

На правах рукописи
УДК 681.7.069.24: 681.784: 615.832.9: 621.396.96

Пырикова Светлана Ивановна

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ И СРЕДСТВ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ
ОПТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И ЛАЗЕРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ СПЕРМЫ**

**Специальность 05.11.17. – Приборы, системы и изделия медицинского
назначения.**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук**

Москва

2004

Работа выполнена в Московском государственном техническом университете
им. Н.Э. Баумана

Научный руководитель:

к.т.н., доцент Загидулин Р.Ш.

Официальные оппоненты:

д.т.н., профессор Парахин В.Б.

к.т.н., Арбачевский Л.С.

Ведущая организация: ГУН ВНИИИМТ МЗ РФ

1668353
Пырикова С.И.
Разработка методов и
средств автоматизированной
оптической диагностики и
лазерной стимуляции спермы
2004 0-00

ссылка 2004г.

совета Д 212.141.14 в Московском

им. Н.Э. Баумана по адресу:

1668353

им выслать по

ВОЗВРАТИТЕ КНИГУ НЕ ПОЗЖЕ

обозначенного здесь срока

Спиридонов И.Н.

Спиридонов И.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Современный уровень развития медицинской техники позволяет обеспечить такие области медицины и биологии как репродуктология, сперматология, биология разведения новыми высокоэффективными средствами количественной диагностики.

Важнейшим методом оценки функционального состояния половых желез и репродуктивной полноценности человека и животных является исследование спермы (определение показателей подвижности и концентрации сперматозоидов).

Анализ многочисленных литературных данных показал отсутствие единого метода и средств диагностики, позволяющих провести исчерпывающий анализ состояния спермы. Единственным доступным и широко используемым методом исследования является визуальный микроскопический метод, имеющий такие свойства как низкая точность, субъективность оценки, высокая трудоемкость.

Недостатки визуально-оптического метода обусловлены, в первую очередь, малым объемом выборки анализируемых частиц, что приводит к большой статистической погрешности. Существенного повышения точности и достоверности можно достигнуть, используя автоматизированные методы и средства, подобные давно и успешно используемым в гематологии автоматическим анализаторам форменных элементов крови.

Отечественными учеными (Попечителей Е.П., Спиридонов И.Н., Козинец Г.И. и др.) созданы научно-методические основы разработки средств автоматического анализа изображений клеточных структур, чувствительных и точных методов и средств оптического анализа биосубстратов.

Успешные разработки аппаратуры для оптического анализа клеток с 1990г. ведутся фирмой «Видеотест» (Санкт-Петербург), которой, в частности, создан анализатор изображений «Видеотест-Сперм», позволяющий определять концентрацию сперматозоидов (общую и по классам подвижности); производить автоматический анализ подвижности сперматозоидов в соответствии с рекомендациями ВОЗ; анализировать морфологию сперматозоидов в окрашенных мазках.

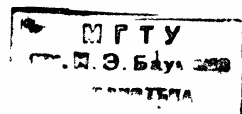
В последнем, четвертом издании «Руководства ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью» (1999г), указано, что основным методом анализа концентрации и подвижности сперматозоидов является визуально-микроскопический метод. Отмечается также актуальность разработки и применения автоматических анализаторов.

Цель и задачи диссертации

Цель работы: создание технических средств автоматического количественного анализа концентрации и категорий подвижности объектов на основе современных технологий оптических методов исследования.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие задачи:

1. Разработка аппаратно-программного комплекса для определения параметров движения сперматозоидов;
2. Разработка технологии экспресс - диагностики концентрации сперматозоидов на основе лазерного нефелометрического метода;
3. Исследование пороговых уровней, стимулирующих и угнетающих доз воздействия лазерного излучения применительно к объекту исследования;
4. Создание и апробация макетов аппаратно-программного комплекса определения параметров траекторий и скоростей движения и лазерного нефелометрического комплекса измерения концентрации;



5. Разработка технологии лазерной обработки биосреды, позволяющая повысить криоустойчивость клеток к повреждающим факторам.

Методы исследования

Поставленные задачи решены с использованием теории траекторной обработки, теории оптических систем, теории рассеяния света, теории взаимодействия лазерного излучения с веществом, методик построения и расчета оптических систем обработки изображений движущихся объектов и приборов нефелометрического анализа, теории криоконсервации и криоповреждений, методики биологического тестирования сперматозоидов на живучесть и терморезистентность.

Научная новизна

1. Разработаны научно-методические основы применения метода траекторной обработки изображений движущихся объектов для анализа подвижности сперматозоидов:

- создана математическая модель подвижной среды, позволяющая определять категории подвижности клеток с показателями достоверности и точности, значительно превышающими таковые для визуально-микроскопического метода;
- разработан алгоритм преобразования исходного изображения анализируемой среды в форму, подвергаемую траекторной обработке;
- разработан алгоритм для траекторной обработки и количественной оценки распределения скоростей и специализированное программное обеспечение.

2. Разработаны научно-методические основы применения нефелометрического метода для определения концентрации сперматозоидов:

- теоретически и экспериментально определены оптимальные условия применения нефелометрического метода для измерения концентрации движущихся частиц специфической формы;
- экспериментально определена зависимость показателей светорассеяния от параметров состояния анализируемого биосубстрата (градуировочная характеристика метода).

3. Определены пороговые, стимулирующие и угнетающие дозы воздействия на сперматозоиды лазерного излучения красного ($\lambda_1 = 0,63 \text{ мкм}$) и инфракрасного ($\lambda_2 = 0,89 \text{ мкм}$) диапазона в комплексном анализе, включающем исследование изменений функциональных параметров подвижности;

- для реализации лазерного нефелометрического метода измерения концентрации спермиев установлены пороговые уровни лазерного воздействия;
- обнаружено защитное действие низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) в красном и инфракрасном диапазоне лазерного излучения ($\lambda_1 = 0,63 \text{ мкм}$, $\lambda_2 = 0,89 \text{ мкм}$) на сперму, сохраняемую в охлажденном и криоконсервированном виде.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в разработке аппаратно-программного комплекса (АПК) и специализированного программного обеспечения для количественного определения параметров движения сперматозоидов, что позволяет автоматизировать микроскопический метод исследования и снизить его трудоёмкость.

