростей в пространстве. Однако при записи *z*-стака наличие больших сосудов в поле зрения сильно засвечивает все изображения вдоль оси *z* из-за существенно худшего разрешения таких систем вдоль неё. Также недостатком является сложность автоматизации таких измерений.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Daly S. M., Leahy M. J. 'Go with the flow': a review of methods and advancements in blood flow imaging //Journal of biophotonics. – 2013. – Т. 6. – №. 3. – С. 217-255.
2. Corliss B. A. et al. Methods to label, image, and analyze the complex structural architectures of microvascular networks //Microcirculation. – 2019. – Т. 26. – №. 5. – С. e12520.
3. Le A. V. Blood Microflow Characterization Using Micro-Particle Image Velocimetry and 2-Beam Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy : дис. – Université d'Ottawa/University of Ottawa, 2020.
4. Baskurt O. K. et al. Blood rheology and hemodynamics //Seminars in thrombosis and hemostasis. – New York: Stratton Intercontinental Medical Book Corporation, с1974-, 2003. – Т. 29. – №. 5. – С. 435-450.
5. Hemorheology// Википедия. [2021]. Дата обновления: 04.04.2021. URL: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Hemorheology&oldid=1015955602> (дата обращения: 31.05.2021).
6. Reneman R. S., Arts T., Hoeks A. P. G. Wall shear stress—an important determinant of endothelial cell function and structure—in the arterial system in vivo //Journal of vascular research. – 2006. – Т. 43. – №. 3. – С. 251-269.
7. Lipowsky H. H. Microvascular rheology and hemodynamics //Microcirculation. – 2005. – Т. 12. – №. 1. – С. 5-15.
8. Quantitative blood flow estimation in vivo by optical speckle image velocimetry
9. Bankhead P. Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ //ImageJ. – 2014. – Т. 1. – №. 195. – С. 10.1109.
10. Wallace W., Schaefer L. H., Swedlow J. R. A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy //Biotechniques. – 2001. – Т. 31. – №. 5. – С. 1076-1097.
11. Dougherty B. // Diffraction PSF 3D // OptiNav, Inc. 2005. URL: <https://www.optinav.info/Diffraction-PSF-3D.htm> (дата обращения: 12.06.2021).
12. Bonda U. et al. 3D Quantification of Vascular-Like Structures in z Stack Confocal Images //STAR protocols. – 2020. – Т. 1. – №. 3. – С. 100180.
13. Cole R. W., Jinadasa T., Brown C. M. Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control //Nature protocols. – 2011. – Т. 6. – №. 12. – С. 1929-1941.
14. Honkura N. et al. Intravital imaging-based analysis tools for vessel identification and assessment of concurrent dynamic vascular events //Nature communications. – 2018. – Т. 9. – №. 1. – С. 1-10.

15. Sage D. et al. DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy //Methods. – 2017. – T. 115. – C. 28-41.