

ляции кровообращения. Основными преимуществами являются высокая точность регистрации нагрузки и одновременная регистрация изменения артериального давления, сердечного ритма и дыхания. Нагрузка позволяет вызвать характерную реакцию системы в отличие от пробы в стационарном состоянии, в то время как измерение основных параметров на каждом сердечном сокращении позволяет детально зафиксировать адаптацию системы к новым условиям, что невозможно получить при помощи других стресс-систем.

Несмотря на то что величины АД, измеренные методом Пеназа в пальце, могут отличаться от величин АД, измеренных методом Короткова в плече, было многократно доказано, что динамика изменения давления измеряется с высокой точностью и данное отличие носит только аддитивный характер. То обстоятельство, что по результатам нагрузочных проб рассчитываются показатели, отражающие относительный характер изменения АД, ЧСС и МОД, а не абсолютную величину, позволяет нивелировать аддитивную методическую погрешность.

Разработанная система позволяет получать новые детальные характеристики динамических процессов регуляции сердечно-сосудистой системы, а использование стандартного протокола во время обследования обеспечивает сопоставимые результаты. Система предназначена для проведения нагрузочных проб для медицинской диагностики при артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца и других патологиях, оценки эффективности терапии, реабилитации, прогноза развития сердечно-сосудистых заболеваний, научных исследований в медицине, физиологии и спорте.

#### Список литературы:

1. *Thanassoulis G., Lyass A., Benjamin E.J., Larson M.G., Vita J.A., Levy D., Hamburg N.M., Widlansky M.E., O'Donnell C.J., Mitchell G.F., Vasan R.S. Relations of Exercise Blood Pressure Response to Cardiovascular Risk Factors and Vascular Function in the Framingham Heart Study Circulation // 2012. June 12. 125 (23). PP. 2836-2843.*
2. *Пивоваров В.В. Спироартериокардиоритмограф // Медицинская техника. 2006. № 1. С. 38-42.*
3. *Пивоваров В.В. Измерительно-информационная система функциональной диагностики нервной регуляции кровообращения. Часть I. Разработка // Датчики и системы. 2008. № 10. С. 2-8.*
4. *Пивоваров В.В. Измерительно-информационная система функциональной диагностики нервной регуляции кровообращения. Часть II. Реализация // Датчики и системы. 2008. № 12. С. 2-5.*

*Владимир Вячеславович Пивоваров,  
д-р техн. наук, зам. директора,  
Глеб Константинович Зайцев,  
зав. производством,  
Вадим Викторович Сизов,  
инженер-разработчик,  
ООО «ИНТОКС-МЕД»,  
г. С.-Петербург,  
e-mail: vpivovarov@list.ru*

*М.А. Стенина, Л.И. Кривов, И.Н. Спиридонов, А.А. Таранов*

## **Дистанционное измерение частоты дыхания лабораторных мышей при исследованиях mdx-модели прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна**

### **Аннотация**

В статье представлено аппаратно-программное средство для измерения частоты дыхания у мышей. Основу разработки составил незначительно модифицированный исходный код проекта <https://github.com/pi-null-mezon/QPULSECAPTURE.git>. Средство измерения, построенное на базе x86 персонального компьютера и веб-камеры, позволяет проводить измерения с абсолютной погрешностью 18 вдохов/мин в диапазоне частот от 200 до 320 вдохов/мин. С помощью него проведено сравнительное исследование группы mdx-мышей с мутацией гена дистрофина и группы нормальных мышей без мутации. В результате было установлено, что частота дыхания в группе mdx-мышей статистически значимо выше.

### **Введение**

Прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна (далее – МДД) является одной из наиболее часто встречающихся наследственных патологий развития мышечной ткани. Частота МДД составляет не менее 1 из 3600 человек мужского пола в популяции [1]. Заболевание вызывается мутацией гена, кодирующего белок дистрофин; тип наследования – X-сцепленный рецессивный. Проявляется у детей уже в раннем возрасте прогрессирующей слабостью мышц нижних и верхних конечностей, с возрастом происходит постепенная дегенерация мышечных тканей, к 8-12 годам 95 % больных теряют способность ходить, в возрасте 18-22 лет больные, как правило, умирают от дыхательной недостаточности. В настоящее время все известные методы лечения МДД направлены лишь на временное ослабление симптомов [2]. Поэтому разработка и исследование новых методов лечения этого заболевания является актуальной задачей.