Создание лазерного нефелометрического комплекса (ЛНК) позволяет быстро и интактно определять концентрацию сперматозоидов в объеме, что исключает влияние высыхания пробы на показатели подвижности.

Использование методов и средств, предложенных в работе, позволяет проводить неразрушающий экспрессный анализ.

Оба комплекса АПК и ЛНК могут использоваться в лабораторной биомедицинской диагностике и биотехнологии.

Использование НИЛИ в качестве криопротективного фактора позволило достоверно повысить количество репродуктивно полноценных сперматозоидов при криоконсервации. Технология криоконсервации с использованием НИЛИ внедрена и рекомендована к применению в практике биоразведения.

Положения, выносимые на защиту

1. Количественная оценка основных показателей качества сперматозоидов (концентрации и подвижности) с использованием оптических методов обработки изображения и лазерной нефелометрии.
2. Комплексный анализ параметров движения ансамбля объектов сложной формы с использованием методов траекторной обработки скорректированного исходного изображения.
3. Многоцелевой анализ эффективности использования лазерной обработки сперматозоидов, сохраняемых при биологически тестовых температурах.
4. Технология лазерной обработки репродуктивных клеток в процессе криоконсервации.

Апробация работы

Апробация работы проведена на базе лаборатории Клиники Неврозов им. З.Б. Соловьёва г. Москва, НИИ племенного дела, г. Лесные Поляны, консультации №34 "Брак и семья", г. Москва.

Основные положения работы докладывались на VI международной научно-технической конференции "Лазеры в науке, технике, медицине" (Суздаль, 1995), на межреспубликанском заочном научно-техническом семинаре «Применение лазеров в науке и технике» (г. Долгопрудный, 1996), на объединенном научном семинаре факультета «Биомедицинская техника» МГТУ им. Н. Э. Баумана (Москва, апрель 2002; май, декабрь 2003), на научном семинаре кафедры «Лазерные технологии в машиностроении» МГТУ им. Н. Э. Баумана (Москва, февраль 2002; апрель 2003), международной конференции «Телевидение: передача и обработка изображений» (Санкт-Петербург, 2003), международной научно-практической конференции «Измерительные информационные технологии и приборы в охране здоровья» (Санкт-Петербург, 2003), международной научно-технической конференции «Пища, экология, человек» (Москва, 2003), международной научно-технической конференции «Технологии живых систем» (Москва, 2003), международной научно-практической конференции «Образовательные, научные и инженерные приложения в среде LabVIEW и технологии National Instruments» (Москва, 2003).

Публикации

По материалам диссертации опубликована 1 научная статья и 16 тезисов докладов.

Объём и структура работы

Диссертация состоит из введения, шести глав, общих выводов, списка литературы и приложения. Основной текст диссертации изложен на 220 страницах. В приложении приводятся дополнительные и вспомогательные материалы. Список литературы включает 229 наименований. Диссертация проиллюстрирована рисунками, таблицами и графиками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована необходимость, актуальность и практическая ценность исследования.

Первая глава посвящена обобщению литературных данных по существующим методам диагностики и хранения семенной жидкости в биологии и медицине. Выделены наиболее информативные параметры качества биосреды и трудности их количественной оценки. Установлено, что наиболее перспективными в данном направлении являются оптические методы исследования. С учётом оптических и динамических особенностей изучаемой биосреды выбрано направление разработки

технологии экспресс – диагностики по параметрам концентрации и подвижности методом обработки визуальных изображений и лазерным нефелометрическим методом.

Анализ литературных данных по криопротективному действию на сперматозоиды физических полей и по стимулирующим эффектам взаимодействия НИЛИ с биосредой показал перспективность исследований защитного действия лазерного излучения с длинами волн 0,63мкм и 0,89мкм, использования данного воздействия для тестирования состояния и качества спермы.

Сформулированы цели и подробно изложены задачи исследования.

Во второй главе описаны материалы и традиционно используемые методы исследования спермы в биологии и медицине.

Третья глава посвящена разработке аппаратно-программного комплекса (АПК) определения траекторий и скоростей движения сперматозоидов для оценки качества спермы человека и животных.

При исследовании эякулята важным показателем фертильности спермиев являются их кинематические характеристики. Вероятность оплодотворения снижается с уменьшением количества подвижных спермиев в эякуляте. Сперматозоиды могут иметь вращательное (маневное), колебательное и прямолинейно-поступательное движение. Анализ механизмов движения клеток, данный в работе (Amelar R.D.,1980) показал, что оплодотворяющей способностью обладают только спермии с прямолинейно-поступательным движением. Количественное соотношение активно-подвижных, слабо-подвижных и неподвижных клеток является одним из основных критериев качества в медицинской диагностике спермы.

При разработке комплекса в основу были положены результаты исследований кинематических характеристик клеток оптическими (Соколовски Т.,1977; Габбасов З.А.,1999), микрофотографическими (Macler A.,1979; Panidus D.,1982) и видеомикрофотографическими (Grahman E.F. et. al.,1970) методами.

Большинство ранее предложенных (Schoevar D. et.al.,1982; Mortimer D.,1984; Стрелков А.И., Осташко А.П.,2000) методов для количественной оценки параметров движения клеток недоступно для использования в клинко-диагностических лабораториях из-за сложности и высокой стоимости используемого оборудования, недостаточного качества анализа и необходимости применения методов окраски и фиксации подвижных клеток.

