

13. Hammond H.A., Jin L., Zhong Y. et al.// *Am. J. Hum. Genet.* - 1994. - No. 55. - P. 175-189.

14. Sajantila A., Makkonen K., Ehnholm C., Peltonen L.// *Human Heredity.* - 1992. - No. 42. - P. 175-189.

*Поступила в редакцию 09.06.03.*

#### NEW PROCEDURAL APPROACHES TO FORENSIC MEDICAL EXAMINATION OF ABILITY TO FERTILIZATION

*O.A. Dmitrieva, T.M. Fedchenko, V.B. Kozhemyako*

*Vladivostok State Medical University, Primorsky Regional Forensic Medical Examination Bureau (Vladivostok)*

*Summary* — Allowing for current state of biological and medical science, the forensic medical examination of male reproductive function should be subdivided into two groups: 1) examination of disputable paternity when there is a child (fetus) by using molecular-genetic methods; 2) other examinations without a child (fetus). In the latter case, when solving a question as to the sperm fertility, it is not enough to make the ejaculate examination by applying routine methods. So as to ensure objective appraisal of spermatogeneous function it is expedient to use the whole ensemble of the present-day methods, which allow for manifold physiological characteristics of the male reproductive system.

*Pacific Medical Journal, 2004, No. 2, p. 80-82.*

УДК57.087.1:681.3]:591.13].15

*А.А. Афанасьев, В.М. Черток*

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ СИСТЕМЫ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ ALLEGRO-МС ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ БИОМИКРОСКОПИИ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА

Владивостокский филиал ДВЮИ МВД России, Владивостокский государственный медицинский университет

*Ключевые слова: автоматизированный анализ, биомикроскопия, микроциркуляторное русло.*

Одним из наиболее эффективных методов изучения микроциркуляторного русла является биомикроскопия. Со времени проведения в 1865 г. Stricker [14] первого прижизненного исследования микрососудов ретролингвальной мембраны лягушки и до настоящего времени идет процесс совершенствования этого исключительно наглядного и информативного метода.

Существующие методы биомикроскопии микроциркуляторного русла условно можно подразделить на две группы:

- 1) *качественные, которые позволили не только описать ангиоархитектонику большинства органов у многих видов животных и человека, но и проследить поведение клеток крови внутри кровеносного русла, а также во время их выхода за его пределы;*
- 2) *количественные, которые дали возможность объективизировать материалы, полученные при изучении микроциркуляции, проследить изменения важнейших показателей, характеризующих движение крови в сосудах различного типа и в различных органах у животных и человека.*

Материалы исследований, полученные с использованием количественных методов, совершили подлинную революцию в биомикроскопии микроциркуляторного русла, сделали ее незаменимым помощником в клинических и экспериментальных исследованиях [3, 9].

Подавляющее большинство прижизненных исследований микроциркуляции с использованием количественных методов осуществлялось с применением кино- и телемикроскопии. Телевизионная микроскопия сделала возможным прижизненное проведение сканирующей микрофотометрии, поскольку любой горизонтальный отрезок электронного изображения мог быть подвергнут количественному анализу с помощью осциллографа [5, 6]. Крупные увеличения, получаемые на телевизионном экране, позволяют проводить некоторые измерения в процессе эксперимента, получать информацию о состоянии стенок сосудов, элементов крови и периваскулярной ткани. Однако в последнее десятилетие с развитием компьютерных технологий наметился прогресс и в количественной биомикроскопии. Отпала необходимость длительных, кропотливых и не всегда точных измерений объекта, трудоемких вычислений и прочих процедур, значительно удлиняющих и усложняющих процесс исследования. При использовании компьютерных технологий в морфометрии обычно выделяют два способа измерения: ручной (интерактивный) и автоматический. В первом случае пользователь с помощью компьютерной мыши обводит на мониторе интересующий объект, а программа с помощью пороговой обработки информации автоматически выделяет все заданные структуры, одновременно производя измерения и вычисления. Совсем недавно появился принципиально новый класс интеллектуальных приборов — автоматические системы анализа изображений (АСАИ). Такие приборы, выпущенные известными фирмами Цейсса, Лейтца, Райхерта, Оптона и др., совмещая современные высокоразрешающие оптические системы с мощной, высокоскоростной компьютерной техникой, обладают уникальными возможностями для количественного изучения динамики многих физиологических процессов [9, 11, 13]. С введением в практику научных исследований этих систем удалось зарегистрировать и изучить тончайшие механизмы различных биологических процессов. Однако высокая коммерческая стоимость приборов, сложные условия эксплуатации, необходимость приобретения дорогостоящих программ под каждую новую задачу и другие проблемы создают серьезные затруднения для их использования в повседневной практике.

