

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Саратовский национальный исследовательский  
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

На правах рукописи

Тимошина Полина Александровна

МОНИТОРИНГ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ КРОВИ МЕТОДОМ СПЕКЛ-  
КОНТРАСТНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ МОДЕЛЬНЫХ  
ПАТОЛОГИЙ НА ЖИВОТНЫХ

03.01.02 - БИОФИЗИКА

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель  
д.ф.-м.н., профессор В.В. Тучин

Саратов – 2016

## Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Оптические методы исследования динамики кровотока .....	12
Глава 2 Материалы и методы.....	31
2.1 Методика измерений .....	31
2.2 Экспериментальная установка .....	33
2.3 Калибровка экспериментальной установки с использованием фантома биологической ткани .....	34
2.4 Статистическая обработка данных .....	37
2.5 Описание экспериментальных биологических моделей .....	38
2.5.1 Стресс-индуцированный инсульт головного мозга.....	38
2.5.2 Панкреонекроз .....	39
2.5.3 Диабет.....	40
Глава 3. Исследование церебральной микроциркуляции крови в условиях развития стресс-индуцированного инсульта головного мозга у лабораторных животных.....	43
3.1 Введение .....	43
3.2 Материалы и методы .....	45
3.3 Результаты и их обсуждение .....	47
3.4 Выводы .....	50
Глава 4. Исследование микроциркуляции крови в условиях моделирования ишемии-реперфузии в тканях поджелудочной железы лабораторных животных .....	51
4.1 Введение .....	51
4.2 Материалы и методы .....	52
4.3 Результаты и их обсуждение .....	57
4.4 Выводы .....	64
Глава 5. Оценка влияния оптических просветляющих агентов на микроциркуляцию крови в тканях лабораторных животных.....	65
5.1 Введение .....	65
5.2 Материалы и методы .....	67
5.3 Результаты и их обсуждение .....	68
5.4 Выводы .....	71

Глава 6. Исследование микроциркуляции крови в условиях развития аллоксанового диабета у лабораторных животных .....	73
6.1 Введение .....	73
6.2 Материалы и методы .....	74
6.3 Результаты и обсуждение .....	77
6.4 Выводы .....	80
Заключение .....	81
Список литературы: .....	86

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

**ЛДФ** - лазерная доплеровская флоуметрия

**ДВС** - диффузионная волновая спектроскопия

**ИМ** - интравитальной микроскопии

**ДОКТ** - доплеровская оптическая когерентная томография

**ФЭУ** - фотоэлектронный умножитель

**ИТЦМ** - интравитальная трансмиссионная цифровая микроскопия

**ИФЦМ** - интравитальная флуоресцентная цифровая микроскопия

**ЛДА** - лазерная доплеровская анемометрия

**ОКТ** - оптическая когерентная томография

**АИЧ** - анемометрия по изображениям частиц

**АКЛАС** - Анализ Контраста Лазерных спеклов

**ЛСВ** - лазерная спекл-визуализация

**ПСВ** - Пространственная спекл-визуализация

**ВСВ** - временная спекл-визуализация

## Введение

### Актуальность работы

Мониторинг состояния микроциркуляции является одной из важных проблем современной медицинской диагностики. Это связано с тем, что многие заболевания, такие как заболевания сердечно-сосудистой системы, атеросклероз, сахарный диабет, хроническая венозная недостаточность и другие, вызывают функциональные и морфологические изменения в микроциркуляторном русле. Повреждения на уровне микроциркуляции/макроциркуляции составляют основу развития стресс-индуцированных заболеваний, таких как гастроинтестинальные геморрагии, артериальная гипертония, геморрагический панкреатит, инфаркт миокарда, инсульты и т.д. [1-7]. В настоящее время изучение системы микроциркуляции представляет собой сочетание традиционных и новых морфологических и функциональных методов анализа. Применяемые морфологами методы изучения микроциркуляторного русла на аутопсийном и биопсийном материалах имеют ряд недостатков, связанных с определением состояния интрамуральных сосудов преимущественно на поперечных и косых срезах, а также большими трудностями при исследовании одновременно сосудов гемо- и лимфоциркуляции. Морфологические исследования микроциркуляции, проводящиеся в большинстве случаев биопсийным методом, отражают состояние микроциркуляции только в конкретной точке и не могут отражать динамические процессы.

В настоящее время к наиболее эффективным диагностическим методам определения основных параметров микроциркуляции относятся методы, основанные на динамическом рассеянии света (методы лазерной доплеровской флоуметрии [7-10], интравитальная микроскопия [11], диффузионно-волновая спектроскопия [1,12], спекл-визуализация [12-15] и другие), а также методы, основанные на принципах оптической когерентной томографии. Многие из перечисленных методов имеют ряд существенных ограничений, например, недостаточно высокое пространственное и временное разрешение,

ограниченность информации о потоке частиц, особенно при сканировании по глубине биоткани, некоторая инвазивность измерений и др.

Совмещение методов динамического рассеяния света (ДРС) и микроскопии позволяет получить высокоэффективный инструмент для определения параметров микроциркуляции. Подобные попытки начали реализовываться с начала 70-х годов прошлого века [8-10,16]. В настоящее время методы статистического и корреляционного анализа динамических спеклов широко применяются в материаловедении, медицине, биологии, химии и других областях современной науки. Данные методы, предполагающие анализ флуктуационной составляющей интенсивности лазерного излучения, рассеянного зондируемым объектом, базируются на совокупности фундаментальных и прикладных результатов, полученных в последние десятилетия в статистической оптике и оптике случайно-неоднородных сред [17]. Формируемые при многократном рассеянии лазерного излучения спекл-поля обладают высокой чувствительностью к изменениям конфигурации рассеивающих центров в зондируемой области, обусловленным нестационарной особенностью исследуемой среды. Несмотря на значительный успех, достигнутый к настоящему времени в части развития фундаментальных и прикладных аспектов спекл-корреляционного зондирования, ряд вопросов, имеющих принципиальное значение с точки зрения расширения области применимости данных методов, изучен в недостаточной степени. Решение данных проблем и вопросов актуально, что и определило цель настоящей диссертационной работы.

### **Цель и задачи исследований**

Целью диссертационной работы является исследование эффективности применения метода лазерной спекл-контрастной визуализации для анализа динамики кровотока *in vivo* при решении ряда практических задач в медицине.

Для достижения цели диссертационной работы были решены следующие **задачи:**

- анализ основ спекл-контрастных измерений параметров кровотока с последующей отработкой технологии мониторинга этих параметров и реализующего ее устройства;
- калибровка метода спекл-контрастной визуализации с помощью фантома, моделирующего микроциркуляцию крови в биологической ткани с оптическими свойствами, близкими к реальным тканям;
- оценка влияния оптических просветляющих агентов на микроциркуляцию крови в тканях лабораторных животных;
- исследование изменения микроциркуляции крови в условиях моделирования аллоксанового диабета у лабораторных животных;
- исследование микроциркуляции крови в условиях развития стресс-индуцированного инсульта головного мозга у лабораторных животных;
- оценка возможности использования методов лазерной спекл-визуализации для мониторинга микроциркуляции крови в условиях моделирования ишемии-реперфузии тканей поджелудочной железы лабораторных животных.

### **Научная новизна работы:**

Калибровка метода спекл-контрастной визуализации с помощью фантома моделирующего микроциркуляцию крови в биоткани с оптическими свойствами, близкими к реальным тканям, позволяет рассчитать пространственное распределение контраста и оценить зависимость контраста спекл - изображения относительно заданных значений скоростей, что позволяет перейти от качественного анализа изменений микроциркуляции крови к количественному, а именно к приведенной скорости в фантоме. Предлагаемая методика позволяет количественно оценить изменения микроциркуляции крови во внутренних органах лабораторных животных на ранних стадиях развития патологий.

Впервые было изучено влияние иммерсионных жидкостей, а именно многокомпонентного раствора фруктозы (фруктоза, вода и спирт, 50:20:30 %) в режиме реального времени на микроциркуляцию крови в сосудах внутренних

органов лабораторных животных, а также влияние 100% раствора Омнипак-300 (рентгено-контрастное вещество Йогексол) и водного 70% раствора Омнипак-300 на микроциркуляцию крови в сосудах поджелудочной железы лабораторных животных в условиях развития диабета.

Впервые методика спекл-контрастной визуализации была применена к исследованию микроциркуляции крови в сосудах поджелудочной железы в условиях развития экспериментальной модели ишемии-реперфузии.

Метод спекл-контрастной визуализации продемонстрировал эффективность диагностики преинсультных изменений церебральной микроциркуляции в условиях развития стресс-индуцированного инсульта.