Для автоматизированного разделения спермиев по классам подвижности в соответствии с рекомендациями ВОЗ эффективно применение подходов и алгоритмов цифровой обработки радиолокационной информации для обработки массивов данных большой размерности (в том числе изображений), осуществления интегральных преобразований, ассоциативных выборок. Для обеспечения требований быстродействия и эффективности неоднородной системы обработки информации, включающей в себя электронные компоненты и узлы, наиболее пригодны оптоэлектронные процессоры, сочетающие в себе оптику, электронику и цифровую технику, вследствие возможности осуществления связей любой конфигурации, в том числе типа «каждый с каждым» без взаимных помех. К данному классу относятся многоэлементные фоточувствительные приборы с зарядовой связью (ПЗС- фотоприемники).

Таким образом, оптимальным решением задачи количественной оценки подвижности и одновременно автоматизации визуально-микроскопического метода, на наш взгляд, является создание аппаратно – программного комплекса, в котором изображение объекта в виде черно - белого TV - сигнала через объектив микроскопа фиксируется ПЗС камерой и обрабатывается в персональном компьютере. В комплексе реализуется оптический метод исследования – метод обработки изображений по

принципу селекции движущихся целей. При этом используется теория траекторной обработки (ТТО), применяемая в радиолокации.

Разработанная структурная схема комплекса для определения параметров движения представлена на рис.1:

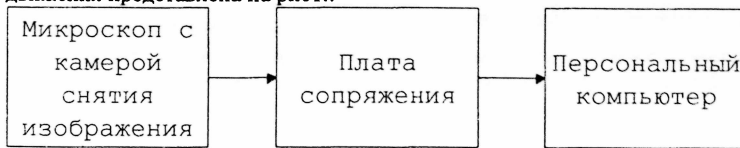


Рис.1. Структурная схема комплекса.

По результатам предварительных экспериментов были выбраны аппаратные средства для реализации АПК. Эксперименты проводились на сперматозоидах человека и животных, изображения которых показаны на рис.2 и рис 3. Как видно из рисунков, концентрация сперматозоидов животных значительно выше (в среднем 3×10^9 клеток/мл), чем у человека ($(3-14) \times 10^7$ клеток/мл). Кроме того, средняя скорость движения клеток животных выше на 25-35%. Стабильность показателей спермы племенных животных позволяет получить статистически достоверные корреляционные зависимости методом обработки визуальных изображений относительно традиционно используемого визуального метода. Одновременно с этим, ввиду названных отличий биосред, повышаются требования к аппаратным средствам.

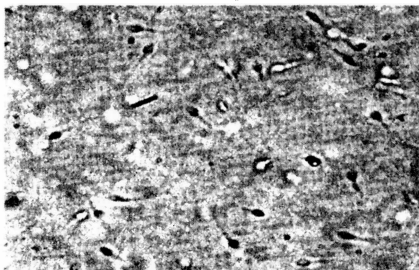


Рис.2. Изображение спермы человека.



Рис.3. Изображение спермы барана.

По известным данным средней скорости передвижения «цели», т.е. сперматозоида, рассчитывалась наименьшая частота кадров ($f = 1,68$ Гц), в соответствии с которой выбиралась ПЗС (прибор с зарядовой связью) – камера со стандартным чёрно-белым видеосигналом и фрейм-граббер, скорость оцифровки которого 15 кадров в секунду, разрешением 640x480 точек.

На основе ТТО разработана математическая модель движения сперматозоидов. Траекторная обработка параметров движения по фиксированной выборке проводилась по схеме (рис.4).



Рис. 4. Структурная схема алгоритма траекторной обработки движения клеток. Параметры траектории определяются по фиксированной выборке.

Имеются моменты измерений:

$$t_1, t_2, \dots, t_i, \dots, t_n \quad (1)$$

Этим моментам соответствуют измерения:

$$\vec{r} = \|\vec{r}_1 \ \vec{r}_2 \ \dots \ \vec{r}_i \ \dots \ \vec{r}_n\|^T \quad (2)$$

где $\vec{r}_i$ - параметр траектории.

В данном случае, каждое измерение:

$$\vec{r}_i = \|\mathbf{x}_i \ y_i\|^T$$

где x_i, y_i - отметки клеток на i -ом моменте измерения.

Траектория движения цели, описываемая полиномом s -ой степени, представляется в виде.

$$\vec{r}(\vec{v}, t) = \sum_{j=0}^s \frac{1}{j!} \vec{v}_j t^j \quad (3)$$

Так как число измерений положения отметок сперматозоида больше степени полинома, то полиномиальная траектория будет отличаться от истинной, следовательно, необходимо оценить параметры траектории

$$\hat{\vec{v}} = \|\hat{v}_0 \ \hat{v}_1 \ \dots \ \hat{v}_i \ \dots \ \hat{v}_n\|^T \quad (4)$$

и матрицу ошибок Ψ .

Применительно к решаемой задаче, где траектория описывается квадратичной зависимостью, то есть полиномом второй степени, имеем:

$$s = 2$$

$$\hat{\vec{v}} = \|\hat{v}_0 \ \hat{v}_1 \ \hat{v}_2\|^T \quad (5)$$

$$\Psi = \begin{pmatrix} \sigma^2(v_0) & \Psi_{12} & \Psi_{13} \\ \Psi_{21} & \sigma^2(v_1) & \Psi_{23} \\ \Psi_{31} & \Psi_{32} & \sigma^2(v_2) \end{pmatrix} \quad (6)$$

Реальную траекторию можно представить в виде суммы из полиномиальной траектории и невязки. То есть:

$$\vec{r} = \vec{r}(\vec{v}, t) + \vec{\Delta r} \quad (7)$$

Для линейного приближения это можно записать в виде:

$$\vec{r}(\hat{\vec{v}}, t) \approx \vec{r}(\vec{v}, t) + \frac{d \vec{r}(\vec{v}, t)}{d \vec{v}} \vec{\Delta v} \quad (8)$$

В ходе траекторной обработки (ТО) были определены траектории и параметры движения сперматозоидов: скорости, типы движения, число подвижных клеток.