Предложенная нами АСАИ Allegro-МС лишена многих названных недостатков и может решать широкий круг научно-практических задач [1, 8]. В настоящей работе рассмотрена возможность применения Allegro-МС для количественной биомикроскопии микроциркуляторного русла различных органов в норме и при экспериментальном воздействии. В качестве образцов использовали брыжейку тонкой кишки, мягкую мозговую оболочку, широкую связку матки и кожу крысы (рис. 1-3). Кроме того, изучали изменения микрососудов после облучения лазером (ЛГН-105, длина волны 633 нм, выходная мощность излучения 0,75 мВт, время экспозиции — от 1 до 30 мин.). В работе применялась стандартная методика подготовки животных для исследования [6].

Структурно-функциональная организация микроциркуляторного русла указанных органов подробно описана в литературе [2,4, 5, 15]. Однако количественные данные по таким основополагающим параметрам, как диаметр микрососудов или скорость кровотока в различных отрезках микроциркуляторного русла, встречаются в единичных сообщениях.

К примеру, микроциркуляторное русло брыжейки тонкой кишки изучено, пожалуй, лучше всего. Доступность для исследований и особенности организации — терминальное русло брыжейки расположено в одной плоскости — давно сделали его излюбленным объектом для анализа микроциркуляции. Но, несмотря на многочисленные описания ангиоархитектоники, характера ветвления сосудов, устройства анастомотических связей, количественных исследований по отдельным типам сосудов, составляющим микроциркуляторное русло и в конечном счете определяющим его функциональные особенности, очень мало. К тому же данные морфометрии в различных работах значительно отличаются друг от друга. Так, Chambers и Zweifach [10], после почти 15-летнего изучения прижиз-

ненной организации микроциркуляторного русла брыжейки, приводили значения диаметров, скорости кровотока и внутрисосудистого давления, которые на 15-20% отличались от аналогичных показателей Folkow [12]. А.М. Чернух продемонстрировал результаты измерений, которые во многом не совпадали с результатами указанных выше авторов [6]. Различия легко объяснимы, если учесть, что Chambers и Zweifach проводили измерения с помощью кино- и фотосъемки, Folkow — теле- и видеосъемки, а А.М. Чернух пользовался созданным в его лаборатории телевизионным микроскопом-микрофотометром, специально предназначенным для прижизненной морфометрии микроциркуляторного русла и клеток крови [6].

Данные наших измерений в микрососудах брыжейки, полученные с помощью автоматической системы анализа изображений Allegro-МС, представлены в табл. 1. Приведенные значения во многом соответствуют показателям, опубликованным в работах А.М.Чернуха и др. [6]. Иначе говоря, АСАИ Allegro-МС, обладая высокой точностью измерений, способна осуществлять их в автоматическом режиме: т.е. в соответствии с алгоритмом программа самостоятельно находит, измеряет, вычисляет средние величины и прочие параметры заданных объектов, необходимые для изучения отдельных компонентов микроциркуляторного русла. Нелишне отметить, что все операции здесь выполняются несравненно быстрее, чем при «ручных» методах морфометрии.

Используя возможности АСАИ Allegro-МС, мы провели сравнительную характеристику количественных показателей, полученных при биомикроскопии микроциркуляторного русла некоторых органов крысы (табл. 2). Проведенные исследования позволяют сделать два важных вывода.

1. При существующих органных отличиях скорость кровотока в артериальном звене микроцирку-

ляторного русла при сокращении диаметра сосудов уменьшается, а в венозном возрастает.

