

УДК 616-092

## Вейвлет-анализ мозгового кровотока у крыс в терминальном состоянии

Александрин В.В., Иванов А.В., Кубатиев А.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

В последнее десятилетие внимание клиницистов привлекает проблема церебральной гипоперфузии – диапазона ишемического мозгового кровотока от нижней границы ауторегуляции до порога некроза. Поиски методов исследования регуляции кровотока при гипоперфузии остаются актуальным научным направлением.

**Цель исследования.** Изучить посредством лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) состояние регуляторных влияний на микрососуды мозга в условиях тяжелой ишемии.

**Материалы и методы.** Эксперименты проведены на 10 контрольных и 10 опытных крысах под наркозом (хлоралгидрат, 400 мг/кг, в/б). Регистрацию мозгового кровотока (МК) проводили в неокортексе посредством ЛДФ. С помощью вейвлет-анализа ЛДФ-грамм анализировали регуляторные влияния со стороны эндотелия, нервной системы, миоцитов, дыхательных экскурсий и пульса.

**Результаты.** В контроле при среднем артериальном давлении (АД) 84 [83; 86] мм рт.ст. МК составлял 27 [22, 32] п.е. В опытной группе после снижения системного АД до 30 [28; 31] мм рт.ст. (МК) составлял 6 (4, 7) п.е, что соответствует тяжелой ишемии. Абсолютные показатели колебаний кровотока при этом значительно снижались: в миогенном (в 2 раза), дыхательном (2,7 раза) и пульсовом (1,4 раза) диапазонах спектра. В то же время относительный вклад эндотелиального и нейрогенного диапазонов увеличился в 2,4 раза и 1,9 раза соответственно, что отражает процесс снижения тонуса церебральных сосудов в условиях централизации кровообращения.

**Заключение.** Вейвлет-анализ мозгового кровотока позволяет выявить тонкие особенности его регуляции со стороны механизмов, формирующих сосудистый тонус.

**Ключевые слова:** гипоперфузия головного мозга; лазерная доплеровская флоуметрия; вейвлет-анализ; терминальные состояния.

**Для цитирования:** Александрин В.В., Иванов А.В., Кубатиев А.А. Вейвлет-анализ мозгового кровотока у крыс в терминальном состоянии. Патогенез. 2022; 20(1): 69-73

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2022.01.69-73

**Для корреспонденции:** Александрин Валерий Васильевич, e-mail: alexsandrין-54@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 08.04.2022

## Wavelet analysis of cerebral blood flow in terminal rats

Aleksandrין V.V., Ivanov A.V., Kubatiev A.A.

Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

In the last decade, the attention of clinicians has focused on cerebral hypoperfusion, the range of ischemic cerebral blood flow from the lower border of autoregulation to the threshold of necrosis. The search for methods of studying the regulation of blood flow in hypoperfusion remains highly relevant.

**Aim.** To study regulatory influences on cerebral microvessels in the conditions of severe ischemia by laser Doppler flowmetry (LDF).

**Materials and methods.** The experiments were performed on 10 control and 10 experimental rats under anesthesia (chloral hydrate, 400 mg/kg, i/b). Cerebral blood flow (CBF) was recorded in the neocortex by LDF. Regulatory influences from the endothelium, nervous system, myocytes, respiratory excursions and pulse were studied by the wavelet analysis of LDF-grams.

**Results.** In the control with an average blood pressure (BP) of 84 [83; 86] mm Hg, the CBF was 27 [22, 32] p. u. In the experimental group, after a decrease in systemic BP to 30 [28; 31] mm Hg, the CBF was 6 [4, 7] p. u., which corresponded to severe ischemia. Absolute values of blood flow fluctuations significantly decreased in the myogenic (50%), respiratory (63%) and pulse (28.6%) ranges. Furthermore, the relative contributions of the endothelial and neurogenic ranges increased by 140% and 90%, respectively, which reflects the process of reducing the tone of cerebral vessels in the conditions of centralization of blood circulation.

**Conclusion.** The wavelet analysis of CBF reveals subtle features of its regulation by the mechanisms that form vascular tone.