Метод ТО позволяет разделить траектории клеток на классы, соответствующие рекомендациям Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ).

Для корректного использования теории селекции движущихся целей (СДЦ) методически обеспечивалось выполнение следующих условий:

- расстояние между клетками, представляющими цели, намного больше размеров самих клеток
- перемещение за такт фиксации намного меньше размеров целей
- движение объекта происходит между предметным и покровным стеклом (исключая движение по третьей координате)
- селекция клеток проводится по анализу движения головки сперматозоида.

Экспериментально установлено, что для сопровождения перемещения клеток оптимальным является хранение данных по перемещению точки, чего невозможно достичь при «резком» изображении. Завышение фокуса позволило превратить изображение головки клетки в темную отметку (рис.6).



Рис.5. Изображение головки клетки в фокальной плоскости.

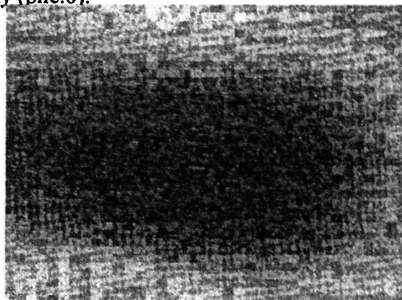


Рис.6. Изображение головки клетки вне фокуса.

Распределение интенсивности изображения клетки при завышенном фокусе имеет экстремум и графически носит вид впадины, что позволяет четко определить положение клетки. Пороговая обработка изображений представлена на рис. 7 и рис. 8.

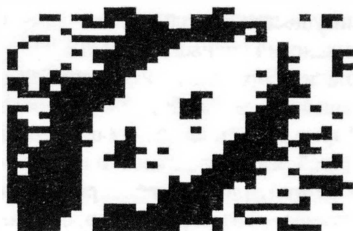


Рис.7. Пороговая обработка изображения в фокальной плоскости



Рис.8. Пороговая обработка изображения вне фокуса .

Для анализа геометрии сперматозоида следует работать в «резком» фокусе, для траекторной обработки - требуется завышение фокуса.

Стадии процесса оценки подвижности сперматозоидов и схема этапов работы АПК подробно описаны в диссертации.

Использование АПК для экспресс-диагностики позволяет повысить точность определения параметров подвижности (соотношения активно-подвижных, слабо-подвижных и неподвижных спермиев) и снизить трудоёмкость процесса за счет его автоматизации.

Основным количественным показателем разработанного метода является число анализируемых частиц в каждой из категорий сперматозоидов и в целом в пробе (n). Приняв обычное в этих случаях предположение о пуассоновском распределении частиц

в поле зрения системы, получим, что относительная погрешность оценки количества частиц в каждой категории

$$\delta_n = (n)^{-0,5}$$

Обычно в одном поле зрения анализируется до 100 частиц ($n=100$); при этом $\delta_n=0,1$ Увеличение числа частиц может быть достигнуто смещением поля зрения; при этом $n=625$, и $\delta_n=0,04$.

Макетный образец аппаратно-программного комплекса определения параметров движения сперматозоидов включает следующие элементы:

- ◆ ПЗС камера, выход – стандартный черно-белый видеосигнал;
- ◆ фрейм – граббер (разрешение кадра 640x480 точек, 256 оттенков серого цвета на одну точку (один байт)); скорость оцифровки 15 кадров в секунду (при снятии последовательности кадров));
- ◆ персональный компьютер Pentium (не ниже 200).

В четвертой главе приведены результаты экспериментально-теоретического исследования возможности применения лазерного нефелометрического метода для экспресс – контроля концентрации сперматозоидов.

В работах (Сидько Ф.Я.,1969, Sokolowski J.,1977, Rondeau M., Rouleau M.,1981, Лопатин В.Н.,1988, Пшеничникова Т.М.,1990, Сорокин Н.В.,1990, Безрукова А.Г., 1996) показана перспективность применения нефелометрического метода светорассеяния для анализа биологических суспензий, обусловленная возможностью исследовать пробы среды в объеме, без ограничения подвижности и влияния повреждающих факторов, например, разбавителей биосред и средств окраски клеток. Применение метода лазерной нефелометрии в клинической иммунологии и реологии показало высокую эффективность, стабильность, точность и быстродействие.

Определению характеристик сперматозоидов по спектру рассеянного монохроматического излучения на основе эффекта Доплера посвящен ряд работ (Еськов А.П. и др.,1982; Evenson D.P. et.al.,1982; Jeulin C. et.al.,1982, Foster M. et.al.,1983). Математическое обоснование и преимущества использования лазерного излучения в данном методе подробно описал американский учёный J.Frost (1981).

Наиболее популярной моделью для решения прямой и обратной задач светорассеяния является представление дисперсной биосреды набором однородных сфер, т.к. многие клетки и микроорганизмы по форме представляют собой шары или эллипсоиды. Для сферической формы рассеивателей имеется точное решение, что позволяет оценить адекватность применения того или иного приближения. Универсальной моделью объектов живого микромира – бактерий, спор, дрожжей, растительных и животных клеток, микроводорослей – может служить эллипсоид вращения. Варьируя соотношения осей, можно получить палочко- и дискообразные частицы и аппроксимировать другие формы (цилиндры и сфероиды).

Выбор теории светорассеяния и граничных условий её применимости определяется оптическими свойствами биосреды.

Решение задачи о рассеянии света с учётом формы, микроструктуры, полидисперсности даёт теория Ми, позволяющая рассчитать угловое распределение рассеянного частицей света как функцию безразмерного параметра дифракции $\rho=2\pi r/\lambda$ (где r -радиус частицы, λ - длина волны падающего излучения). Расчет граничных условий по параметру дифракции показал необходимость использования 2-го приближения ($\rho \gg 1$).

Характеристикой изменения в пространственном распределении света является индикатриса светорассеяния, определяющая интенсивность света как функцию угла рассеяния. Измерение индикатрисы рассеяния включает освещение объекта и

регистрацию интенсивности рассеянного веществом света под различными углами, в зависимости от оптических характеристик биосреды.