### **Положения и результаты, выносимые на защиту:**

1. Мониторинг состояния микроциркуляции крови в коре головного мозга, обусловленного патологическими изменениями в коре при развитии стресс-индуцированного инсульта или при воздействии медицинских препаратов, продемонстрировал эффективность диагностики преинсультных изменений церебральной микроциркуляции методом спекл-контрастной визуализации.
2. При создании временной неполной (50% кровотока) локальной ишемии путем компрессии магистральных сосудов поджелудочной железы в течение 5 мин с помощью спекл-контрастной визуализации была выявлена реактивная гиперемия и обратимые клинические и морфологические изменения. Реактивная гиперемия отсутствовала при неполной компрессии в течение 20 мин, что клинически и морфологически соответствовало развитию панкреатита, не достигающего степени панкреонекроза.
3. Метод спекл-контрастной визуализации позволяет оценивать в режиме реального времени влияние иммерсионных жидкостей на микроциркуляцию крови в сосудах внутренних органов лабораторных животных; при воздействии раствора фруктозы (фруктоза, вода и спирт, 50:20:30%) скорость кровотока снижается без последующего восстановления в течение 20 мин наблюдения.

4. Мониторинг изменения микроциркуляции крови в условиях развития аллоксанового диабета показал, что скорость кровотока в сосудах поджелудочной железы диабетической группы животных выше скорости кровотока в сосудах здоровых животных. Рентгено-контрастный раствор Омнипак-300 (активное вещество йогексол) и его водный 70% раствор не влияют на микроциркуляцию крови в сосудах внутренних органов здоровых животных, при этом вызывают увеличение скорости кровотока у диабетической группы животных в течение первых минут аппликации с последующим восстановлением прежней скорости.

#### **Научная и практическая значимость:**

1. Результаты диссертационной работы развивают и дополняют теоретические и экспериментальные данные по эффективности применения спекл-контрастной визуализации полного поля для мониторинга динамики кровотока в исследованиях *in vivo*.
2. Метод применим для измерения скорости кровотока в режиме реального времени и является перспективным методом для использования в исследованиях влияния оптических иммерсионных просветляющих агентов на микроциркуляцию крови поверхностных слоев биологических тканей.
3. Метод может быть применим для контактной оценки состояния микроциркуляции внутренних органов в трансоперационной и экстренной хирургии.
4. Одним из возможных применений метода является мониторинг мозгового кровообращения мелких животных или новорожденных без трепанации черепа при использовании метода оптического просветления кожи и твердых тканей головы с помощью просветляющих агентов.

#### **Апробация работы:**

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 10 российских и международных научных конференциях:

Saratov Local Cluster Meeting: Clinical Studies in Biophotonics: Problems and Ethical Issues (Saratov, Russia, 2011); Saratov Fall Meeting 2011-2016 – International School

for Young Scientist and Students on Optics, Laser Physics & Medicine (Saratov, Russia, 2011); IX Всероссийская молодежная Самарская конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике (Самара, Россия, 2011); 11th International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine (Wuhan, China, 2013); I-IV International Symposium on Optics and Biophotonics (Saratov, 2013-2016); BIGGS-2014, Biophotonics and Imaging Graduate Summer School (Ireland, Galway, 2014); XII Всероссийская молодежная Самарская конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике (Самара, Россия, 2014); Взаимодействие сверхвысокочастотного, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами: Всероссийская научная школа-семинар (Саратов, 2015-2016).

### **Публикации:**

По теме диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 3 статьи в журналах из перечня ВАК.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения и списка литературы. Объем диссертации составляет 102 страницы, включая список литературы, 28 рисунков. Список цитированной литературы содержит 155 наименований, включая публикации автора по теме диссертации.

### **Личный вклад автора диссертации состоит в:**

- разработке экспериментальной установки, проведении калибровки с использованием фантома моделирующего микроциркуляцию, совместно с к.ф.-м.н. Виленским М.А.; фантом был разработан к.ф.-м.н. Лычаговым В.В.;
- разработке методики проведения экспериментов по оценке влияния просветляющих агентов на микроциркуляцию крови, осуществлении экспериментальных исследований по оценке микроциркуляции крови в условиях развития стресс-индуцированного инсульта головного мозга у лабораторных животных совместно с заведующей кафедрой физиологии человека и животных, биологического факультета, ФГБОУ ВО

«Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», д.б.н. Семячкиной-Глушковой О.В.;

- разработке методики проведения экспериментов по оценке влияния просветляющих агентов на микроциркуляцию крови, осуществлении экспериментальных исследований по оценке микроциркуляции крови в условиях развития экспериментальной модели ишемии-реперфузии в тканях поджелудочной железы, диабета у лабораторных животных совместно с профессором кафедры хирургии и онкологии ФПК и ППС, д.м.н. Александровым Д.А.;
- проведении статистической и компьютерной обработки экспериментальных данных;
- обсуждении экспериментальных результатов и объяснении наблюдаемых эффектов.

Разработка программы в среде LabVIEW 8.5 (National Instruments, США) для проведения измерений и расчета контраста спекл-изображений была выполнена Агафоновым Д.Н.

Формулировка темы диссертационной работы, постановка исследовательских задач, обсуждение результатов, оказание помощи в подготовке статей к публикации и обсуждение текста диссертационной работы, ее основных положений и выводов, осуществлялась заведующим кафедрой оптики и биофотоники, профессором физического факультета, ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», д.ф.-м.н. Тучиным В.В.- руководителем диссертационной работы.

## Глава 1. Оптические методы исследования динамики кровотока

В последнее время одним из наиболее развивающихся направлений в медицине является внедрение оптических методов диагностики биологических объектов в клиническую практику. Физической основой оптических диагностических методов являются различные эффекты, проявляющиеся при взаимодействии электромагнитного излучения видимого и ближнего инфракрасного диапазона со случайно-неоднородными средами с характерными размерами неоднородностей, сопоставимыми с длиной волны зондирующего излучения [17]. Наряду с этим, также остаются наиболее популярными в медицинском использовании не оптические методы такие, как реография [18-20], ультразвуковое исследование [21-23]. В данной главе будет проведен краткий обзор существующих оптических методов диагностики микроциркуляции крови использующихся в лабораторной и клинической практике.

Абсолютная скорость кровотока в макро- и микрососудах является одной из наиболее важных функциональных характеристик сердечно-сосудистой системы. В частности, оценка состояния кровотока имеет решающее значение для ранней диагностики глаукомы и диабетической ретинопатии [24-27], а также для понимания локальных механизмов регуляции кровотока в органах и тканях при заболевании инсультом [28] или ишемии миокарда. Только абсолютная скорость кровотока может рассматриваться как характеристика нормального и патологического состояния организма и как количественная мера транспортных и обменных функций микроциркуляции. Практическое значение скорости кровотока трудно измерить неинвазивно, поскольку большинство оптических методов диагностики микроциркуляции крови, такие как лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ), лазерная спекл-визуализация [29,30] и флуоресцентная [31,32], оптическая когерентная ангиография [33,34] предназначены для

визуализации кровеносных сосудов и для обнаружения относительных изменений кровотока.

Особую популярность в медицинской практике имеет **фотоплетизмография**, данный метод основан на регистрации оптической плотности исследуемой ткани. Исследуемый участок ткани освещается инфракрасным светом, который после рассеивания (или отражения), попадает на фотодетектор. Интенсивность света, отраженного или рассеянного исследуемым участком ткани, определяется количеством содержащейся в нем крови. В общеклинической практике наибольшее распространение получила методика измерения периферического капиллярного кровотока с помощью пальцевой фотоплетизмографии. Использование пальцевой фотоплетизмографии имеет большую диагностическую ценность в оценке проходимости периферических сосудов, быстрой и точной оценки локального капиллярного кровотока [35,36].

**Лазерная доплеровская анемометрия (ЛДА)** [24-27,37-40], способна проводить количественные измерения скорости потока в кровеносных сосудах, принцип которой состоит в регистрации отраженного света от объекта, вследствие эффекта Доплера частота излучения, попадающего на приемник, будет отличаться от частоты излучения неподвижного источника на некоторую величину, пропорциональную скорости движения объекта относительно источника и приемника. Фотоприемник преобразует световое излучение в переменный электрический сигнал, величина которого прямо пропорциональна интенсивности светового излучения на его поверхности в каждый момент времени. Таким образом, частота электрического сигнала фотоприемника оказывается равной величине доплеровского сдвига частоты и прямо пропорциональной скорости движения объекта. Также доплеровская оптическая когерентная томография (ДОКТ) [41-43] может проводить количественные измерения скорости кровотока, таким образом, эти методы могут быть использованы для определения абсолютной скорости кровотока.