**Keywords:** brain hypoperfusion; laser Doppler flowmetry; wavelet analysis; terminal states.

**For citation:** Aleksandrין V.V., Ivanov A.V., Kubatiev A.A. [Wavelet analysis of cerebral blood flow in terminal rats]. Patogenez [Pathogenesis]. 2022; 20(1): 69-73

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2022.01.69-73

**For correspondence:** Aleksandrין Valery Vasilievich; e-mail: alexsandrין-54@mail.ru.

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

**Received:** 08.04.2022

## Введение

Микроциркуляторное звено кровеносной системы является ключевым в регуляции адекватного кровотока к работающим клеткам организма. Удобным объектом для изучения микроциркуляции является сосудистая система мозга крыс, поскольку вся она относится к микродиапазону. В настоящее время популярным методом для исследования микроциркуляции тканей является лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ). Этот метод регистрирует не только уровень кровотока, но и его осцилляции (ЛДФ-грамму), вейвлет-анализ которых позволяет судить о регуляторных влияниях на тонус артериол со стороны эндотелия, нервной системы и миоцитов [1, 2]. В последнее десятилетие внимание клиницистов привлекает проблема гипоперфузии мозгового кровотока [3]. Гипоперфузия — это диапазон ишемического мозгового кровотока от нижней границы ауторегуляции до порога некроза. Возникающие при этом функциональные нарушения могут приводить к включению механизмов отсроченной гибели нейронов. Причины возникновения гипоперфузии разнообразны и могут быть обусловлены как прямым поражением церебральных артерий, так и нарушением механизмов ауторегуляции МК, в условиях нестабильности системного артериального давления (АД), в том числе во время оперативных вмешательств, проводимых в условиях искусственного кровообращения или гемодиализе [3]. Поэтому весьма актуальным представляется изучение динамики кровотока в условиях терминального снижения АД с учетом того, что это состояние является неустойчивым и может длиться не более 20 мин, после чего наступает агональная фаза с апноэ и летальным исходом [4].

**Цель исследования:** с помощью вейвлет-анализа изучить состояние регуляторных влияний на микрососуды мозга при церебральной гипоперфузии.

## Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на белых половозрелых беспородных крысах-самцах с массой тела 250–300 г. Животные содержались в условиях стандартного вивария со свободным доступом к воде и пище (брикетированный корм ГОСТ Р 51849-2001 (ООО «Лабораторкорм», Москва, РФ)). Световой день длился с 7 до 19 часов. Протокол экспериментов был составлен с соблюдением принципов гуманности (Guidance for the Care and Use of Laboratory Animals; NIH Publication №85–23, 1996) и одобрен этическим комитетом ФГБНУ «НИИОПП». В конце эксперимента животных усыпляли передозировкой наркоза.

Животные в случайном порядке были поделены на две серии: первая серия ( $n = 10$ ) — контроль, вторая серия ( $n = 10$ ) — кровопотеря. Протоколы экспериментов были следующими: 1-я серия — регистрация МК при нормальном АД, 2-я серия — массивная кровопотеря, регистрация МК.

Крыс наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг, в/б). Достаточный уровень анестезии определяли по от-

сутствию реакции вибрисс на болевой стимул. Ректальная температура животного поддерживалась на уровне  $36,7^{\circ}\text{C}$  утепляющими матами и лампой. Бедренную артерию катетеризировали (гепарин в дозе 500 Ед/кг) для кровопотери и измерения системного АД монитором MEC8 (Mindray, China). Голову животного прочно закрепляли в стереотаксической рамке. Череп обнажали посредством срединного надреза. Использовались следующие стереотаксические координаты: от брегмы и сагиттального шва — 5 мм и 3 мм соответственно. С помощью стоматологического бора в левой теменной кости делали отверстие диаметром 1 мм, куда микроманипулятором вводили датчик (диаметр 0,8 мм) до касания твердой мозговой оболочки.