Результаты теоретических и экспериментальных исследований показали, что нефелометрический метод приемлем для исследования зависимости характеристик светорассеяния от концентрации и подвижности сперматозоидов.

Для математического описания ансамбля используется функция, характеризующая состояние частиц, в каждой точке пространства: $f_n(r_1, \dots, r_n, v_1, \dots, v_n, t)$. Вероятность нахождения частиц в конфигурации определяется величиной $f_n(r_1, \dots, r_n, v_1, \dots, v_n, t) dr_1, \dots, dr_n dv_1, \dots, dv_n$. Каждая частица находится в элементе объема dr_i около точки r_i и имеет скорость в интервале от v_i до $v_i + dv_i$. Функция f_n нормируется из условия:

$$\int f_n(r_1, \dots, r_n, v_1, \dots, v_n, t) dr_1, \dots, dr_n dv_1, \dots, dv_n = 1 \quad (10)$$

Введя обозначение $x_i = (r_i, v_i)$ – вектор, определяющий состояние i -й частицы запишем в виде

$$\int f_n(x_1, t) dx_1, \dots, dx_n = 1 \quad (11)$$

В случае отсутствия подвижных частиц, состояние системы покоящихся характеризуется только положением частиц:

$$f_n = f_n(r_1, \dots, r_n). \quad (12)$$

В случае независимых рассеивателей:

$$f_n = (n^{-1})^n \cdot n(x_1) \dots n(x_s) \dots n(x_n) \quad (13)$$

$$\int n(x) dx = N, \quad (14)$$

где v – объём, в котором находятся частицы,

Функция $f_n(x_i, t)$ даёт статистическое описание системы. Любая измеряемая характеристика A^n рассматриваемого ансамбля (например, интегральная характеристика светового рассеяния, коэффициент пропускания) зависит от $f_n(x_i, t)$ и является средним значением соответствующих характеристик A , реализуемых в возможных состояниях системы:

$$A^n = \int f_n A dx_1 \dots dx_n \quad (15)$$

В первом борновском приближении, без учета многократного рассеяния интегральное рассеяние определяется рассеянием всех частиц объема.

$$P_s / P_i = \sum N_j \cdot S_j \cdot Q_j = N_{\text{eff}} \cdot S_{\text{eff}} \cdot Q_{\text{eff}} \quad (16)$$

Изменение сигнала светорассеяния биологических объектов связано с вариациями концентрации, размеров, формы, а также морфологией их внутренних компонентов; особое значение имеют параметры зондирующего излучения.

Выбор длины волны зондирующего излучения определялся исходя из оптических свойств биосреды, в диапазоне, где биологические среды (бактерии, суспензии, лимфа, сперма) имеют наименьшее поглощение (1-5)% и значительное рассеяние. Известно, что на длине волны 0,9 мкм наблюдается наименьшее поглощение в жидких средах. Экспериментально полученные нами спектральные характеристики спермы показали, что оптимальным диапазоном длин волн для диагностики является 0,87-0,90 мкм (излучение GaAs, $\lambda = 0,89 \mu\text{м}$).

Для измерения использовался нефелометр, разработанный в МГТУ им. Н.Э. Баумана, при участии автора в схемотехнической и конструкторской части. Исследуемая нативная биосреда сохранялась в специальной термокамере при температуре 37° С. Порцию спермы помещали в кювету нефелометра и проводили измерение в 10 сериях по 4 повтора в каждой.

Анализ данных показал, что нефелометрический метод регистрирует линейное уменьшение концентрации сперматозоидов в зависимости от степени разбавления

(нелинейность не более $\pm 2\%$; среднее квадратическое отклонение (СКО) не более $\pm 0,5\%$).

Функциональная зависимость светорассеяния не только от концентрации, но и от подвижности при степени разбавления от 1:40 до 1:100 раз, очевидно, объясняется ещё и тем, что с утратой жизнеспособности сперматозоид меняет не только свою подвижность, но и другие характеристики, например форму.

Длительность нефелометрического исследования составляет 11с и не влияет на свойства анализируемого субстрата.

Подсчет концентрации клеток также проводили стандартным визуальным методом в камере Горяева, подвижность спермиев определяли по традиционным используемым в биологии и медицине методикам. Параллельно для каждой пробы определяли оптическую плотность на фотозлектронном колориметре и светорассеяние на нефелометре.

Сравнительные экспериментальные исследования нефелометрического и известного фотокolorиметрического метода показали, что предложенный метод измерения концентрации по величине случайной погрешности многократных определений одной и той же пробы на порядок превосходит второй.

Лазерный комплекс экспресс-диагностики концентрации спермы состоит из нефелометра и специализированного программного обеспечения.

Предложенная технология определения концентрации сперматозоидов состоит в следующем:

1. с помощью разработанного АПК определяется подвижность;
2. с использованием лазерного нефелометрического метода по изменению интегральной характеристики светорассеяния с учётом ранее измеренной подвижности определяют концентрацию.

По совокупности измеряемых величин на основе медико-биологических нормативов, приведенных в рекомендациях Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), определяется репродуктивная полноценность клеток.

Таким образом, разработан комплекс для экспресс-диагностики спермы на основе метода лазерной нефелометрии и метода обработки оптических изображений, позволяющий определять качество спермы по параметрам подвижности и концентрации.

Достоинства разработанного комплекса: высокая точность, объективность, скорость выполнения анализа, удобство использования, сохранение результатов анализа в графическом и табличном виде.

Решение задачи нефелометрической диагностики биосреды требует определения пороговых доз воздействия НИЛИ. В экспериментальных исследованиях установлено, что за пределами пороговых доз воздействия существуют диапазоны стимулирующих и угнетающих доз.