Большое значение для подобных исследований имеют лабораторные модели заболевания, среди которых наиболее известны так называемые mdx-мыши (mdx mice) [3], [4]. В процессе проведения экспериментальных исследований с ними часто требуется контроль частоты сердечных сокращений, частоты дыхания, газового состава крови и т. д. Работа с мыша-

ми предполагает необходимость использования специального измерительного оборудования, часто очень дорогого и сложного в обслуживании. Кроме этого, мыши оказывают естественное сопротивление проведению всех видов контактных измерений. Часто животных приходится обездвигивать (при помощи наркоза или механически), при этом испытываемый ими стресс может являться основным фактором изменения частоты сердечных сокращений, частоты дыхания и других параметров. Часто на фоне столь интенсивного «помехового» воздействия бывает сложно сделать заслуживающее доверия заключение о влиянии тех или иных направленных воздействий.

Указанные факторы делают задачу изучения mdx-модели прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна нетривиальной. Прежде всего для таких исследований требуются специальные средства измерений, минимизирующие стрессовые воздействия на животных. В настоящей статье мы хотим продемонстрировать один из возможных подходов к решению этой задачи на примере измерения частоты дыхания лабораторных мышей. Это тем более важно, что частота дыхания является одним из наиболее специфичных параметров, характеризующих степень поражения диафрагмы при развитии МДД [3]. Поэтому точные измерения частоты дыхания могут служить мощным инструментом контроля эффективности вновь разра-

батываемых методов лечения данного заболевания. Эксперимент, в ходе которого мы провели проверку своего подхода, ставил своей целью проверку различий между mdx-мышьями с мутацией гена дистрофина и нормальными мышьями без мутации.

### Материалы и методы

В качестве средства измерения частоты дыхания мы использовали измерительный комплекс, построенный на базе x86-совместимого персонального компьютера, веб-камеры и специального программного обеспечения. Для измерений мышья фиксировали на предметном столике спинкой к объективу веб-камеры, как это показано на рис. 1. Затем на видеоизображении предметной области вручную выделялась прямоугольная область таким образом, чтобы в ней содержалась проекция спинки лабораторного животного (штрихпунктирная линия на рис. 1). После этого проводилась регистрация видеоизображения мышья в течение 1...2 мин. Дыхательные движения грудной клетки лабораторного животного регистрировались посредством отслеживания изменений абсолютного количества пикселей, на которые проецировался силуэт животного. На рис. 2 показан пример зарегистрированного таким способом сигнала.

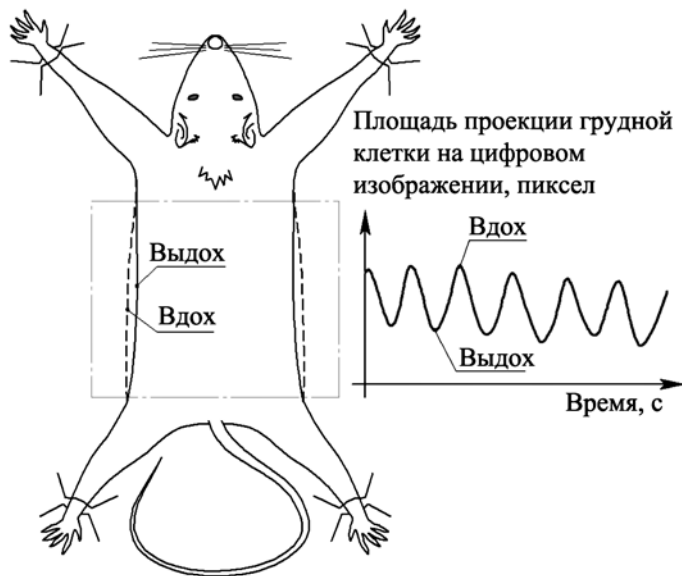


Рис. 1. Схема фиксации мышья для измерения частоты дыхания (вид сверху)