Регистрацию локального мозгового кровотока осуществляли лазерным доплеровским монитором ЛАКК-02 (НПП «ЛАЗМА», Россия) в красном канале лазерного излучения (длина волны 0,63 мкм) в условиях температуры окружающей среды  $20\text{--}21^{\circ}\text{C}$  через 60 мин после окончания хирургических процедур. Величину кровотока и амплитудные показатели колебаний оценивали в перфузионных единицах (п.е).

Для спектрального вейвлет-анализа колебаний (программа 2.2.0.507, НПП «Лазма», Россия) использовали 480-секундные записи. Оценивали показатели спектра, отражающие как активные механизмы регуляции микроциркуляции: эндотелиальный (Аэ) — 0,01–0,04 Гц, нейрогенный (Ан) — 0,04–0,15 Гц, миогенный (Ам) — 0,15–0,4 Гц; так и пассивные: дыхательные экскурсии (Ад) — 0,4–2,0 Гц и сердечный (пульсовая волна) (Ас) — 2,0–4,0 Гц [1, 2]. Общую мощность спектра определяли как сумму квадратов показателей амплитуд ритмических составляющих:  $M = A_{\text{э}}^2 + A_{\text{н}}^2 + A_{\text{м}}^2 + A_{\text{д}}^2 + A_{\text{с}}^2$ , а относительный вклад отдельных ритмических составляющих рассчитывали по формуле:  $A\% = A^2/M \times 100\%$  [5].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Excel (Microsoft Office 2016). Для оценки различий показателей использовали U-критерий Манна – Уитни для независимых групп. Полученные данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала – 25-й процентиль и 75-й процентиль (Me [Q1; Q3]). Различия считали статистически значимыми при двустороннем уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

## Результаты исследования и обсуждение

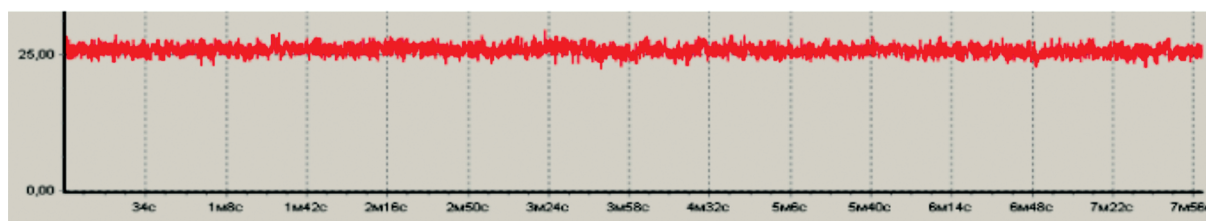
Результаты исследования представлены в табл. 1.

В контроле при среднем АД 84 [83; 86] мм рт.ст МК составлял 27 [22, 32] п.е, что согласуется с величинами кровотока, полученными нами ранее [2, 6]. Во 2-й группе после снижения системного АД до 30 [28; 31] мм рт.ст МК составлял 6 [4, 7] п.е, то есть 22% от контроля. Абсолютные показатели колебаний кровотока при этом достоверно снижались в миогенном (в 2 раза), дыхательном (2,7 раза) и кардиогенном (1,4 раза) диапазонах, а в эндотелиальном и нейрогенном не изменялись (рис. 1, 2; табл. 1).