Исходя из теории биотехнических систем (БТС), объект исследования, технологию и аппаратуру для анализа спермы следует рассматривать как единую биотехническую систему лабораторного анализа (БТС ЛА), для разработки которой целесообразно учитывать основные принципы синтеза БТС. Согласно принципам построения БТС при анализе объекта как элемента биотехнической системы необходимо учитывать, что параметры взаимодействующих с объектом физических полей не должны превышать физиологический диапазон адаптации объекта и вызывать его изменения.

Исходя из этого, в пятой главе исследовалось воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) с длинами волн 0,63 мкм и 0,89 мкм на биосреду с целью

определения доз невозмущающего, биостимулирующего и угнетающего действия НИЛИ на спермии.

В биологии принято оценивать степень действия фармакологических препаратов и различных физических полей на биорепродуктивную полноценность сперматозоидов по изменению абсолютного показателя живучести (АПЖ) опытных групп относительно контрольных. АПЖ представляет сумму подвижности клеток за определенные промежутки времени:

$$\text{АПЖ} = (t_1 P_1 + t_2 P_2 + t_3 P_3 + \dots + P_n) / t_{\Sigma}, \text{ где}$$

P_1, P_n - последовательные оценки подвижности сперматозоидов, выраженные в баллах или процентах.

$t_1, \dots, t_n$ - отрезки времени в часах, вычисляемые по формуле:

$$t_n = \frac{T_{n+1} - T_{n-1}}{2} - \text{интервал времени, за который определяется подвижность}$$

клеток.

T_n - время от начала опыта до n-го измерения.

t_{Σ} - суммарное время тестового исследования от его начала до полной потери жизнеспособности клеток.

Дозой порогового воздействия считается доза, при которой изменение АПЖ не превышает 2%, стимулирующего - $(\text{АПЖ}_{\text{обл}} - \text{АПЖ}_{\text{контроль}}) > 2\%$, угнетающего - $(\text{АПЖ}_{\text{контроль}} - \text{АПЖ}_{\text{обл}}) > 2\%$.

В исследованиях после лазерной обработки биосреда подвергалась традиционным для биологических исследований шокowym испытаниям на биорепродуктивную полноценность. При этом исследовали живучесть сперматозоидов баранов при различных температурах хранения (38°C , 45°C , 18°C) и охлаждении до 0°C . Каждый эксперимент проведен в 7-12 сериях по 3 повтора в серии ($P < 0,01$; $P < 0,05$). Биосреда подвергалась обработке лазерным излучением с параметрами, приведенными в таблицах 1 и 2. Время экспозиции варьировалось от 10 до 300 с шагом 5с.

Таблица 1

Параметры излучения GaAs лазера с длиной волны 0,89 мкм

Режим работы лазера	I	II	III	IV	V
Частота, F (кГц)	0,60	1,25	2,50	5,0	10,0
Средняя мощность, P (мВт)	0,15	0,30	0,60	1,20	2,40

Таблица 2

Параметры излучения He-Ne лазера с длиной волны 0,63 мкм

Режим работы лазера	I	II	III
Мощность, P (мВт)	1,25	1,35	1,95

Эффект воздействия НИЛИ на живучесть и подвижность сперматозоидов оценивался по превышению абсолютного показателя живучести облученных спермиев над контролем. Из проведенных исследований установлены уровни порогового воздействия (УПВ). Показано, что на них влияет мощность, длина волны и параметры модуляции излучения.

В процессе исследования выявлено, что за пределами УПВ существует стимулирующее воздействие лазерного излучения, выраженное в увеличении абсолютного показателя живучести при определенных сочетаниях параметров лазерного излучения.

Зависимость индуцированных изменений анализируемых показателей от дозы имеет немонотонный характер. Одинаковые дозы при разных частотных и временных характеристиках вызывают различные эффекты.

При этом наиболее эффективной является лазерная обработка сперматозоидов с длительностью экспозиции 30с, 60с, 90с, 120с. Эти данные согласуются с классификацией ритмов, характерных для динамики жизнедеятельности субклеточных структур, отдельных клеток, простых и сложных одно- и многоклеточных организмов, а также популяций или экосистем (Моисеева Н.И., Сысцев В.М., 1981). В исследованиях по влиянию лазерного излучения (0,63 мкм) на морфофункциональные свойства сперматозоидов человека максимальное стимулирующее действие установлено при времени экспозиции 30 с и 60 с.

Эксперименты показали, что однократная обработка сперматозоидов НИЛИ с длинами волн 0,63 мкм и 0,89 мкм повышает живучесть клеток, сохраняемых при температуре 38⁰С, соответственно на 10-20 % и на 40-100% в зависимости от параметров излучения.

В изучении выживаемости клеток при повышенной температуре (45⁰С) установлено стимулирующее действие лазерного излучения с длиной волны 0,89 мкм и дозе облучения 19 мДж/см² (50 с), составляющее 40%. Максимальное стимулирующее действие излучения с длиной волны 0,63 мкм составило 94% при дозе облучения 31 мДж/см² (50с).

Выраженный стимулирующий эффект проявлялся при времени облучения 30-60с. По мере увеличения поглощенной энергии стимулирующий эффект переходит в ингибирующий.

При температуре хранения 18⁰С установлено повышение живучести опытных групп эякулятов над контрольными на 12-25%.

Исследование на устойчивость сперматозоидов к "холодовому шоку" (резкое охлаждение до 0⁰С) показало преобладающее стимулирующее действие излучения GaAs лазера (70 - 100% по отношению к контролю), в то время как излучение He-Ne лазера защитило клетки на 30-40%

Таким образом, в результате данной части работы экспериментально определены дозы порогового воздействия, используемые в диагностике, и дозы стимулирующего характера лазерного излучения.

Установленное стимулирующее действия лазерного излучения (см. табл.4) позволило сформулировать следующую задачу исследования как создание технологии лазерно-криогенной консервации (глава 6). Для достижения максимального криозащитного эффекта были оптимизированы дозовые диапазоны стимулирующего воздействия лазерного излучения.