В измерительном комплексе в качестве веб-камеры была использована модель «Logitech B910 HD» (в режиме съемки с разрешением 640 x 480 пикселей и частотой выборки 30 кадр/с). Персональный компьютер был построен на базе центрального процессора «Intel Core i5 3230M» и работал под управлением операционной системы «MS Windows 8 64 bit». Специальное программно-алгоритмическое обеспечение было собрано из исходных кодов проекта <https://github.com/pi-null-mezon/QPULSECAPTURE.git> (тип лицензии GNU GPL).

Расчет частоты дыхания животного проводился один раз в секунду на протяжении всей длительности каждого эксперимента. Алгоритм расчета частоты дыхания был основан на использовании методов гармонического анализа. Так, каждую секунду проводилось вычисление дискретного преобразования Фурье от предыдущего 8-секундного отрезка записи сигнала. Затем на амплитудно-частотной характеристике полученного Фурье-спектра отыскивалось положение гармоники с максимальной амплитудой. По ней, с учетом значений амплитуд гармоник из ее окрестности, вычислялась текущая оценка частоты дыхания, выраженная во вдохах в минуту.

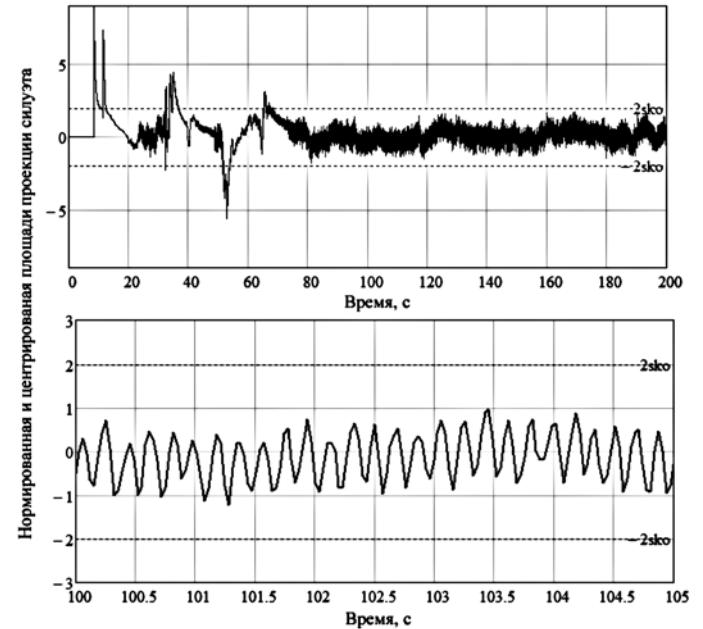


Рис. 2. Пример сигнала, зарегистрированного с помощью веб-камеры (mdx-мышья, самка, возраст – 4 мес.)

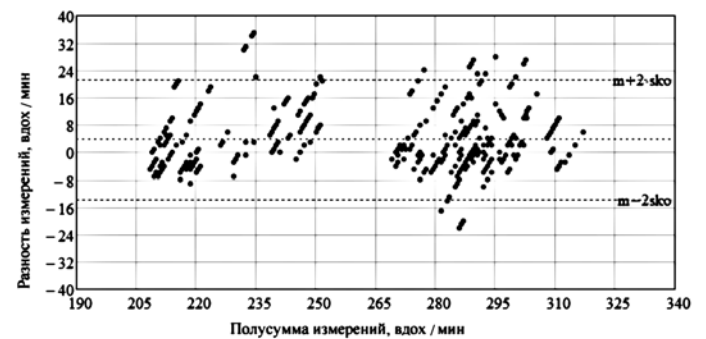


Рис. 3. Диаграмма Блэнда-Алтмана для двух методов измерения частоты дыхания мышья, построенная по данным контрольного эксперимента