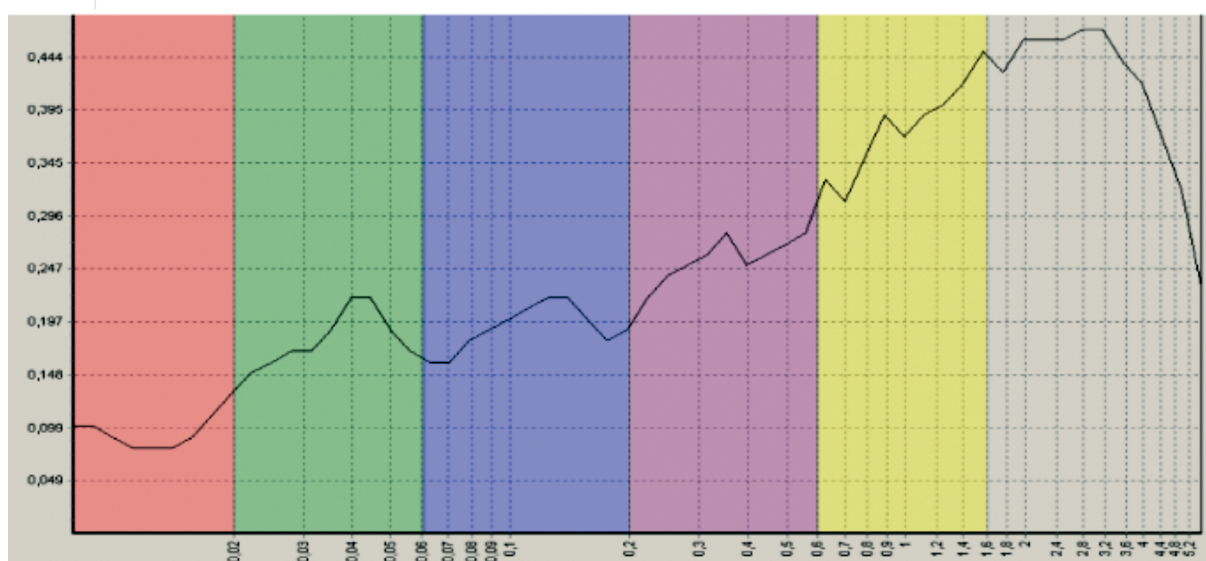
Как было сказано выше, анализ по абсолютным показателям может составить представление о том, что в регуляции МК со стороны двух активных факторов

регуляции – эндотелиального и нейрогенного – ничего не изменилось. Однако пересчет относительного вклада показывает, что это не так. В условиях гипоперфузии

### Мозговой кровоток



### Амплитудно-частотный спектр колебаний



**Рис. 1.** Фрагмент ЛДФ-граммы мозгового кровотока (вверху) и ее вейвлет-спектр (внизу) в неокортексе крысы в контроле. По оси абсцисс: время минуты, с (для ЛДФ-граммы); частота, Гц (для вейвлет-спектра). По оси ординат: амплитуда осцилляций кровотока, перфузионные единицы (п.е.). Наблюдается преобладание дыхательных и пульсовых осцилляций в общей мощности спектра.

Таблица 1

**Параметры ЛДФ-граммы неокортекса крыс в контроле и на фоне гипоперфузии (данные представлены в виде медианы и интерквартильного интервала)**

Показатель	1-я серия контроль <i>n</i> = 10	2-я серия гипоперфузия <i>n</i> = 10	<i>p</i>
Общий мозговой кровоток, п.е.	27 [22, 32]	6 [4, 7]	< 0,01
Эндотелиальный компонент (Аэ), п.е.	0,21 [0,20; 0,22]	0,28 [0,15; 0,35]	> 0,05
Нейрогенный компонент (Ан), п.е.	0,21 [0,19; 0,22]	0,23 [0,17; 0,27]	> 0,05
Миогенный компонент (Ам), п.е.	0,22 [0,12; 0,26]	0,11 [0,09; 0,13]	< 0,05
Дыхательные экскурсии (Ад), п.е.	0,43 [0,38; 0,48]	0,19 [0,18; 0,22]	< 0,01
Пульсовая волна (Ас), п.е.	0,47 [0,41; 0,74]	0,33 [0,21; 0,47]	< 0,05
Аэ <sup>2</sup> /М, %	8 [3; 9]	19 [15; 22]	< 0,01
Ан <sup>2</sup> /М, %	8 [4; 9]	15 [10; 18]	< 0,01
Ам <sup>2</sup> /М, %	9 [7; 13]	4 [3; 6]	< 0,01
Ад <sup>2</sup> /М, %	33 [24; 38]	12 [8; 32]	< 0,05
Ас <sup>2</sup> /М, %	42 [30; 59]	50 [36; 51]	> 0,05