Абсолютная скорость кровотока в самых мелких капиллярах менее 10 мкм в диаметре, также может быть измерена с использованием **интравитальной**

**микроскопии (ИМ).** В принципе, существует очень небольшая разница между обычной микроскопией и ИМ. На практике, однако, существуют огромные различия [44-46].

Во-первых, установка для ИМ оптимизирована для работы *in vivo* и визуализации живых объектов (например, лабораторные животные), а не фиксированной ткани или клеточных структур. Следующим важным отличием является способ получения изображения. В большинстве случаев, мониторинг физиологических процессов ИМ системами происходит в режиме реального времени, в отличие от образцов замороженной ткани в обычной микроскопии. Это требует использования быстрых, чувствительных детекторов, таких как ПЗС-камеры, КМОП камеры, электронный умножитель ПЗС или фотоэлектронный умножитель (ФЭУ). Данная технология является золотым стандартом для оценки микроциркуляции [47-49], которая широко используется в небольших исследованиях на животных для изучения микроциркуляции *in vivo* с высоким пространственным разрешением. Интравитальная микроскопия может дать количественную оценку сосудов: диаметр, длина, плотность, проницаемость и скорость кровотока. Также существуют различные модификации ИМ, например **интравитальная трансмиссионная цифровая микроскопия (ИТЦМ)**, использующая поглощающие и рассеивающие явления в просвечивающих схемах или на отражение. ИТЦМ основана на вертикальном или перевернутом микроскопе обеспечивает следующие функции [50, 51]:

- визуализация в режиме реального времени относительно больших структур, таких как лимфатические и кровеносные сосуды с относительно низким увеличением (от 4x до 10x);
- количественная оценка диаметра кровеносных и лимфатических сосудов, параметры лимфатических фазных сокращений и активность клапана;
- измерение скорости клеток в потоке с помощью видеозаписи движения клеток (ВДК);
- анализ одноклеточных подвижных клеток при большом увеличении (40x, 60x, и 100x, погруженных в воду), включая время изменения формы клеток

(например, деформируемость), в режиме реального времени отслеживать циркулирующие клетки, и взаимодействия клеток (например, агрегация и адгезия).

Еще одной модификацией ИМ является **интравитальная флуоресцентная цифровая микроскопия (ИФЦМ)** [52-54].

Применение ИФЦМ крови и лимфатического потока включает в себя:

- картирование кровеносных (ангиография) и лимфатических (лимфография) сосудов с использованием флуоресцентных красителей и квантовых точек (КТ);
- обнаружение и подсчет клеток, циркулирующих в крови и лимфе, и измерения клеток в клеточных взаимодействиях *in vivo* путем мечения клеток, различными флуоресцентными маркерами. Выделенные клетки могут быть животного или человеческого происхождения, или инфекционных патогенов, включая циркулирующие опухолевые клетки и т.д.;
- изучение физиологических процессов на клеточном уровне, в животных, с использованием специальных флуоресцентных индикаторов, чувствительных к изменениям микросреды;
- изучение анатомической структуры и функции кровеносных или лимфатических сосудов (например, ангиогенез);
- мониторинг кровеносной и лимфатической реакции на терапию, в том числе влияние фармакологических препаратов и терапевтического лазерного облучения.

Несмотря на многообещающие способности ИФЦМ высокое разрешение изображения отдельных клеток, могут быть получены в относительно прозрачных моделях животных (например, брыжейка лягушки, мыши и крысы) [55].

Также, интравитальная микроскопия это инвазивные процедуры, и глубина визуализации ограничена до нескольких сотен микрон в сильно рассеивающих биологических средах. Кроме того, размер и гибкость инструментов для

клинических и научных исследований может быть также ограничивающим фактором.

Помимо выше перечисленных методов существуют и другие методы визуализации кровотока, например **видеокапилляроскопия** [48,56,57] - это неинвазивный метод исследования капилляров крови. На основании состояния капилляров делаются выводы о состоянии микроциркуляции человека. В сочетании с компьютерными технологиями типичная установка видеокапилляроскопа обеспечивает высокую точность изображения кожных капилляров. В клинической диагностике капилляроскопия широко используется в определенных местах тела, например, участок кожи в области ногтевого валика человека, пигментная площадь пораженной кожи, в общем, места, где капилляры проходят достаточно близко к поверхности кожи. Во время визуализации для увеличения прозрачности тканей, используют просветляющие агенты. В ходе исследования рассчитываются и анализируются такие показатели, как: плотность капиллярной сети, размеры отделов капилляра, состояние эндотелиального барьера, размер периваскулярной зоны, скорость и ускорение кровотока по отделам, перфузионный баланс, количество эритроцитарных, тромбоцитарных агрегатов в составе крови и др. [58,59]. Тем не менее, в некоторых видах сильно пигментированной кожи, пигмент меланин поглощает свет очень сильно в видимой области спектра и делает применение капилляроскопии затруднительным. В связи с этим, используют флуоресцентные маркеры, но такой подход делает этот метод, в определенной степени инвазивным. Кроме того, флуоресцентные маркеры могут вызвать тошноту, рвоту, зуд, одышку, а также дополнительные неблагоприятные аллергические реакции [60]. Микроциркуляция в области ногтевого валика человека является чрезвычайно чувствительной к внешним температурным воздействиям и сосудосужающим средствам [61]. Таким образом, видеокапилляроскопия в области ногтевого валика не может быть надежным показателем состояния микроциркуляции в других частях тела, особенно у тяжелобольных пациентов. Существуют различные подходы, основанные на данном методе, например, измерение скорости клеток в потоке с

помощью видеозаписи движения клеток, называемом **анемометрия по изображениям частиц (АИЧ)** (в англоязычной литературе именуется, как *microparticle image velocimetry* -  $\mu$ PIV). Система автоматически отслеживает отобранные частицы в потоке жидкости с помощью цифровой обработки изображений, данная технология широко используется в струйной технике для измерения жидких и газовых скоростей потока в рамках различных приложений [62,63]. Данная технология была применена для изучения микроциркуляции крови или ее “фантомов” в аорте и их моделей [64,65], и мониторинга кровообращения в мелких кровеносных сосудах человека и животных [66].

Основная трудность капиллярной визуализации кровотока связана с произвольными движениями живого объекта, что приводит к случайным смещениям капиллярного изображения по полю зрения микроскопа [67].

Эти смещения совместно с регулярным движением клеток крови, вносят значительную погрешность при измерении скорости капиллярного кровотока. Для того, чтобы свести к минимуму эффект произвольного движения, может быть использовано либо программное обеспечение или метод стабилизации изображения аппаратных средств. Когда время экспозиции достаточно мало, использование стабилизации изображения программным обеспечением достаточно, чтобы исключить влияние произвольных движений объекта в пределах плоскости объекта. Перемещения вдоль оптической оси микроскопа вызывают расфокусировку изображения, таким образом, они могут быть обработаны только устройством аппаратных средств автоматической фокусировки. Эффект произвольных движений по измерениям капиллярной скорости был продемонстрирован на капиллярной петле ногтевого ложа человека [67].

Оптические методы являются единственным способом для бесконтактного и неинвазивного обнаружения и определения характеристик кровотока. Однако количественные измерения скорости кровотока и объемной скорости потока по-прежнему остаются сложной задачей из-за высокого рассеяния света в ткани. Но, например, **доплеровская ОКТ** обеспечивает эффективное подавление

многократно рассеянного света и обеспечивает близко к максимально возможной глубину зондирования и способен измерять компоненты скорости. Данный подход ведет свое начало от методики, получившей название **оптическая когерентная томография (ОКТ)**. В основе метода, используется регистрация интерференционной составляющей оптического сигнала, формируемого при смещении частично когерентного зондирующего излучения, рассеянного объектом, с опорным частично когерентным пучком [17]. Классическая схема ОКТ системы представляет собой сканирующий интерферометр Майкельсона с частично когерентным источником излучения. Возвратно-поступательное движение зеркала в опорном плече интерферометра позволяет осуществлять сканирование объекта по глубине, поскольку амплитуда детектируемого интерференционного сигнала при сканировании зависит от отражательной способности объекта на глубине, определяемой условием нулевой разности хода объектного и опорного пучков. На практике обычно применяются волоконно-оптические интерферометры на основе одномодовых световодов и суперлюминесцентных диодов в качестве источников излучения [17]. В случае выраженной слоистой структуры зондируемого сигнала, как правило, характерной для большинства биотканей, границам между слоями будут соответствовать максимумы амплитуды интерференционной составляющей детектируемого сигнала. По величинам задержек этих максимумов относительно начала сканирования может быть определена глубина залегания каждого слоя, а по амплитуде сигнала в максимуме – значение отражательной способности каждой границы, определяемое различиями в оптических характеристиках (прежде всего эффективных показателей преломления) для соседних слоев. Таким образом, в одном цикле сканирования может быть получена информация о распределении оптических характеристик по глубине для заданной малой области в пределах анализируемого. С помощью ОКТ систем может быть осуществлена визуализация структуры биотканей с пространственным разрешением по глубине от 1 до 15 мкм (в зависимости от используемых источников и приемников излучения и элементов оптической схемы интерферометра), что на 1-2 порядка