2. Сосуды одного типа в исследованных органах имеют примерно одинаковый диаметр ( $p > 0,05$ ), при выраженных в большинстве случаев отличиях в скорости кровотока.

Для изучения возможности применения Allegro-МС в эксперименте изучено микроциркуляторное русло после воздействия гелионеонового лазера. Луч проецировали на микрососуды через оптическую систему контактного микроскопа таким образом, что в фокальной плоскости микроскопа диаметр лазерного луча составлял 10-20 мкм (рис. 3,б). Это позволяло

Показатели количественной биометрии микрососудов брыжейки

Тип сосуда	Показатель	Измерение при помощи	
		Allegro-МС	теле-микроскопа*
Артериола	Диаметр, мкм	42,2±4,3	40-60
	Скорость кровотока, мм/с	25,8±1,8	20-26
Метартериола	Диаметр, мкм	16,1±3,6	15-25
	Скорость кровотока, мм/с	11,2±0,8	9-12
Прекапилляр	Диаметр (мкм)	10,1±3,6	10-15
	Скорость кровотока, мм/с	1,5±0,3	1-3
Капилляр	Диаметр, мкм	6,7±0,5	5-8
	Скорость кровотока, мм/с	0,3±0,1	300-600**
Посткапиллярная вена	Диаметр (мкм)	24,8±4,9	15-20
	Скорость кровотока, мм/с	6,2±2,1	5-7
Венула	Диаметр, мкм	64,9±6,8	50-70
	Скорость кровотока, мм/с	7,4±1,5	6-9

\* По А.М. Чернуху и др. [6].

\*\* Эритроцитов в мин.