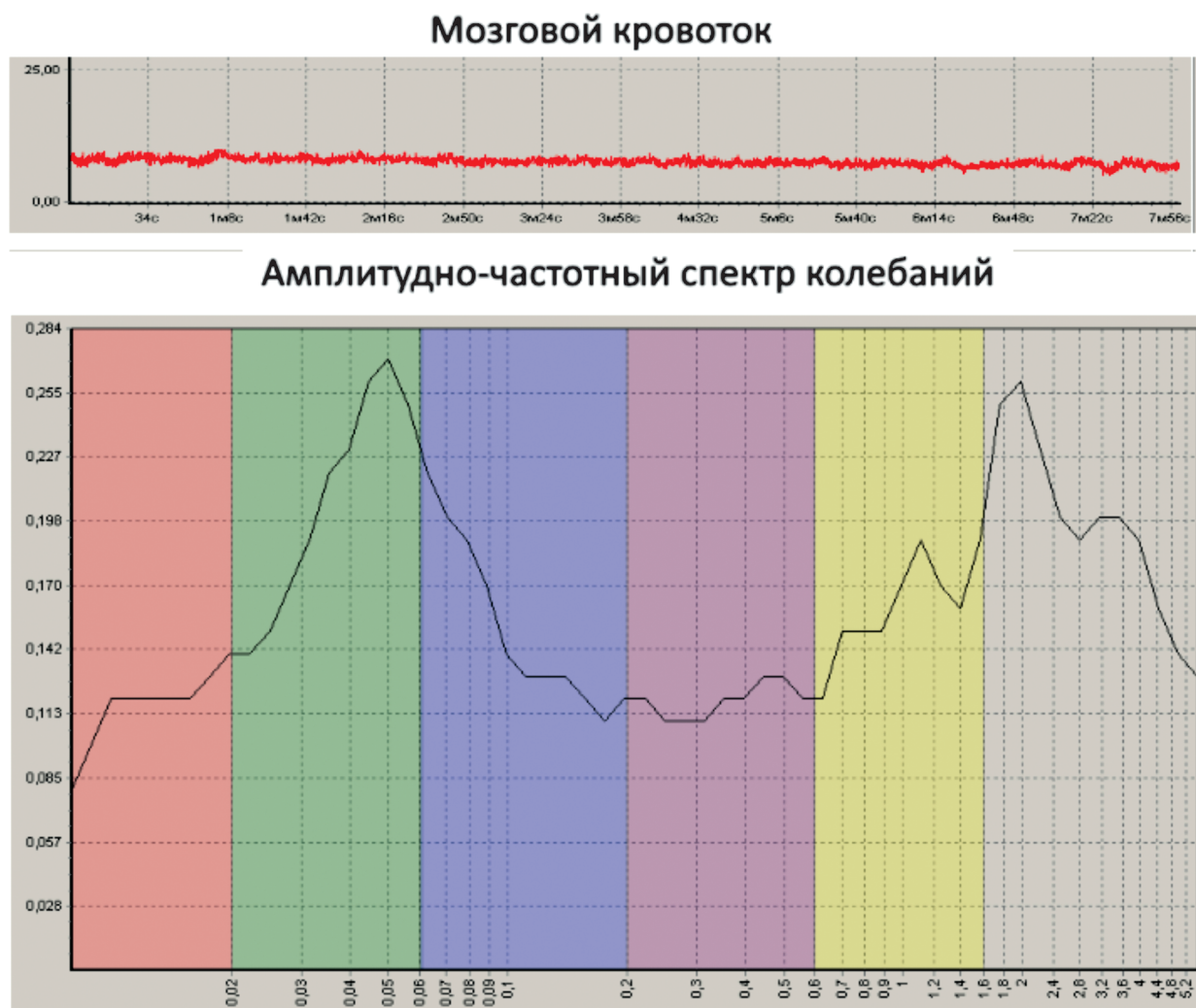
относительный вклад эндотелиального и нейрогенного диапазонов увеличился в 2,4 раза и 1,9 раза соответственно, а миогенного – снизился в 2,3 раза.

Метод ЛДФ измеряет абсолютный кровоток в перфузионных единицах, а не в мл/г/мин. В то же время, многочисленными исследованиями была показана прямая корреляция между показателями кровотока, полученными методом клиренса водорода (мл/г/мин) и доплеровским сигналом [7]. Поэтому МК в условиях гипоперфузии (22% от нормы) мы трактуем как уровень ишемической полутени [6], то есть порядка 0,2/мл/г/мин.