выше, чем в случае использования ультразвуковых систем визуализации. Как правило, современные ОКТ системы позволяют получать изображения в режиме, близком к режиму реального времени [17]. Глубина зондирования ограничивается затуханием сигнала вследствие поглощения и многократного рассеяния зондирующего излучения и, как правило, для большинства биологических тканей (за исключением тканей глаза) не превышает 1 – 2 мм. Несмотря на данное ограничение, уникальные возможности, обеспечиваемые данным оптическим методом зондирования, обуславливают его широкое использование в настоящее время в различных областях науки и техники, в том числе и для диагностических приложений в медицине. Успехи, достигнутые в использовании ОКТ применительно к морфологическому анализу биотканей, стимулировали дальнейшее развитие метода; в результате были разработаны некоторые модификации ОКТ с дополнительными функциональными возможностями [68], такие как **Доплеровская ОКТ**. Впервые данный метод был рассмотрен в [69], где продемонстрирована возможность измерения скорости потоков жидкости в модельных средах с разрешением 5 мкм и погрешностью определения скорости 7 %. Физические основы зондирования нестационарных рассеивающих сред с динамикой рассеивающих центров, существенно различающейся на разных глубинах, с использованием частично когерентного излучения рассматривались в работе [70]. В доплеровской оптической когерентной томографии (ДОКТ) значение случайной составляющей погрешности измерения скорости потока и, соответственно, минимальное значение скорости потока, измеряемое с помощью ДОКТ системы, определяются флуктуациями частоты источника зондирующего излучения, динамическим спекл-шумом, обусловленным рассеянием зондирующего излучения в нестационарных случайно-неоднородных средах, случайной составляющей движения рассеивающих центров в потоке (броуновским движением), а также паразитной интерференцией в оптической схеме ОКТ системы. Определение параметров потоков биологических жидкостей в рассеивающих средах (биотканях) является одной из важнейших диагностических задач в медицине.

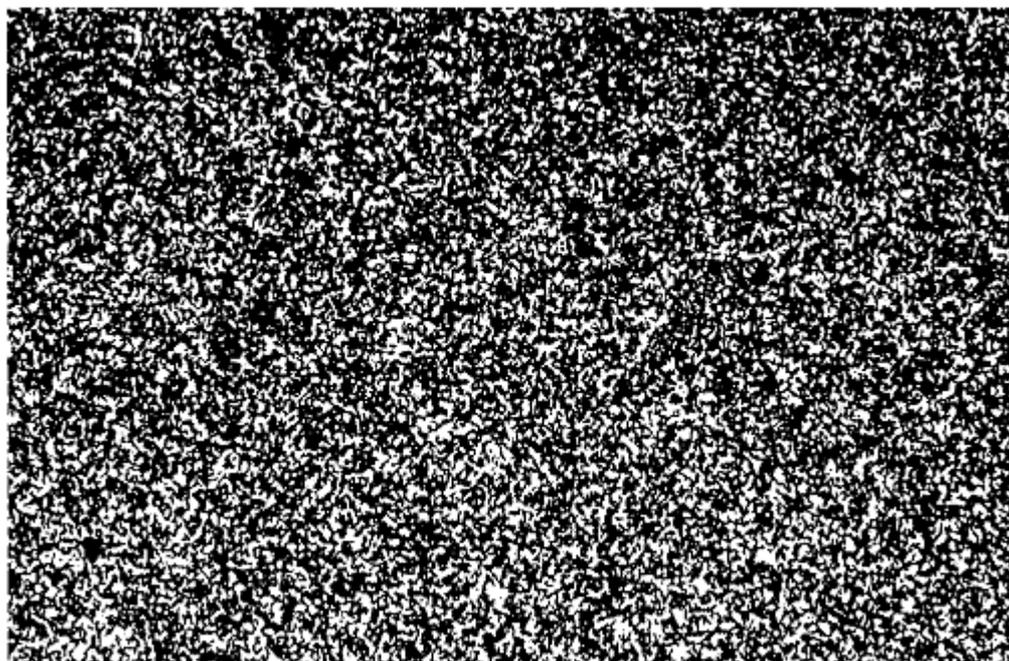
Информация о микроциркуляции крови в сетке капилляров в поверхностных слоях биотканей или о потоках крови в кровеносных сосудах важна, например, с точки зрения диагностики ожоговых поражений, а также анализа результатов лазерной терапии “портвейновых пятен” или фотодинамической терапии [17]. В частности, ДОКТ измерения скорости кровотока в брыжейке крысы *in vivo* применялись для фармацевтических исследований, а также для оценки эффективности фотодинамической терапии. В ходе данных исследований анализировались изменения скорости потока крови после применения вазоактивных препаратов и фотодинамического воздействия. Установлено, что скорость потока изменяется от 4000 мкм/с до 3000 мкм/с в центральной части артерии и от 2000 мкм/с до 1000 мкм/с в центральной части вены после внедрения в кровь нитроглицерина.

Стоит также отметить еще один метод, в основу которого входит использование эффекта Доплера, а именно сдвиг частоты, который возникает в момент рассеяния света, движущимися эритроцитами - **Лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ)**. ЛДФ это методика, которая получила наиболее известное применение для оценки перфузии микрососудов крови. Этот фундаментальный принцип представляет собой основы теории ЛДФ. Другими словами, при освещении образца ткани монохромным светом и обработке частотного распределения света обратного рассеяния может быть достигнута оценка перфузии крови. Первые экспериментальные исследования с использованием ЛДФ были проведены в 1970-х годах [71,72]. В начале 1980-х годов в базовый мониторинг ЛДФ была введена волоконно-оптическая техника. Таким образом, суть данного метода заключается в том, что монохроматический пучок света малой интенсивности, излучаемый лазерным диодом, встроенным в доплеровский лазерный флоуметр, проходит по гибкому световоду и через наконечник датчика освещает исследуемую ткань. В ткани свет рассеивается отражающими частичками. Часть света отражается обратно и по-приемному световоду попадает на внутренний фотоприемник аппарата. В соответствии с эффектом Доплера, только движущиеся частицы (главным образом эритроциты)

приводят к частотному сдвигу. Спектр принятого сигнала обрабатывается в аппарате в соответствии с моделью для расчета спектра мощности рассеянного света, полученной Боннером для такого типа отражения, и рассчитывается объем потока (мл/мин/100 г ткани). Таким образом, в основе метода ЛДФ лежит измерение доплеровской компоненты в спектре отраженного лазерного сигнала, рассеянного на движущихся в микрососудах форменных элементах крови. Также недостатком данного метода является то, что с помощью метода лазерной доплеровской флоуметрии, нельзя определять значения скорости движения клеток крови в капиллярах в абсолютных единицах и поскольку измерения проводятся в одной точке, то для сканирования даже небольшого участка требуется определенное время [73].

Наряду с вышеперечисленными методами также особую популярность получил метод спекл - визуализации.

В начале 1960-х годов изобретатели и первые пользователи лазера обнаружили необычное явление. Когда лазерный луч падал на матовую поверхность, например бумага или неполированные металл или стекло, они видели высокую контрастную зернистую картину, на которой было трудно сосредоточиться. Т.е. при зондировании объекта лазерным излучением можно наблюдать на изображении поверхности предмета систему светлых и темных пятен. Такую хаотическую и неупорядоченную структуру стали называть эффектом «зернистости» (Ригден и Гордон, 1962), но вскоре название «спекл» стало более популярным [15, 74]. На рисунке 1 показана типичная спекл-картина.



**Рисунок 1.** Типичное изображение спекл картины [15].

В первое время, спеклы было принято считать как ошибку, шум, помеху: например, в голографии, было предпринято много усилий направленных на уменьшение спеклов в изображениях, сформированных лазерным светом. Но к 1975 годам ученые начали разработать практические применения этому явлению. Падающий узкий лазерный луч на поверхность и рассеянный от него свет, падающий на экран на некотором расстоянии, также мог производить спеклы. Таким образом, спеклы возникают, если поверхность освещаемого объекта шероховата в масштабе оптических длин волн (а это справедливо для большинства оптических объектов) [15]. Такие объекты принято называть диффузными.