Для того чтобы оценить точность разработанного метода, мы провели контрольный эксперимент. В группе из пяти слу-

Таблица 1

### Результаты контрольного эксперимента

Порядковый номер мышья	Генотип	Возраст, мес.	Выборочное среднее от разности, вдох/мин	Выборочное СКО от разности, вдох/мин	Коэффициент корреляции Пирсона	Объем выборки, пар измерений
1	x/x	От 4 до 5	10,7	8,5	0,16	66
2	mdx/mdx	От 4 до 5	2,2	7,8	0,83	64
3	x/y	От 4 до 5	2,9	8,5	0,27	140
4	mdx/y	От 4 до 5	1,3	6,6	0,54	113
5	mdx/mdx	От 4 до 5	3,2	8,1	0,70	128
Объединенная выборка:			3,8	8,7	0,96*	511

\*Корреляция статистически значима, с уровнем значимости  $\alpha \geq 0,00001$ .

чайно отобранных мышей была проведена серия парных измерений частоты дыхания двумя методами: с помощью описанной выше технологии и с помощью контрольного средства измерения, в качестве которого был использован прибор «PowerLab 4/30» компании «ADINSTRUMENTS». В ходе эксперимента была собрана выборка из 511 парных измерений, для которой были проведены корреляционный анализ и анализ методом Блэнда-Алтмана (см. рис. 3).

Выборочное среднее значение разности измерений составило 3,8 вдох/мин, выборочное среднеквадратическое отклонение (СКО) – 8,7 вдох/мин (см. табл. 1). По полученной выборке разностей была построена оценка 95%-ного доверительного интервала  $\Delta_{0,95} = (3,8 \pm 17,4)$  вдох/мин. Таким образом, с учетом постоянной поправки, значение абсолютной погрешности измерений может быть оценено как 18 вдох/мин в диапазоне измерений от 200 до 320 вдох/мин.

## Результаты

Оценив величину абсолютной погрешности измерений, мы перешли к основному эксперименту, целью которого была проверка гипотезы об учащенном дыхании mdx-мышей с мутацией гена дистрофина по сравнению с нормальными мышами без мутации. Для проверки этого утверждения мы провели ряд сравнительных экспериментов, в ходе которых проводились измерения средней частоты дыхания (далее – СЧД). СЧД из-

мерялась как среднее от измерений частоты дыхания в течение 1 мин после фиксации животного с интервалом между двумя последовательными измерениями, равным 1 с. Таким образом, для каждой особи набиралась выборка из 60 измерений частоты дыхания. Затем выборочное среднее и выборочное среднеквадратическое отклонение этих измерений использовались для сравнения животных.

Для количественного сравнения групп во всех экспериментах мы использовали непараметрический критерий Манна-Уитни с поправкой Йейтса. Особи во всех указываемых группах выбирались случайно и независимо друг от друга из колоний мышей, поддерживаемых специалистами кафедры иммунологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, с известными и контролируруемыми генотипами [4].

Первый эксперимент был проведен на выборке, состоящей из 20 мышей с генотипом mdx/y и 22 нормальных мышей с генотипом x/y, без мутации гена дистрофина. Возраст животных был от 8 до 12 месяцев. Результаты эксперимента представлены на рис. 4 и в табл. 2. Было установлено наличие статистически значимых различий между двумя группами мышей по величине СЧД с уровнем значимости 0,00001. В то же время расчет значения критерия для величины выборочного среднеквадратического отклонения измерений частоты дыхания в течение 1 мин после фиксации с интервалом между двумя последовательными измерениями 1 с (далее – СКО) показал от-