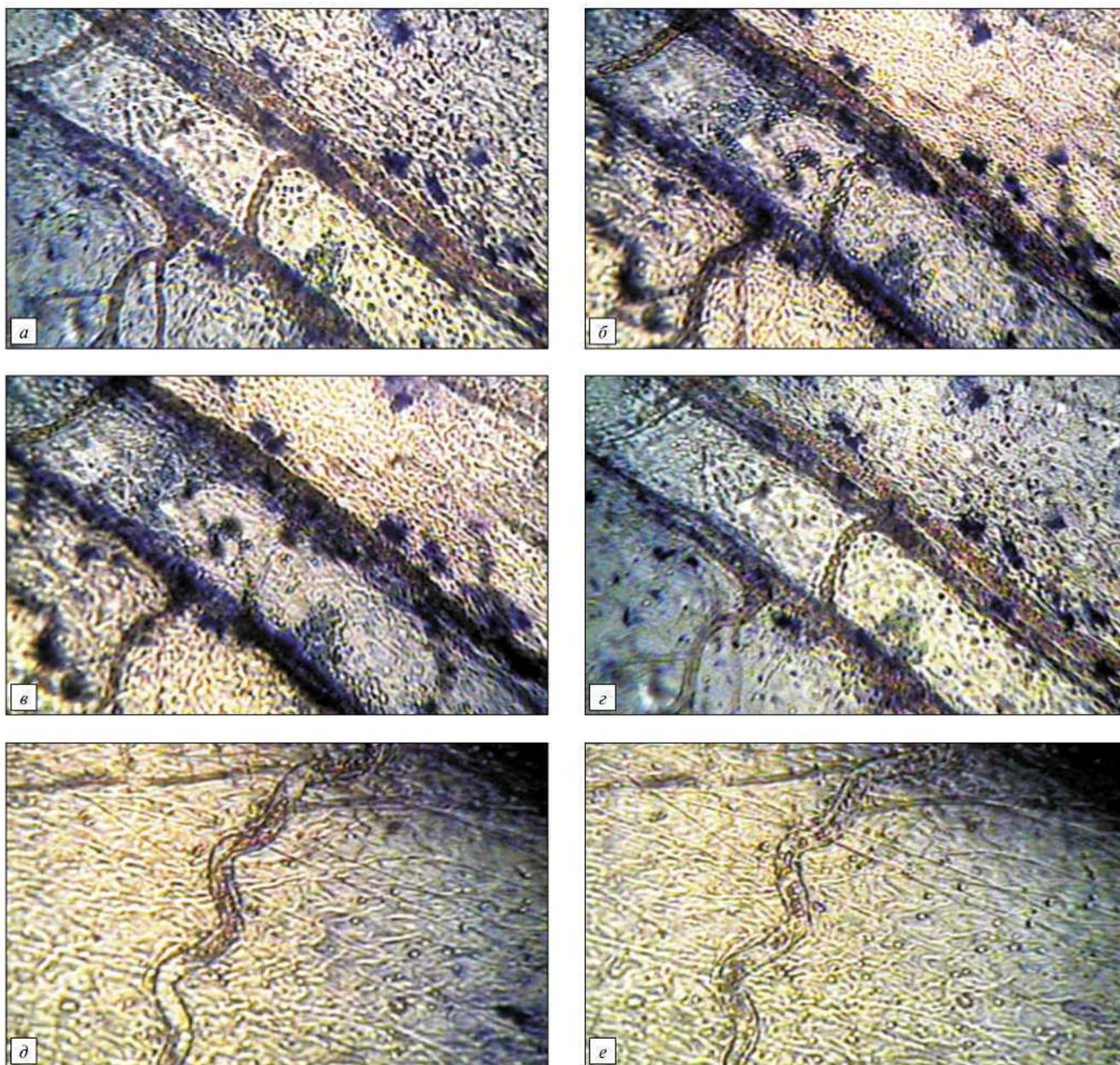


Рис. 1. Микроциркуляторное русло брыжейки тонкой кишки после лазерного облучения. а - контроль (норма), б - на 1-й минуте облучения, в - на 3-й минуте облучения, г - на 15-й минуте облучения, д - на 18-й минуте облучения, е - на 20-й минуте облучения. Биомикроскопия с подкраской 1% р-ром метиленового синего,  $\times 200$ .

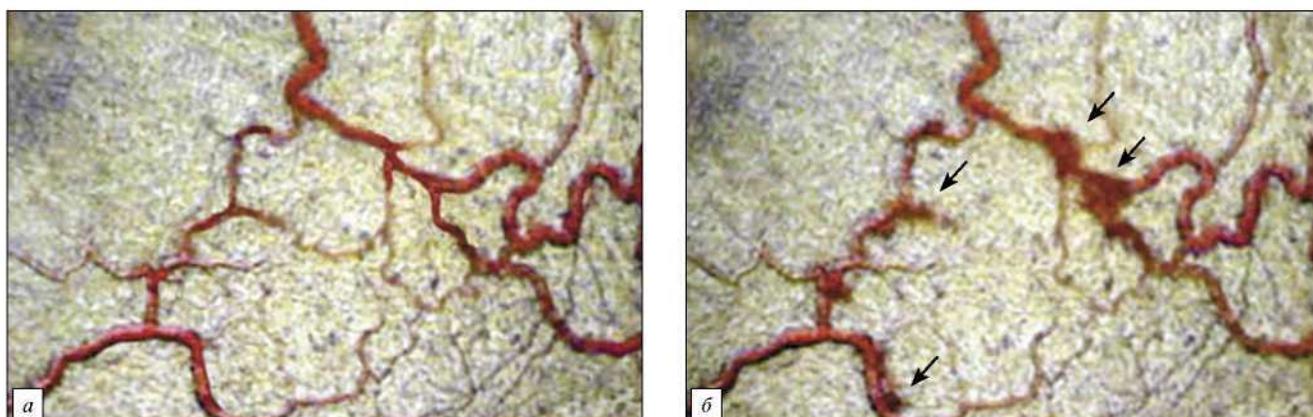


Рис. 2. Микроциркуляторное русло мягкой мозговой оболочки в норме (а) и на 20-й минуте лазерного облучения. Биомикроскопия с подкраской 1% р-ром метиленового синего,  $\times 200$ . Стрелки — участки кровоизлияний.