Диффузные объекты бывают диффузно пропускающими и диффузно отражающими. Если диффузно пропускающий объект освещают лазером, т.е. практически точечным источником света с высокой пространственной и временной когерентностью, то электромагнитные волны, рассеиваемые всеми точками поверхности объекта, когерентны и, следовательно, могут интерферировать [17]. Изображение такого объекта представляет очень тонкую пятнистую структуру, на которой как бы «кипит» множество светлых точек - спеклов. Такая картина образуется в результате сложения амплитуды всех

дифракционных картин, соответствующих разным точкам объекта, с учетом разности фаз, вызванной изменениями толщины диффузного объекта. На изображении возникает множество световых пятнышек, расположенных совершенно хаотически. Диаметр наименьших из них приблизительно равен диаметру дифракционной картины от объектива, формирующего изображение.

Если объект освещается параллельным пучком, падающим под некоторым углом, то при изменении положения объекта в собственной плоскости разность фаз волн, исходящих из его разных точек, не изменяется. Поэтому спекл-изображение в плоскости наблюдения тоже не меняется, оно лишь будет следовать за перемещением объекта. Если же объект повернуть в его плоскости, то относительные фазы и спекл-структура изменятся (во всех случаях, кроме случая нормального падения пучка на объект). То же самое происходит и тогда, когда мы имеем дело с диффузно отражающим объектом [15,74]. Спекл-структуры очень чувствительны к изменению положения рассеивающих центров диффузного объекта и их агрегатного состояния. Любые такие изменения сразу отражаются на структуре спеклов (ярким примером может служить «кипение» спеклов, когда в качестве объекта используется суспензия рассеивающих частиц). Основную статистическую характеристику спекл-изображения - плотность распределения интенсивности  $I$  легко можно измерить, а учитывая возможности современных средств детектирования и обработки данных, такие измерения можно проводить в режиме реального времени. Данные характеристики спеклов стали привлекательными для разработки новых подходов к визуализации биологических объектов. Появилось большое количество различных методов использующих анализ спекл структур.

Спеклы являются случайным явлением и могут быть описаны только статистически. Детальную теорию, описывающую спеклы, впервые разработал Гудман [15] в которой, важным итогом стало введение понятия контраста спеклов.

Впервые техника анализа контраста спекл-изображения была замечена в **одно экспозиционной спекл-фотографии**, которая была изобретена Фершером и

Брайерсом в 1981 году [75]. Все началось с того, что Фершер с группой ученых приступил к поиску неинвазивных методов диагностики проблем глаза. И первым предложением было использовать **двухэкспозиционную спекл-фотографию**, впервые предложенную Арчбольдом и Эннусом в 1972 году [76], данный метод основан на определении величины смещения спеклов или в плоскости изображения поверхности объекта, или в дифракционном поле. Данная технология использовалась для определения малых смещений и деформации объектов с рассеивающей поверхностью. Принцип действия данной технологии состоит в следующем, на фотопластинку или на высокоразрешающую фоточувствительную среду записываются последовательно спекл-модулированные картины в исходном и смещенном состояниях объекта. Смещение спеклов определяется по параметрам картины интерференционных полос, наблюдаемых в дифракционном гало, образующемся при освещении фрагмента спеклограммы лазерным пучком с малой апертурой. В другом варианте интерференционные полосы наблюдаются в плоскости изображения двухэкспозиционной спеклограммы, формируемой путем пространственно-частотной фильтрации в когерентно оптическом процессоре [77,78].

Но данный подход показался затруднительным для реализации поставленной задачи, и в итоге была предложена одно экспозиционная спекл-фотография. В данном подходе анализируется каждое спекл-поле, при движении рассеивающего объекта регистрируемое изображение «расплывается», и его контраст уменьшается. В соответствии с этим величина контраста проинтегрированного по времени спекл-поля может служить характеристикой усредненного смещения спеклов за определенное время экспозиции.

Таким образом, распределения скорости кровотока могут быть отображены как изменения контраста спекл-изображения [79,80]. На рисунке 2 изображены первые спекл-изображения части сетчатки глаза методом одно экспозиционной спекл-фотографии.



а)



б)

**Рисунок 2.** Изображения, полученные одно экспозиционной спекл-фотографией: первичное изображение части сетчатки (а), и его обработанная версия (б)[79].

Несмотря на успешность использования данной методики для визуализации кровотока в сосудах сетчатки глаза главным недостатком стало то, что процесс получения изображений сосудов был длительным по времени. Фотография сначала должна была быть обработана, далее полученная фотография помещалась в установку пространственной настройки фильтрации, после чего получалась уже обработанная фотография.

Позднее Брайерс и Вебстер [80,81] разработали в 1995 году цифровую версию одно экспозиционной спекл фотографии с использованием монохромных ПЗС камер, связанных с компьютером. Цифровая фотография обрабатывалась компьютером, и локальный контраст вычислялся в блоке  $N \times N$  пикселей. Данная цифровая версия была первой установкой, которая использует анализ контраста лазерных спеклов, в последствии эта методика стала так и называться **Анализ Контраста Лазерных Спеклов (АКЛАС)**, в англоязычной литературе **Laser Speckle Contrast Analysis - LASCA**.

Экспериментальная установка для данной методики проста: расходящийся лазерный свет освещает объект, находящийся под детектором ПЗС-камера (или эквивалент). Данные передаются на персональный компьютер для обработки с помощью специализированного программного обеспечения, у оператора также имеются регулируемые параметры. В оригинальной методике АКЛАС эти

параметры включали в себя время экспозиции, количество пикселей, время, в течение которого был вычислен локальный контраст, выбор цветов для кодирования контрастности. Выбор количества пикселей, для вычисления контраста спеклов очень важный момент: слишком мало пикселей и статистика будет нарушена, слишком много, и пространственное разрешение уменьшится. На практике было установлено, что квадрат размером 7x7 или 5x5 пикселей, как правило, подходит лучше всего.

Предполагая, идеальные условия для генерции лазерным светом спеклов и идеально рассеивающую поверхность можно показать, что стандартное отклонение вариаций интенсивности в спекл-структуре равна средней интенсивности [15]. На практике, спекл модели часто имеют стандартное отклонение, которое меньше средней интенсивности, и это наблюдается в виде уменьшения контраста спекл-изображения. Обычно контраст спекл-изображения определяется отношением стандартного отклонения к среднему значению интенсивностей записанных для каждого пикселя в анализируемом квадрате пикселей и данный параметр может использоваться в качестве анализируемой характеристики:

$$K(T) = \frac{\sigma(T)}{\langle I \rangle}, \quad (1)$$

где  $\sigma(T)$  и  $\langle I \rangle$  - соответственно среднеквадратичное значение пространственных флуктуаций и среднее значение интенсивности регистрируемого спекл-модулированного изображения,  $T$  - время усреднения (время экспозиции, используемое в процессе регистрации).

При регистрации усредняемых по времени спекл-модулированных изображений информация о динамике зондируемого объекта может быть получена в результате анализа зависимости контраста (получаемых спекл-модулированных изображений поверхности объекта) от времени экспозиции.

Соотношение между контрастом  $K$  и  $\tau_c$  временем корреляции зависит от того, предполагается ли распределение скоростей рассеивателей Гауссовским или

Лоренцевым. При условии, что время корреляции  $\tau_c < T$  времени экспозиции, обе модели распределения скоростей сводятся к соотношению между  $K$  и  $\tau_c$  [82,83], а именно:

$$\tau_c = 2TK^2. \quad (2)$$

Самый простой подход приводит к характерной скорости, определяемой следующим образом [83-86]:

$$v = \frac{\lambda}{2\pi\tau_c}. \quad (3)$$

В соответствии с формулами (2) и (3) могут быть выведены средние скорости потока рассеивающих частиц (например, скорость кровотока).

Помимо улучшения компьютерного оборудования и программного обеспечения, развитие техники АКЛАС продолжалось. Улучшенная версия была описана Ричардсом и Брайерсом которые реализовали камеру с переменным временем экспозиции [69,74,83]. Некоторые ученые использовали несколько иную установку АКЛАС. Например, в одной установке, обратное рассеяние света собирали без использования линзы, а путем использования одномодового волокна [87]. Кроме того, поляризатор был расположен между образцом и камерой для выбора линейно поляризованного света [88], чтобы увеличить контраст захваченных спеклов.