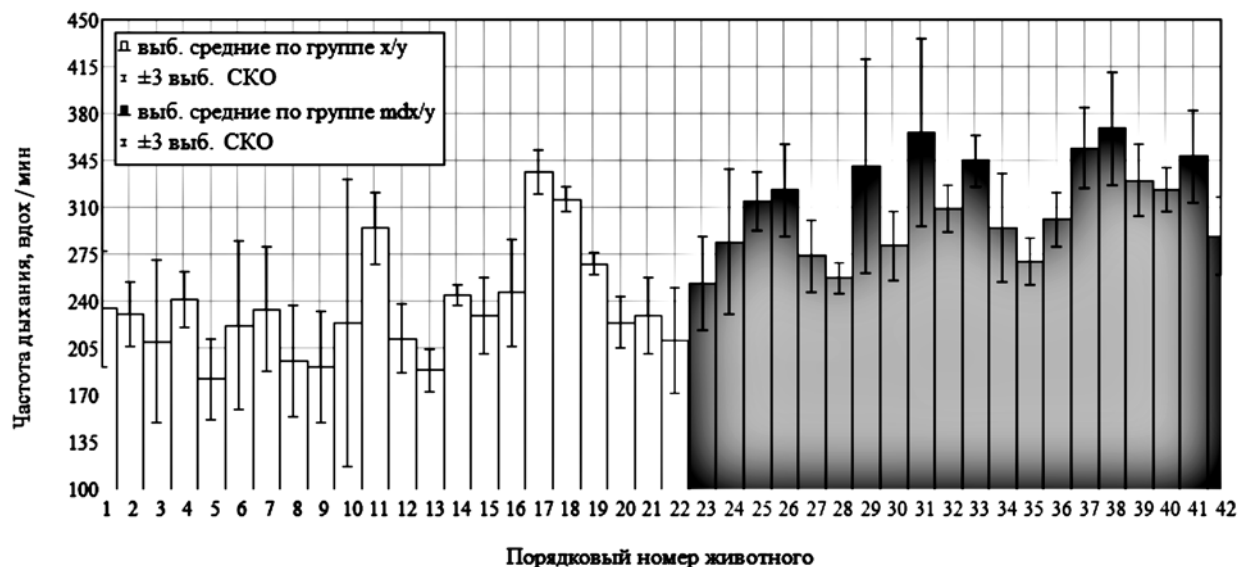


Рис. 4. Сравнение x/y- и mdx/y-мышей по частоте дыхания для мышей в возрасте от 8 до 12 месяцев

Таблица 2

Сводная таблица результатов экспериментов

Номер эксп.	Признак	Группа 1		Группа 2		Возраст животных, мес.	Значение критерия Манна-Уитни	Результат сравнения	Уровень значимости
		Генотип	Объем	Генотип	Объем				
1	СЧД	x/y	22	mdx/y	20	От 8 до 12	4,672	+	0,00001
	СЧД*						3,236	+	0,00250
	СКО						0,013	-	0,98000
2**	СЧД	x/y	11	mdx/y	8	От 4 до 5	3,592	+	0,00050
	СЧД*						2,271	+	0,02500
	СКО						0,124	-	0,90000
3***	СЧД	x/y	11	mdx/y	8	От 4 до 5	3,359	+	0,00050
	СЧД*						2,188	+	0,05000
	СКО						0,867	-	0,35000

Примечания:

\*при предположении о максимально больших погрешностях измерений;

\*\*измерения за первую минуту после фиксации;

\*\*\*измерения за вторую минуту после фиксации;

«+» – различаются;

«-» – не различаются.

существование статистически значимых различий между группами по этому признаку, с уровнем значимости 0,98. Таким образом, *mdx/y*-мыши статистически значимо отличаются от *x/y*-мышей по величине СЧД и не различаются по величине СКО. Тем не менее полученный результат был ограничен тем, что, во-первых, мог быть получен ошибочно из-за большого значения абсолютной погрешности измерений и, во-вторых, распространялся только на половозрелых особей старше 8 месяцев.