Таблица 3

Эффективность воздействия лазерного излучения на живучесть спермиев вне организма.

Количество серий экспериментов N=12

Доза облучения, мДж/см ²	Длительность экспозиции, с	АПЖ _{ОБЛ} – АПЖ _{КОНТРОЛЬ} , %	№ режима работы лазера
1. $\lambda = 0,89$ мкм			
t термостатирования клеток = 38 ⁰ С			
45,80±0,10	120	98,30±1,10*	IV
24,00±0,10	60	95,20±0,50*	IV
34,00±0,10	90	93,00±0,90*	IV
7,60± 0, 05	40	75,40±1,60**	III
69,00±0,10	90	50,40±1,20*	V

“Тепловой шок”, t термостатирования клеток = 45°C			
19,00±0,10	50	40,30±1,40**	IV
2,40±0,05	60	37,20±0,80*	V
5,70±0,05	60	31,70±1,00*	II
t термостатирования клеток = 18°C			
34,00±0,10	90	20,10±0,70*	IV
5,70±0,05	60	20,50±1,20*	II
5,70±0,05	30	19,00±1,50*	III
92,00±0,10	120	18,40±2,50**	III
17,20±0,05	90	17,90±1,80*	III
69,00±0,10	60	16,30±3,00**	V
11,60±0,10	60	16,40±0,05*	III
“Холодовой шок”, t термостатирования клеток = 0°C			
69,00±0,10	90	99,00±3,40	V
8,60±0,05	90	84,90±1,50	II
46,00±0,10	60	70,50±0,70	V
2. $\lambda = 0,63$ мкм			
t термостатирования клеток = 38°C			
8,60±0,05	30	24,00±1,00*	III
17,00±0,10	40	16,70±1,70**	II
12,00±0,10	30	10,20±0,90**	I
“Тепловой шок”, t термостатирования клеток = 45°C			
31,00±0,10	50	94,60±1,70**	III
38,00±0,10	60	80,40±0,80*	III
26,00±0,10	60	53,20±1,20*	II
17,00±0,10	40	50,00±2,50**	II
t термостатирования клеток = 18°C			
74,4±0,10	120	34,20±0,90*	III
7,4±0,05	180	26,00±1,10*	II
51,6±0,10	120	24,30±1,30*	II
13,0±0,10	90	22,20±1,80*	II
“Холодовой шок”, t термостатирования клеток = 0°C			
38,00±0,10	120	43,40±1,20*	V
37,00±0,10	60	43,30±1,80*	II
19,00±0,10	30	36,30±1,40*	V

*P < 0,01; **P < 0,05

Из анализа работ по исследованию механизмов криоконсервации (Крамер Т.И.1982, Дрокин К.Е.,1998, Смаглий Н.Ю.,1985) установлено, что повреждающее действие на сперматозоиды при криоконсервации происходит вследствие разрушения мембраны клетки.

Экспериментально исследовалось воздействие НИЛИ на живучесть сперматозоидов, подвергнутых глубокому замораживанию до температуры -196°C согласно стандартной биологической методике криоконсервации по разбавлению, замораживанию и хранению спермы (ГОСТ 6909-72, ГОСТ 10652-73). Эффект оценивался по изменению АПЖ.

Результаты экспериментов показали, что максимальным защитным действием обладает излучение с $\lambda=0,89$ мкм. Предполагаем, что это связано с наибольшим проникновением излучения полупроводникового лазера в клетку и воздействием на восстановительные и стимулирующие свойства клетки на «организационном» субклеточном уровне и ДНК.

Эффективность использования лазерного излучения в качестве криопротектора репродуктивных клеток.

Количество серий экспериментов N=12

Доза облучения, мДж/см ²	Время экспозиции, с	АПЖ _{обл} – АПЖ _{контроль} , %	№ режима работы лазера
t криохранения клеток = -196 °С			
1. $\lambda = 0,89$ мкм			
5,70±0,05	30	97,00±1,10*	III
17,20±0,10	90	70,00±1,50*	III
34,50±0,10	90	68,20±2,60*	IV
92,00±0,10	120	65,30±1,30*	V
11,70±0,10	60	59,10±1,30*	III
2. $\lambda = 0,63$ мкм			
51,60±0,10	120	54,20±3,40**	I
56,00±0,10	90	24,80±1,80*	III

*P < 0,01; **P < 0,05

Таким образом, впервые экспериментально установлены дозы стимулирующего действия излучения GaAs лазера на криосохраняемые сперматозоиды с максимальным двукратным эффектом (по отношению к контролю) при дозе облучения 5,7 мДж / см².

На основе экспериментальных данных оптимизированы параметры лазерной обработки биосреды для технологического процесса глубокого замораживания.

В проведенных исследованиях определено оптимальное соотношение параметров обработки НИЛИ биосреды для получения максимального стимулирующего действия на клетки, сохраняемые при различных температурах. Показано высокое криозащитное действие НИЛИ на спермоциты, позволяющее повысить живучесть оттаянных сперматозоидов в 2 раза по сравнению с традиционно используемой технологией криоконсервации и в 1,5 раза по сравнению с применением магнитного поля (Ковалев М.Г., 1988), электрического поля (Марюшенко А.В., 1985; Курзин Н.Н., 1999) и ультразвука (Степанов А.С., 1991).

Технология лазерно-криогенной консервации заключается в следующем:

1. Предварительный контроль качества спермы по показателям подвижности и концентрации с применением методик экспресс-диагностики спермы, описанных выше;
2. Однократное лазерное воздействие с установленными оптимальными параметрами воздействия на биосреду перед эквilibрацией;
3. Глубокое замораживание согласно стандартной методике криоконсервации спермы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

♦ В результате обобщения научно-технической информации и анализа состояния проблемы показана актуальность и возможность разработки автоматизированных средств анализа качества спермы человека и животных.