Данная методика обладала также рядом недостатков, основным являлось низкое пространственное разрешение, в связи с тем, что контраст анализируется для группы пикселей в одном изображении. Для того, чтобы преодолеть этот недостаток, Чэнг и др. [89] разработал методику **лазерной спекл-визуализации** (ЛСВ), в которой контраст спекл-изображения рассчитывается на основе одного пикселя во временной последовательности, а не на основе нескольких пикселей в одном изображении. ЛСВ, следовательно, является временным эквивалентом АКЛАС. Чэнг и др. [89] показали, что вычисления контраста методом ЛСВ дает, как ожидается, в пять раз более высокое пространственное разрешение по

сравнению с АКЛАС, за счет временного разрешения, конечно. Позднее Нофдарфт и Яо [90] показали, что путем регулирования параметров захвата (например, время экспозиции, временной интервал между последующим захватом), ЛСВ способен выявить структуры, которые скрыты под поверхностью. Когда контраст неоднородной поверхности находится в пределах уровня шума на фоновом изображении, эффект поверхности, по существу, удаляется из изображения. Они не испытывали ЛСВ на тканевой перфузии, но это было сделано Ли и др. [91], они представили изображения мозгового кровотока мыши через неповрежденную часть черепа путем использования временного усреднения спекл-изображения. Кроме того, они показали, что такой подход значительно улучшает визуализацию кровеносных сосудов по отношению к АКЛАС в связи с тем, что спекл-изображения на детекторе строятся из стационарной и динамической части. В итоге, значение контраста спекл-изображения в процессе ЛСВ не зависит от стационарной части, в то время как в процессе АКЛАС, неподвижная часть будет влиять на значение контрастности и понижает пространственное разрешение. Помимо вышеперечисленного, методология спекл-визуализации имеет ряд модификаций, в том числе **пространственная спекл-визуализация (ПСВ)** и **временная спекл-визуализация (ВСВ)**. При использовании ПСВ контраст спекл-изображения рассчитывается как отношение стандартного отклонения интенсивности пикселей выбранной области ( $N \times N$  площади пикселей) к средней интенсивности пикселей в этой области. ВСВ основан на регистрации временной статистики и расчета контраста спекл-изображений с использованием последовательности необработанных спекл-изображений, полученных вдоль нескольких временных точек вместо пространственного окна, т.е. контраст спекл-изображения рассчитывается как отношение стандартного отклонения интенсивности одного пикселя в разное время, и средней интенсивности этого пикселя [83,92-94]. Но самой полезной модификацией оказалось совмещение этих двух методик в одну, получившей название **пространственно-временной спекл-визуализации**. Здесь контраст спекл-изображения рассчитывается как отношение стандартного отклонения

интенсивности области пикселей в разное время, и средней интенсивности этого области. Данная методика была использована для выполнения задач поставленных в этой диссертационной работе.

Помимо выше перечисленных подходов и методов усовершенствующих методику оценки контраста спеклов Партасарати и др. [95] представил новый **мультиэкспозиционный спекл-визуализирующий** подход. Данный подход использует зависимость контраста спекл-изображения от времени экспозиции камеры и позволяет точно определять изменения потока частиц даже в присутствии статического рассеивающего слоя. Как было уже упомянуто выше, значения контраста спекл-изображения зависят от времени экспозиции камеры  $T$ . При больших значениях времени экспозиции, значение контраста спекл-изображения стремится к 0, в то время как при маленьком значении времени экспозиции значение контраста будет стремиться к 1. Области с более низкой скоростью потока приводят к спекл флуктуациями, которые медленны по сравнению с временем экспозиции и, следовательно, отсутствует размытость области в которой распространяется поток частиц спекл-изображения. По мере увеличения времени экспозиции, области с меньшим потоком частиц, такие как мелкие сосуды, появляются в спекл-изображениях. Таким образом, существует тесная связь между временем экспозиции и потоком частиц (или скоростью частиц), а также оптимальная чувствительность к различным распределениям скоростей потока частиц может быть достигнута за счет правильного выбора времени экспозиции [95]. Таким образом, в данной методике измерения потока проводятся при фиксированном времени экспозиции камеры, и в качестве источника света используется импульсный диодный лазер с длительностью импульса равной каждому значению времени экспозиции. Таким образом, при обработке данных получается набор скоростей для каждого времени экспозиции, объединение этих данных дают полное распределение скоростей в разных участках исследуемой области.

Методы лазерной спекл-визуализации в последнее время стали одним из наиболее широко принятых и популярных технологий в биологии и медицинской

практике. Благодаря многочисленным экспериментальным данным метод, и все его модификации характеризуются как перспективными для медицинских исследований. Из-за высокого рассеяния света в тканях, метод лазерной спекл-визуализации не дает количественные данные, относящиеся к объемной скорости кровотока, и он применим для мониторинга и картирования краткосрочных относительных изменений кровотока, вызванных внешними факторами. В связи с этим в своей работе главной задачей является продемонстрировать применимость предлагаемой методики для контроля динамики кровотока медицинских исследований, а именно исследований микроциркуляции крови во внутренних органах лабораторных животных в условиях развития модельных патологий. Также вопрос о том, что собственно измеряет метод и как получить аппарат по оценке абсолютной скорости кровотока остается открытым и в связи с отсутствием надежного теоретического описания, данный метод требует калибровки и может "работать" в пределах калибровочной области. Поэтому в моей работе была проведена калибровка системы спекл-контрастной визуализации с помощью фантома моделирующего микроциркуляцию крови.

## Глава 2 Материалы и методы

### 2.1 Методика измерений

Спекл – контрастная визуализация является неинвазивным бесконтактным методом, что позволяет получать и анализировать изображения капиллярного кровотока в режиме реального времени. В данном методе предполагается оценка контраста усредняемых по времени динамических спеклов в зависимости от времени усреднения спекл-модулированных изображений. Расчет пространственного контраста спекл-изображения  $K$  производится по единичному регистрируемому изображению спекл-поля по области, размер которой составил  $5 \times 5$  или  $7 \times 7$  пикселей [15]:

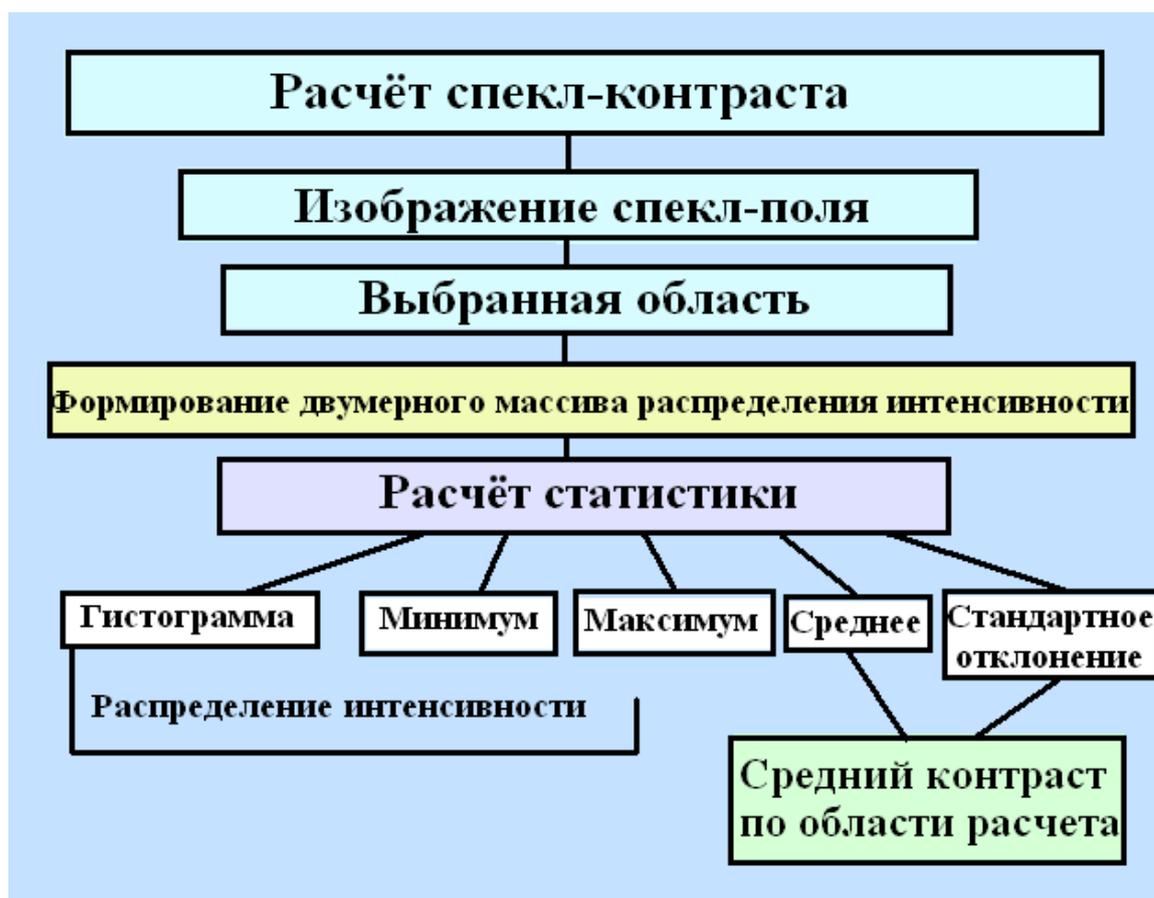
$$K(T) = \frac{\sigma(T)}{\langle I \rangle} = \frac{\sqrt{\frac{1}{N^2 - 1} \sum_{i=1}^{N^2} \left( I_i - \frac{1}{N^2} \sum_{j=1}^{N^2} I_j \right)^2}}{\frac{1}{N^2} \sum_{j=1}^{N^2} I_j}, \quad (4)$$

где  $N$  — размер области расчета,  $I_i$  — яркость точек изображения.