Таблица 2

Сравнительная характеристика показателей количественной биометрии микрососудов

Тип сосуда	Показатель	Брыжейка тонкой кишки	Мягкая мозговая оболочка	Кожа брюшной области	Широкая связка матки
Артериола	Диаметр, мкм	42,2±4,3	—	43,1±4,8	44,3±3,9
	Скорость кровотока, мм/с	25,8±1,2	—	24,9±1,3	26,2±1,5
Метартериола	Диаметр, мкм	16,1±3,6	16,7±2,8	16,9±3,2	17,3 —
	Скорость кровотока, мм/с	11,2±0,8	10,2±0,1	11,5±0,3	11,8±0,4
Прекапилляр	Диаметр, мкм	10,1±3,6	9,4±3,5	10,4±4,1	10,7±3,4
	Скорость кровотока, мм/с	1,5±0,3	1,6±0,3	—	1,5±0,5
Капилляр	Диаметр, мкм	6,7±0,5	6,2±0,6	—	6,5±0,9
	Скорость кровотока, мм/с	0,3±0,1	0,4±0,05	—	0,5±0,03
Посткапиллярная вена	Диаметр, мкм	24,8±4,9	23,3±4,7	—	24,4±3,9
	Скорость кровотока, мм/с	6,2±2,1	5,5±1,4	—	4,7±1,4
Венула	Диаметр, мкм	64,9±6,8	63,6±5,6	64,5± 6,2	65,3±5,8
	Скорость кровотока, мм/с	7,4±1,5	7,3±1,2	7,3±1,4	7,3±1,4

избирательно воздействовать на отдельные компоненты русла: артериолы, прекапилляры, капилляры, венулы. Оценку реактивности производили по изменению диаметра микрососудов и скорости кровотока.

Проведенные исследования показали, что уже на 1-й минуте наблюдалось стимулирующее влияние, выразившееся в увеличении диаметра микрососудов и скорости кровотока. В течение первых минут облучения наблюдалось постепенное расширение микрососудов, исчезала зернистость потока, включались дополнительные анастомозы, увеличивалась активность тканевых базофилов (рис. 1, б, в). Заслуживал внимания и тот факт, что сфокусированный луч лазера вызывал локальные изменения тонуса гладких миоцитов в стенке сосудов микроциркуляторного русла. При увеличении продолжительности облучения до 15-20 мин. формировались зоны локального расширения артериол протяженностью до 150 мкм (рис. 3, в, г).

Чувствительность разных отделов микроциркуляторного русла брыжейки к лазерному воздействию неодинакова (рис. 4). Величина дилатации артериол была прямо пропорциональна времени воздействия и находилась в обратной зависимости от исходного диаметра микрососудов. Наибольшей чувствительностью обладали самые мелкие прекапиллярные артериолы, которые являются конечным отрезком артериального звена микроциркуляторного русла. Они отличаются малым диаметром и относительно большой протяженностью. Известно, что местом приложения лазерного излучения являются гладкие миоциты, которые служат акцепторами лазерной энергии в системе микроциркуляции. Особенности строения сократительного аппарата в стенке прекапиллярных артериол, по-видимому, определяют неодинаковый уровень реактивности микрососудов разного типа [4, 9, 11].

Более длительная экспозиция лазерного облучения (15-30 мин.) приводила к стойкому расширению

микрососудов, но скорость кровотока вследствие повышения адгезии форменных элементов уменьшалась. Наблюдались стаз и тромбоз, прежде всего в венозных сосудах мелкого и среднего диаметра (рис. 1, д, е). Увеличение продолжительности облучения приводило к деформациям и нарушениям проницаемости стенки венул, провоцировавшим более или менее обширные кровоизлияния (рис. 2, б).

Локальный тромбоз вен вел к сопряженным изменениям гемодинамики в близлежащих отделах микроциркуляторного русла с дальнейшей его перестройкой, способствуя нарушению трофики окружающих тканей, их гипоксии. Важно отметить, что и реактивные изменения эндотелия более выражены в области посткапиллярно-венулярных сосудов, поэтому обтурационный механизм срабатывал преимущественно на путях оттока крови [7].