В условиях гипотензии срабатывает механизм централизации кровообращения, суть которого заключается в констрикции сосудов периферических органов и дилатации артериол жизненно важных – сердца и мозга. Увеличение амплитуды эндотелиального диапазона отражает положительную динамику сосудорасширяющих

влияний, за счет периодического выброса порций оксида азота из депо [2]. Повышение амплитуды нейрогенного диапазона, наоборот, связано со снижением констрикторных адренергических влияний [2]. Регистрируемое нами сохранение абсолютных и увеличение вклада относительных амплитуд указанных диапазонов отражают процесс снижения тонуса церебральных сосудов в условиях перераспределения крови к мозгу.

Но возникает вопрос, почему снижается амплитуда миогенного звена? В наших предыдущих исследованиях было показано, что по мере понижения системного АД посредством кровопотери величина миогенных колебаний не меняется в пределах ауторегуляции МК и начинает снижаться за пределами ее нижней границы [1, 2]. Какова может быть связь миогенных влияний с величиной кровотока? Ранее нами было выказано предположение, что поскольку миогенная реакция направлена на поддержание постоянства натяжения сосудистой стенки артери-



**Рис. 2.** Фрагмент ЛДФ-граммы мозгового кровотока (вверху) и ее вейвлет-спектр (внизу) в некортексе крысы на фоне гипоперфузии после кровопотери. По оси абсцисс: время – мин, с (для ЛДФ-граммы); частота – Гц (для вейвлет-спектра). По оси ординат: амплитуда осцилляций кровотока, перфузионные единицы (п.е). Наблюдается снижение амплитуды дыхательных и пульсовых осцилляций и их выравнивание с нейрогенными.

ол, то сам диапазон как-то связан с этой регуляцией [1]. Исследования, выполненные профессором Крупаткиным на ногтевом ложе человека, продемонстрировали, что миогенное звено высоко коррелирует с количеством работающих капилляров, что автор объяснял функцией прекапиллярных сфинктеров [8]. В отличие от ногтевого ложа в капиллярах мозга прекапиллярных сфинктеров не обнаружено, однако там обильно представлены перициты. Перициты покрывают стенки капилляров снаружи и экспрессируют альфа-гладкомышечный актин, который характерен для миоцитов и поэтому они могут играть роль своеобразных сфинктеров [9], сокращение которые приводит к блокированию проходимости капилляра для эритроцитов. Таким образом, снижение амплитуды миогенных колебаний в наших исследованиях может свидетельствовать как об уменьшении количества работающих капилляров за счет сокращения перицитов, что согласуется и со снижением самого кровотока, так и с повышением тонуса артериол по механизму восходящей констрикции.

Сами по себе колебания кровотока можно трактовать как его микроауторегуляцию, когда при его повышении срабатывает механизм нейрогенного снижения, а при снижении — механизм эндотелий-зависимого повышения, вследствие чего кровотоки в среднем остаются постоянными.

### Заключение

Вейлет-анализ микроциркуляции является сравнительно молодым методом исследования патофизиологических механизмов. Поэтому стоит задача расширения параметров его использования. Методом вейлет-анализа ЛДФ-грамм в условиях гипоперфузии мозга выявлены особенности функционирования трех активных механизмов регуляции тонуса артериол: эндотелиального, нейрогенного и миогенного.

### Список литературы

1. Александрин В.В. Связь миогенной реакции с ауторегуляцией мозгового кровотока. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2010; 150(2): 168–171.
2. Aleksandrin V.V., Ivanov A.V., Virus E.D., Bulgakova P.O., Kubatiev A.A. Application of wavelet analysis to detect dysfunction in cerebral bloodflow autoregulation during experimental hyperhomocysteinaemia. *Laser Med. Sci.* 2018; 33(6): 1327–1333. DOI: 10.1007/s10103-018-2485-x
3. Wolfgram D.F. Intradialytic Cerebral Hypoperfusion as Mechanism for Cognitive Impairment in Patients on Hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2019; 30(11): 2052–2058. DOI: 10.1681/ASN.2019050461