В зависимости от степени движения рассеивателей в отображаемой области, уровень размытия спекл-изображения будет отличаться. Чем больше движения рассеивателей есть в изображении, тем более размытым оно будет. Уровень размытия можно измерить с помощью усреднённого контраста спекл-изображения. Если есть движение рассеивателей, размывание будет возрастать, а стандартное отклонение интенсивности будет уменьшаться, и, следовательно, контраст спекл-изображения будет ниже. Наоборот, если нет движения, контраст спекл-изображения будет больше, так как размытие будет уменьшаться, а стандартное отклонение будет увеличиваться.

Для проведения измерений и расчета контраста спекл-изображений в среде LabVIEW 8.5 (National Instruments, США) была разработана программа. Данная программа позволяет в режиме реального времени с частотой до 100 кадров в секунду регистрировать распределение интенсивности спекл-поля и рассчитывать по формуле (1) в указанной оператором области средний контраст или его пространственное распределение с параллельной визуализацией.

Блок-схема расчета контраста спекл-изображения представлена на рис.3.



**Рисунок 3.** Блок-схема расчета контраста спекл-изображения.

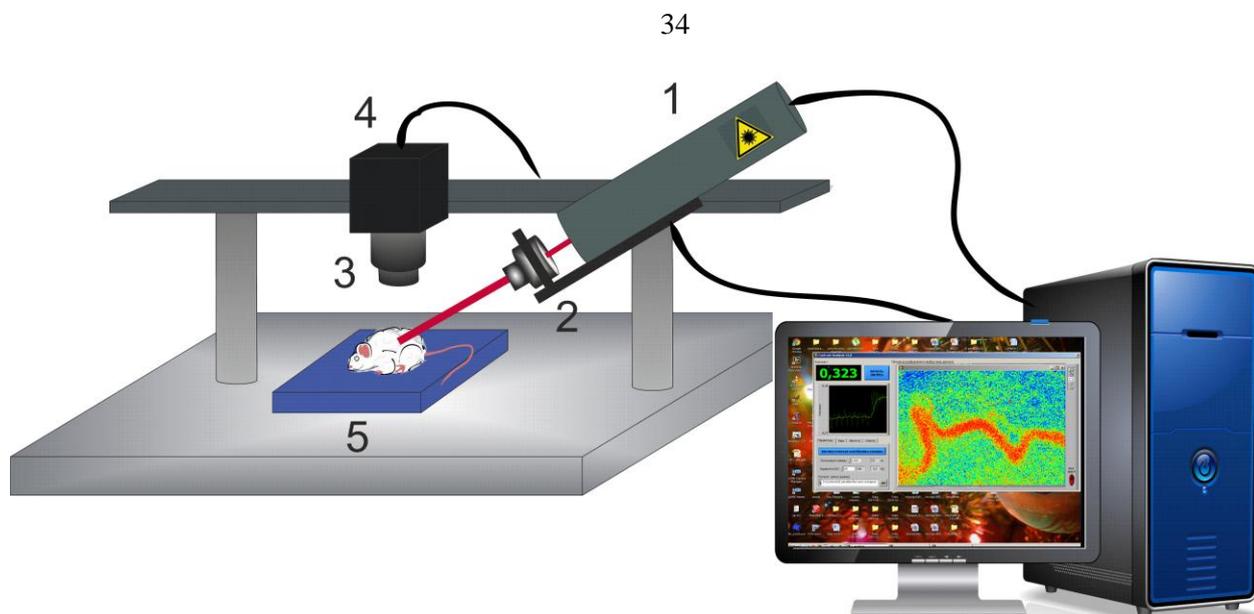
Одним из самых важных параметров при исследованиях контраста является длительность регистрации спекл-изображения – время экспозиции. Несмотря на то, что существует возможность (в известных пределах) программно управлять экспозицией камеры, в реальном эксперименте имеются ограничения, не позволяющие выбирать ее любое доступное значение. Так, в связи с разными у различных образцов коэффициентами поглощения и рассеяния, а также с

различиями их внутренней динамики (или в случае значительных временных или пространственных вариаций этих параметров для одного образца), при неизменной интенсивности падающего излучения наблюдаются существенные различия в статистике регистрируемого распределения флуктуаций интенсивности, следовательно, и в рассчитываемом на его основе контрасте. Автоматизированный алгоритм настройки параметров цифровой камеры, который был разработан и встроен в используемую программу анализа контраста спекл-изображения, позволил частично компенсировать указанные выше различия путем оптимального подбора усиления и яркости при фиксированной экспозиции. Как известно, для осуществления измерений в режиме реального времени необходимо проводить усреднение спекл-изображений за время от 5 до 30 мс, в экспериментах, описанных в данной работе, время экспозиции КМОП-камеры составляло 10 мс.

Тем не менее, в случае недостаточного времени накопления или слишком большого количества света, падающего на светочувствительные элементы камеры за время экспозиции, статистика флуктуаций интенсивности регистрируемого изображения искажается. Это происходит из-за недостаточной чувствительности или «перегрузки» светочувствительных элементов детектора.

## **2.2 Экспериментальная установка**

Для мониторинга микрогемодинамики был разработан лабораторный образец визуализирующего устройства, схема которого представлена на рисунке 4.



**Рисунок 4.** Схема экспериментальной установки. 1 - He-Ne лазер ГН-5П, длина волны — 633 нм; 2 – объектив 10х; 3 - тубус микроскопа с микрообъективом (Ломо, 10×); 4- детектор (КМОП камера Basler A602f); 5- исследуемый объект.

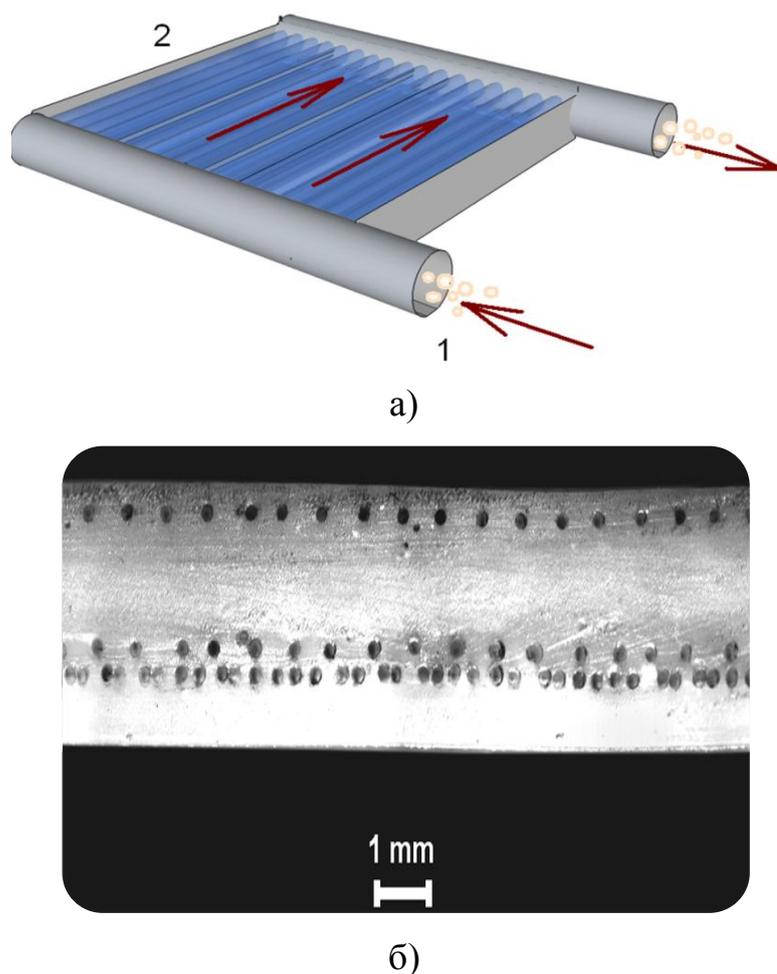
Данная установка позволяет проводить регистрацию изображений одного и того же участка образца как в когерентном свете (освещение лазером), так и при некогерентном освещении без механической перенастройки. В связи с тем, что в конечном итоге объектом исследований является кровоток, для спекл-визуализации применялся одномодовый гелий-неоновый лазер ГН-5П с длиной волны 632.8 нм, для которой наблюдается существенное рассеяние зондируемого излучения эритроцитами. Спекл-модулированные изображения поверхности анализируемого участка регистрируются монохромной КМОП-камерой (Basler a602f, число пикселей в матрице 656×491, размер пикселя 9.9×9.9 мкм; 8 бит/пиксель), оснащенной микро-объективом ЛОМО с кратностью увеличения 10×.