Для того чтобы показать, что несмотря на величину абсолютной погрешности измерений 18 вдохов/мин, результат первого эксперимента значимо указывает на наличие статистически значимых различий между группами, мы жесточили критерий сравнения. Для этого нами был рассмотрен «наихудший» сценарий проведения эксперимента, при котором все измерения в группе нормальных мышей *x/y* были сделаны с максимальной ошибкой в меньшую сторону, а все измерения в группе мутантных мышей *mdx/y* – с максимальной ошибкой в большую сторону. Для компенсации этого эффекта к СЧД нормальных мышей прибавляли 18 вдохов/мин и, наоборот, от СЧД *mdx/y*-мышей отнимали 18 вдохов/мин. Тем не менее в результате сравнения измененных таким образом данных различия между группами остаются статистически значимыми, с уровнем значимости 0,0025 (см. табл. 2).

Второй эксперимент был поставлен на животных в возрасте от 4 до 5 месяцев. Группа мышей с генотипом *x/y* состояла из 11 особей, группа мышей с генотипом *mdx/y* – из 8 особей. Результаты эксперимента приведены в табл. 2. Так же как и для половозрелых мышей, молодые мыши статистически значимо различаются по величине СЧД и не различаются по величине СКО. Аналогично, при проверке предположения о «наихудшем» сценарии проведения эксперимента (т. е. решающей роли случайности, обусловленной погрешностью изме-

рений) между группами было установлено наличие статистически значимых различий по СЧД.

Полученные данные позволяют предположить, что мыши с генотипом *mdx/y* совершают больше вдохов в минуту, чем мыши с генотипом *x/y*, причем различия в частоте дыхания начинают проявляться уже в возрасте 4-х месяцев. Мы, тем не менее, провели еще один эксперимент, направленный на проверку влияния длительности фиксации животных на частоту дыхания. Ведь если решающее влияние на изменение частоты дыхания оказывала не мутация гена дистрофина, а стресс, получаемый животным при фиксации, или длительность самой фиксации, то выводы по исследованию должны быть пересмотрены.

Третий эксперимент был поставлен на той же выборке, что и второй. Регистрация данных для обоих экспериментов происходила последовательно. Так, по окончании первой минуты измерений, в ходе которой собирались данные для второго эксперимента, животные не освобождались, а оставались зафиксированными в течение еще одной минуты, в ходе которой собирались данные для третьего эксперимента. Результаты третьего эксперимента приведены в табл. 2. Эти данные, в частности, позволяют говорить об отсутствии статистически значимых различий между частотой дыхания лабораторных мышей за первую и вторую минуты после фиксации. Таким образом, можно говорить о том, что была достоверно установлена причинно-следственная связь между мутацией гена дистрофина и увеличением СЧД лабораторных мышей.

#### Анализ газового состава крови

Нужно заметить, что установленная взаимосвязь между мутацией гена дистрофина и частотой дыхания при прочих равных должна приводить к изменению газового состава крови лабораторных животных. Для проверки этого предположе-