Таким образом, приведенные материалы по использованию АСАИ Allegro-МС для количественной биомикроскопии микроциркуляторного русла в обычных условиях и эксперименте показали ее широкие возможности. Высокая точность анализа

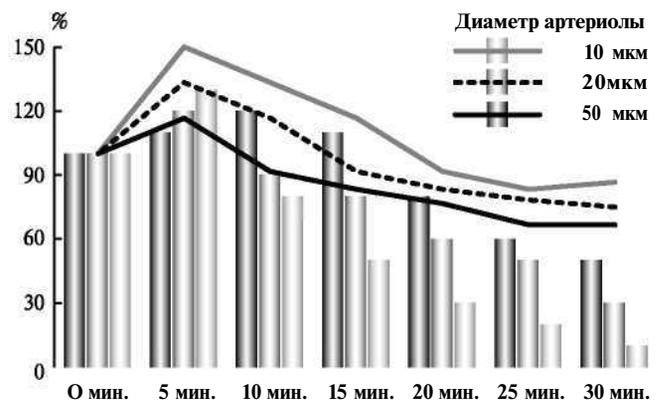


Рис. 4. Зависимость изменений диаметра (столбцы) и скорости кровотока (линии) в артериолах брыжейки от времени лазерного облучения.

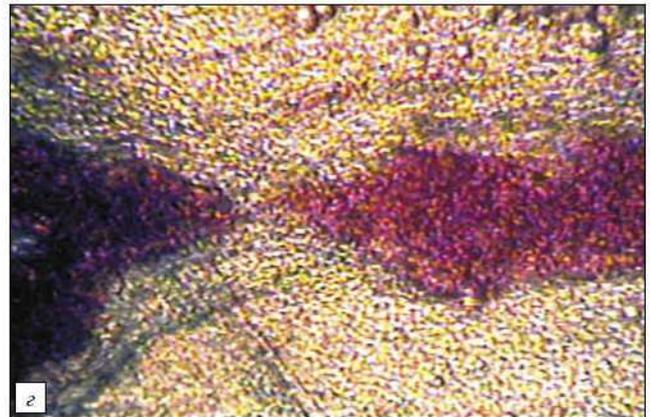
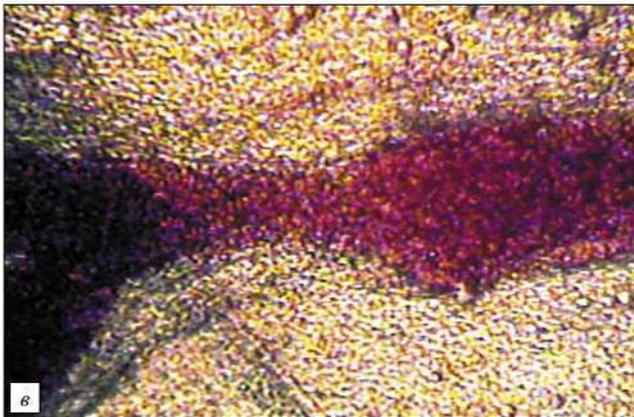
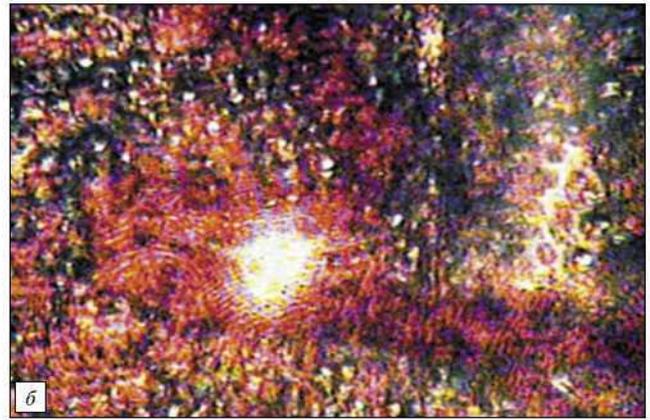
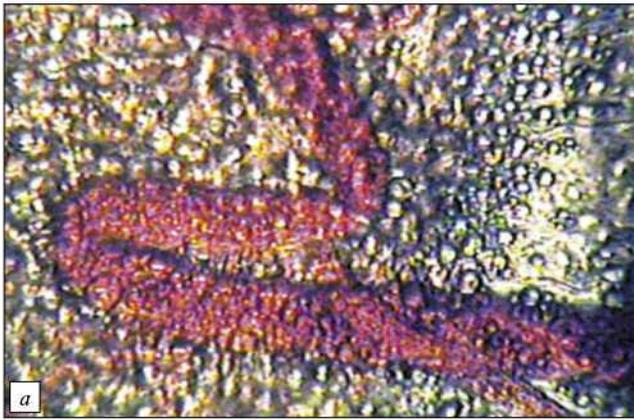