### Сведения об авторах:

*Александрин Валерий Васильевич* — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0003-4625-6522>

*Иванов Александр Владимирович* — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-2424-6115>

*Кубатиев Аслан Амирханович* — доктор медицинских наук, академик РАН, научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

4. Шагохина С.Н., Александрин В.В., Шабалин В.Н. Оценка глубины наркоза у экспериментальных животных по показателям мозгового кровотока и структурам твердой фазы сыворотки крови (экспериментальное исследование). *Патогенез*. 2021; 19(3): 24–31. DOI: 10.25557/2310-0435.2021.03.24-31
5. Стрельцова Н.Н., Васильев А.П., Тодосийчук В.В. Микрогемодинамика кожи у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей с сахарным диабетом 2 типа. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2019; 18(2): 28–34. DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-2-28-34
6. Александрин В.В. Шкала порогов ишемии мозга у крыс. *Патогенез*. 2018; 16(4): 128–129. DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.128-129
7. Skarphedinsson J.O., Hårding H., Thorén P. Repeated measurements of cerebral blood flow in rats: comparison between the hydrogen clearance method and laser Doppler flowmetry. *Acta Physiol. Scand.* 1993; 134(1): 133–142. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1988.tb08469.x
8. Крупаткин А.И. Динамический колебательный контур регуляции капиллярной динамики. *Физиология человека*. 2007; 33(5): 93–101.
9. Andreone B.J., Lacoste B., Gu C. Neuronal and Vascular Interactions. *Annu. Rev. Neurosci.* 2015; 38: 25–46. DOI: 10.1146/annurev-neuro-071714-033835

### References

1. Aleksandrin V.V. [Relationship between Myogenic Reaction and Autoregulation of Cerebral Circulation]. *Byulleten' ehksperimental'noi biologii i mediciny [Bulletin of experimental biology and medicine]*. 2010; 150(2): 168–171. (in Russian)
2. Aleksandrin V.V., Ivanov A.V., Virus E.D., Bulgakova P.O., Kubatiev A.A. Application of wavelet analysis to detect dysfunction in cerebral bloodflow autoregulation during experimental hyperhomocysteinaemia. *Laser Med. Sci.* 2018; 33(6): 1327–1333. DOI: 10.1007/s10103-018-2485-x
3. Wolfgram D.F. Intradialytic Cerebral Hypoperfusion as Mechanism for Cognitive Impairment in Patients on Hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2019; 30(11): 2052–2058. DOI: 10.1681/ASN.2019050461
4. Shatokhina S.N., Aleksandrin V.V., Shabalin V.N. [Evaluation of the anesthesia depth in experimental animals by parameters of cerebral blood flow and structures of the blood serum solid phase (experimental study)]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2021; 19(3) 24–31. DOI: 10.25557/2310-0435.2021.03.24-31 (in Russian)
5. Streltsova N.N., Vasilev A.P., Todosiichuk V.V. [Skin microhemodynamics in patients with obliterating atherosclerosis of lower extremities arteries and diabetes mellitus type]. *Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya [Regional Blood Circulation and Microcirculation]*. 2019; 18(2): 28–34. DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-2-28-34 (in Russian)
6. Aleksandrin V.V. [The scale of cerebral ischemia thresholds in rats]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(4): 128–129. DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.128-129 (in Russian)
7. Skarphedinsson J.O., Hårding H., Thorén P. Repeated measurements of cerebral blood flow in rats: comparison between the hydrogen clearance method and laser Doppler flowmetry. *Acta Physiol. Scand.* 1993; 134(1): 133–142. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1988.tb08469.x
8. Krupatkin A.I. [Dynamic oscillatory circuit of capillary dynamics regulation]. *Fiziologiya cheloveka [Human Physiology]*. 2007; 33(5): 93–101. (in Russian)
9. Andreone B.J., Lacoste B., Gu C. Neuronal and Vascular Interactions. *Annu. Rev. Neurosci.* 2015; 38: 25–46. DOI: 10.1146/annurev-neuro-071714-033835