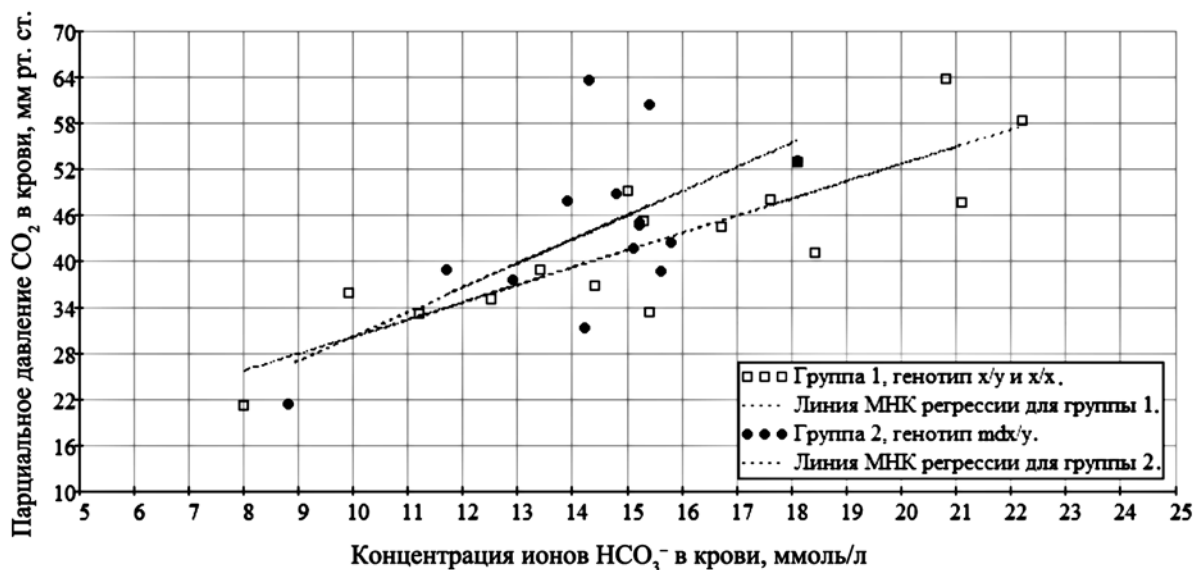


Рис. 5. Зависимость между концентрацией ионов  $\text{HCO}_3^-$  и парциальным давлением углекислого газа  $\text{CO}_2$  в крови нормальных мышей и мышей с мутацией гена дистрофина (абсолютная погрешность измерений концентрации ионов  $\text{HCO}_3^- \pm 0,05$  ммоль/л, парциального давления углекислого газа  $\text{CO}_2 \pm 0,05$  мм рт. ст.)

Таблица 3

Результаты эксперимента с газовым составом крови

Признак	Группа 1		Группа 2		Возраст животных, мес.	Значение критерия Манна-Уитни	Результат сравнения	Уровень значимости
	Генотип	Объем	Генотип	Объем				
$\text{HCO}_3^-$ , ммоль/л	x/y, x/x	16	mdx/y	14	От 8 до 12	1,060	–	0,25
$\text{pCO}_2$ , мм рт. ст.						0,353	–	0,70

Примечания:  
«+» – различаются;  
«–» – не различаются.

ния мы провели еще один эксперимент. Была сделана выборка двух групп мышей: в первую группу были включены нормальные мыши с генотипами  $x/y$  (11 особей) и  $x/x$  (5 особей), во вторую – мыши с мутацией гена дистрофина с генотипом  $mdx/y$  (14 особей). Для каждого животного проводили однократный газовый анализ крови, в результате которого измеряли концентрацию гидрокарбонат-ионов  $\text{HCO}_3^-$  и парциальное давление двуокиси углерода  $\text{CO}_2$  в крови. Результаты эксперимента представлены на рис. 5.

Сравнение при помощи F-критерия [5] двух линий регрессии, построенных по данным эксперимента, позволяет говорить об отсутствии статистически значимых различий между группами с уровнем значимости 0,20. Таким образом, вид зависимости не различался, тем не менее, группы могли различаться по абсолютным величинам параметров.

Чтобы проверить последнее предположение, мы сравнили две группы по абсолютным величинам концентрации ионов  $\text{HCO}_3^-$  и абсолютным значениям парциального давления  $\text{CO}_2$  в крови. В обоих случаях сравнение проводилось непараметрическим критерием Манна-Уитни с поправкой Йейтса. В результате сравнения было обнаружено отсутствие статистически значимых различий между группами как по абсолютной величине концентрации ионов  $\text{HCO}_3^-$ , так и по абсолютной величине парциального давления  $\text{CO}_2$  в крови (см. табл. 3).

Анализ полученных результатов позволяет предположить наличие у мышей с генотипом  $mdx/y$  неявного механизма компенсации, который, несмотря на повышенную относительно нормальных мышей  $x/x$  и  $x/y$  частоту дыхания, обеспечивает нормальный газовый состав крови. Поиск этого механизма станет предметом наших дальнейших исследований.