Рис. 3. Микроциркуляторное русло широкой связки матки после лазерного облучения.

а - контроль (норма), б - луч лазера, сфокусированный через оптическую систему микроскопа на артериолу, в, г- локальное расширение сосуда на 15-й и 20-й минутах облучения. Биомикроскопия, х 400.

изображений, несложный механизм управления, неприхотливость, многофункциональность позволяют рекомендовать Allegro-МС для изучения микроциркуляции различных органов.

#### Литература

1. Афанасьев А.А., Коцюба А.Е., Черток В.М.// Тихоокеанский медицинский журнал. — 2002. — №3. — С. 65-68.
2. Каган И.И.//Морфология. - 2000. -№5.- С. 75- 77.
3. Каган И.И., Чemezov С.В.// Морфология. — 2003. — №5. - С. 52.
4. Морфологические основы низкоинтенсивной лазеротерапии/ И.М. Байбеков, А.Х. Касымов, В.И. Козлов и др. — Ташкент: Издательство им. Ибн Сины, 1991.
5. Мchedlishvili Г.И. Микроциркуляция крови: общие закономерности регулирования и нарушений. — Л.: Наука, 1989.
6. Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. Микроциркуляция. — М.: Медицина, 1984.
7. Черток В.М., Недобылская Ю.П., Немков Ю. К., Шакунов С.А.// Бюлл. эксперим. биол. — 1997. — №6.-С. 718-720.
8. Черток В.М., Афанасьев А.А., Коцюба А.Е.// Морфология. - 2003. -№4.- С. 88-93.
9. Bonaci E., Santacrose N., D'Amico N.// Gerontol.

Geriat. - 1996. - Vol. 23. - P. 79-83.

10. Chambers R., Zweifach B. W. Ann. N. Y.//Acad. ScL. - 1946. - Vol. 416. - P. 683-695.
11. Feng Bin Wang and Powley T.L.//J. Comp. Neurol. — 2000. - Vol. 421. - P. 302-324.
12. Folkow B., Hallbeck M., Landgren G.//Acta Physiol. Scand. - 1970. - Vol. 79. - P. 373-378.
13. Lipton P.//Physiol.Rev. -1999. - Vol. 70. -P. 1431-1567.
14. Stricker S.//Akad. Wiss., Mathem., naturwiss., kl. — 1865. - Bd 51. - S. 16.
15. Zoccoli G., Lucchi M.L.// Exp. Brain Res. - 2000. - Vol. 130.-P. 73-77.

Поступила в редакцию 18.06.04.

#### APPLICATION OF AUTOMATED SYSTEM OF IMAGE ANALYSIS ALLEGROMC FOR QUANTITATIVE BIOMICROSCOPY OF MICROCIRCULATORY CHANNEL

A.A. Afanasiev, V.M. Chertok

Vladivostok Branch of the DVYuIofthe Ministry of Internal Affairs of Russia, Vladivostok State Medical University

Summary — The paper is devoted to the work on automated computer-based system of image analysis named AllegroMC created by the authors. Based on the biomicroscopy and morphometry of the microcirculatory channel, the authors have shown the high precision and functionality of the system, which differs from the foreign analogues in far smaller cost. As a result, AllegroMC is very promising for most of works in the field of life-time analysis of the microcirculatory channel state.

Pacific Medical Journal, 2004, No. 2, p. 82-86.