♦ Разработан алгоритм траекторной обработки и специализированное программное обеспечение для реализации метода обработки изображений применительно к объекту исследования.

♦ Теоретически обосновано использование метода светорассеяния на ансамбле частиц (лазерного нефелометрического метода) для диагностики подвижности и концентрации исследуемых объектов в пробе малого объема.

- ♦ Экспериментально определена взаимосвязь изменения характеристик светорассеяния с параметрами состояния объекта исследования (концентрацией и подвижностью). Разработана технология определения концентрации клеток нефелометрическим методом, позволяющая повысить точность на 30%.
- ♦ Рассчитан, создан и прошел экспериментальную апробацию макетный образец лазерного автоматизированного комплекса экспресс-диагностики, особенностью которого является наличие двух автоматизированных систем, снабженных специализированным программным обеспечением.
- ♦ Экспериментально определены пороговые дозы, дозы стимулирующего и угнетающего действия НИЛИ с длинами волн $\lambda_1=0,63\text{мкм}$, $\lambda_2=0,89\text{мкм}$ применительно к объекту исследования.
- ♦ Для обеспечения максимальной выживаемости репродуктивных клеток экспериментально определены параметры лазерной обработки при различных режимах их хранения (нормотермия при 38°C , гипертермия при 45°C , гипотоническое хранение при 18°C).
- ♦ Показана возможность и перспективность использования лазерного излучения с $\lambda_1=0,63\text{мкм}$ и $\lambda_2=0,89\text{мкм}$ в качестве дополнительного криопротективного фактора. Установлено, что максимальным криозащитным действием обладает лазерное излучение с $\lambda_2=0,89\text{мкм}$ при $W_{\text{обл}} = 5,7\text{мДж/см}^2$, $T_{\text{зам}} = 30\text{ с}$.
- ♦ Разработана технология обработки излучением He-Ne и GaAs лазеров ($\lambda_1=0,63\text{мкм}$, $\lambda_2=0,89\text{мкм}$), позволяющая повысить криоустойчивость клеток к повреждающим факторам в 1,5 и 2 раза соответственно по отношению к контролю.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Григорьянц А.Г., Пырикова С.И., Загидуллин Р.Ш. Определение концентрации нативных спермиев лазерным нефелометрическим методом // Медико-технические технологии на страже здоровья: Тез. докл. 5-й Междун. конф., Шарм эль шейх, 4-11 октября 2003 г.- М., 2003.-С. 95-96.
2. Загидуллин Р.Ш., Пырикова С.И., Иванов Ю.В. Измерение концентрации сперматозоидов лазерным нефелометрическим методом // Радиоэлектроника в медицинской диагностике: Тез. докл. 2-й Междун. конф. - г. Москва, 1997. – С.123-124.
3. Загидуллин Р.Ш., Пырикова С.И., Нефелометр – на базе PC // Научные и инженерные приложения в образовательной среде LABVIEW: Труды междун. конф.- Москва, 2003.-С. 288-290.
4. Пырикова С.И., Гаткин Е.Я., Брыдун А.В. Биостимуляция семенной жидкости человека энергией лазерного луча // Квантовая медицина: Тез. докл. I конф. – Москва, 2000. - С. 114.
5. Пырикова С.И. Иванов Ю.В., Беркингейм М.Л. Воздействие лазерного излучения с длиной волны 0,63 мкм на семенную жидкость человека// Применение лазеров в науке и технике: материалы межреспубликанского заочного научно-технического семинара - Иркутск, 1996.- Вып. 8.- С.13-16.
6. Воздействие лазерного излучения на семенную жидкость человека/ С.И. Пырикова, Ю.В. Иванов, М.Л. Беркингейм и др. // Клиническая лабораторная диагностика -1998.- №5. – С.15-17.
7. Пырикова С.И., Жуковская Н.В., Ерохин А.С. Воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения на криоустойчивость семенной жидкости // Радиоэлектроника в медицинской диагностике: Тез. докл. 2-й Междун. конф.- Москва, 1997.-С.100-102.

8. Пырикова С.И., Загидуллин Р.Ш. Программно- аппаратный комплекс оценки подвижности биологических клеток методом обработки изображений: Тез. докл.2-й Междун. конф.-СПб, 2003.-С. 95-97.
9. Пырикова С.И. Низкоинтенсивное лазерное излучение в оптической диагностике биологических жидких сред // Лазеры в науке и технике –2003: Тез. докл.XIV Междун. конф.-Сочи, 2003.- С.121-123.
- 10.Пырикова С.И. Исследование протективного действия лазерного излучения на функциональные свойства репродуктивных клеток, сохраняемых в охлажденном и глубокомороженном состоянии // Лазеры в науке и технике –2003: Тез. докл.XIV Междун. конф. -Сочи, 2003.- С.123-125.
- 11.Пырикова С.И. Автоматизация стандартного лабораторного исследования эякулята человека // Измерительные информационные технологии в охране здоровья –2003: Тез. докл. XIV Междун. конф.-СПб, 2003.- С.78-80.
- 12.Загидуллин Р.Ш., Пырикова С.И. Нефелометр – на базе PC // Научные и инженерные приложения в образовательной среде LABVIEW. Труды междун. конф.-Москва, 2003.-С. 95-97.
- 13.Пырикова С.И. Автоматизация и стандартизация контроля качества жидких биологических сред методом оптической диагностики // Пища, экология, человек: Материалы 5-ой МНТК.- Москва, 2003.-С.75-77.
- 14.Пырикова С.И. Григорьянц А.Г. Низкоинтенсивное лазерное излучение – инструмент зондирования и стимуляции биологически подвижных объектов сложной формы // Технологии живых систем. Материалы МНТК.- Москва, 2003.- С.131-133.



Сдано в печать 26.04.04
Формат 60х90/16 Объем 1 печ.л
Тираж 100 экз. Зак. № 8

Отпечатано в ООО "Эдэль-М"
105005, г.Москва, ул.Бауманская д.43/1