#### Заключение

Нами был разработан способ бесконтактного измерения частоты дыхания лабораторных мышей с абсолютной погрешностью измерений 18 вдохов/мин, который минимизирует стрессовое воздействие процесса измерений на животных. С его помощью было проведено исследование различий частоты дыхания между группой  $mdx$ -мышей с мутацией гена дистрофина и группой нормальных мышей без мутации. В результате исследования было установлено наличие статистически значимой разницы между указанными группами по величине СЧД, которая была больше для  $mdx$ -мышей, и отсутствие значимой разницы по величине СКО, что указывает на равную вари-

бельность частоты дыхания в обеих группах. Проведенный затем анализ газового состава крови выявил отсутствие значимых различий между группами по концентрации гидрокарбонат-ионов в крови и парциальному давлению углекислого газа в крови, а также по виду линейной зависимости между этими параметрами. Поэтому нами было высказано предположение о наличии скрытого механизма компенсации учащенного дыхания у  $mdx$ -мышей.

#### Список литературы:

1. Kliegman R.M., Behrman R.E., Jenson H.B., Stanton B.F. Muscular dystrophies. – Nelson Textbook of Pediatrics. 18th ed. Philadelphia, Pa:Saunders Elsevier, 2007: Chap. 608.
2. Rodino-Klapac L.R. et al. Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy // Arch. Neurol. 2007. Vol. 64. № 9. Retrieved 1-10-2011.
3. Huang P., Cheng G., Lu H., Aronica M., Ransohoff R.M., Zhou L. Impaired respiratory function in  $mdx$  and  $mdx/utrn+/-$  mice // Muscle Nerve. Feb. 2011. Vol. 43 (2). PP. 263-267.
4. Кривов Л.И., Стенина М.А., Ярыгин В.Н., Поляков А.В., Савчук В.И., Обрубов С.А., Комарова Н.В. Новая генетическая разновидность  $mdx$ -мышей: исследование особенностей фенотипа // Генетика. 2009. № 5. С. 557-561.
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. 459 с.

Марина Александровна Стенина,  
д-р мед. наук, профессор,  
Леонид Иванович Кривов,  
лаборант,  
кафедра иммунологии,  
РНИМУ им. Н.И. Пирогова,  
Игорь Николаевич Спиридонов,  
д-р техн. наук, профессор,  
Александр Александрович Таранов,  
аспирант,  
кафедра «Биомедицинские технические системы»,  
МГТУ им. Н.Э. Баумана,  
г. Москва,  
e-mail: stenina\_ma@mail.ru

С.А. Долгушин, Е.С. Одинцова, А.Ю. Герасименко, А.В. Тронин, С.А. Терещенко

## Испытания набора реагентов для мультиплексного анализа крови на инфекции TORCH-комплекса методом проточной цитофлуориметрии

#### Аннотация

Представлены результаты предварительных испытаний набора реагентов для многопараметровой оценки иммунного ответа человека на инфекции группы TORCH с помощью мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа *in vitro* на меченных органическим красителем полистирольных микросферах путем выявления в сыворотке крови иммуноглобулинов класса G к антигенам *Toxoplasma gondii*, *Rubella virus* и *Cytomegalovirus*. Диагностическая чувствительность разработанного набора реагентов составила 97 %.

TORCH-инфекции – это группа острых инфекционных заболеваний. Расшифровывается аббревиатура TORCH как: T – токсоплазмоз (toxoplasmosis); O – другие инфекции (others); R – краснуха (rubella); C – цитомегаловирусная инфекция (cytomegalovirus); H – герпес (herpes simplex virus).

Диагностика на наличие инфекций группы TORCH производится у беременных женщин. Особенности патогенеза заключается в том, что при *первичном* заражении эти патогены могут преодолевать плацентарный барьер и оказывать пагубное действие на все системы и органы плода, особенно на его центральную нервную систему, повышая риск выкидыша,

мертворождения и врожденных уродств ребенка. Часто поражение беременной женщины инфекциями TORCH-комплекса является прямым показанием к прерыванию беременности. Также диагностика проводится у новорожденных, поскольку вызванные данными патогенами врожденные инфекции могут приводить к летальным исходам [1]-[3].

В настоящее время основными методами анализа на инфекции TORCH-комплекса являются иммуноанализ и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Данные методы применяются давно, дают достоверные и надежные результаты, но обладают рядом существенных недостатков: относительно низкой чув-