### **2.3 Калибровка экспериментальной установки с использованием фантома биологической ткани**

Перед проведением *in vivo* измерений была проведена калибровка данной системы для оценки применимости данной технологии для контроля

микроциркуляции и подобраны оптимальные параметры визуализации разработанного устройства для реализации технологии мониторинга микроциркуляции крови в сосудах внутренних органов лабораторных животных.

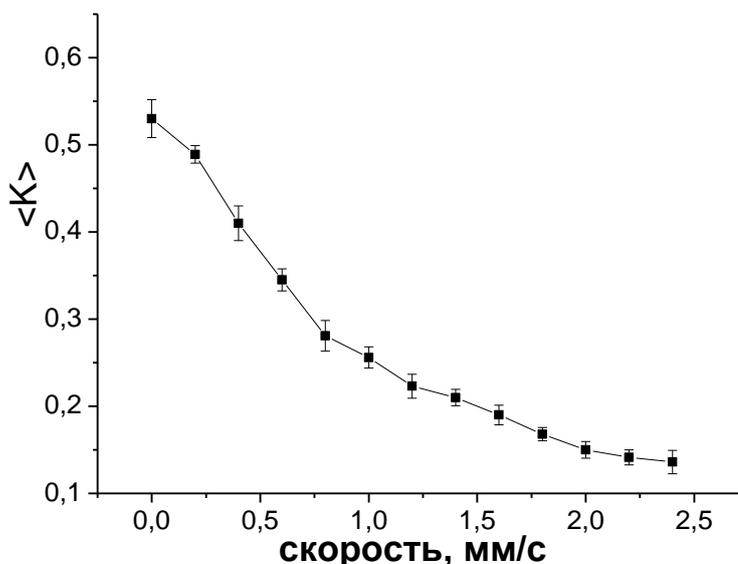
Для реализации данных задач был специально создан фантом для моделирования микроциркуляции [96]. Представленный на рисунке 5 фантом имел следующую текстуру: базовое вещество - эпоксидная смола с рассеивающей композицией в виде наночастиц  $TiO_2$ , через которое проходят каналы диаметром 180-200 мкм на глубине ~200 мкм, где по ним с контролируемой скоростью в пределах от 0 до 3 мм/сек пропусклась рассеивающая взвесь частиц красного красителя с размером частиц 7-10 мкм. Скорость потока регулировалась с использованием дозатора лекарственных веществ MLW Lineomat, Германия.



**Рисунок 5.** Фантом: а) схематичное изображение: 1- суспензия частиц ( $d \sim 7-9 \mu\text{m}$ ); 2- фантом (размер  $\sim 2 \times 2 \text{ см}$ , число каналов  $\sim 300$ ,  $d \sim 180-200 \mu\text{m}$ ); б) изображение фантома в срезе.

Измерения контраста спекл-изображений проводились при экспозициях камеры 10 мс – при этом значении экспозиции отсутствовали заметные искажения статистики регистрируемой интенсивности из-за недостаточности падающего на детектор излучения, рассеянного образцом.

На рисунке 6 представлена калибровочная кривая зависимости контраста спекл-изображений от скорости частиц.

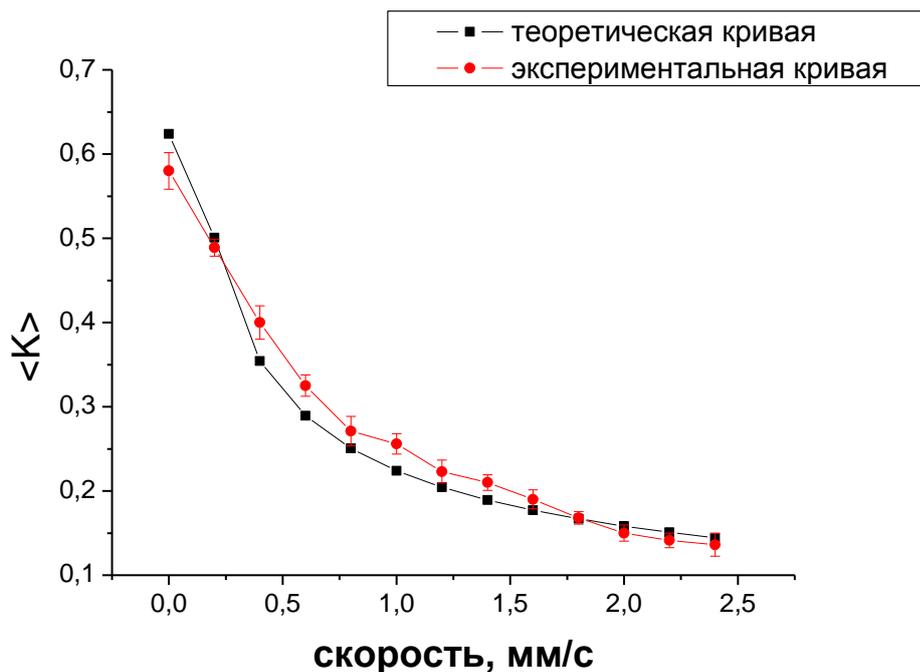


**Рисунок 6.** График зависимости контраста спекл-изображений от скорости рассеивающих частиц в фантоме.

В данной зависимости определенным значениям скорости частиц соответствуют определенные значения контраста.

Учитывая данную зависимость и заданные значения скоростей рассеивающих частиц, мы можем в соответствии с формулами (2) и (3) построить теоретическую кривую и сравнить ее с кривой рисунка 6. Данная процедура позволит сравнить экспериментально полученную зависимость с теоретической при времени экспозиции 10 мс.

На рисунке 7 представлены калибровочные кривые полученные экспериментальным путем с помощью фантома и теоретическим с помощью формул (2) и (3) зависимости контраста спекл-изображения от скорости частиц.



**Рисунок 7.** График зависимости контраста спекл-изображения от скорости рассеивающих частиц.

Данный график показывает, что теоретически рассчитанная кривая практически совпадает с кривой полученной экспериментальным путем с помощью фантома. В связи с этим мы можем ввести понятие приведенной скорости  $v'$  рассчитанной в соответствии с формулами (2) и (3) которую можно интерпретировать со скоростями кровотока при дальнейшей оценке микроциркуляции крови на биологических объектах *in vivo*.

## 2.4 Статистическая обработка данных

Запись спекл-изображений проводилась в течение 1-3 мин. После чего значения контраста спекл-изображения были переведены в скорость в соответствии с формулами (2) и (3). Далее с помощью статистической обработки были подсчитаны средние значения  $\pm$  стандартное отклонение. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных

программ Statistica for Windows 6.0. Для определения значимости различий между исследуемыми параметрами, исходные данные имели нормальное распределение, использовался критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## **2.5 Описание экспериментальных биологических моделей**

### **2.5.1 Стресс-индуцированный инсульт головного мозга**

Инсульт является третьей наиболее распространенной причиной смертности в промышленно развитых странах. В то время, как смертность в результате инфаркта миокарда резко сократилось в последние 10-15 лет, смертность в результате инсульта остается почти такой же, несмотря на то, что эти болезни имеют сходные основные патогенетические механизмы, в том числе атеросклероз, гипертония и сахарный диабет. В связи с этим изучение механических процессов разрыва сосудов в мозге и изучения последствий данного состояния очень важно. Многие исследования по изучению инсульта мозга проводятся на лабораторных животных, для этих исследований разработаны различные методики по моделированию мозговых геморрагий.

Например, в работах [97-100] применяется традиционная стереотаксическая технология по введению крови в мозг. Также, предлагаются другие способы моделирования инсульта мозга – тяжелая гипоксия или преждевременные роды для исследований на новорожденных животных [101,102]. А в работе описываемой Тамура и др., в начале 1980-х годов специальной микроклипсой закупоривали артерии и вызывали реперфузию под непосредственным визуальным контролем через операционный микроскоп [103].

В данной работе был использован усовершенствованный метод стессирования, прототипом которого явился способ индуцирования мозговых кровотечений у гипертензивных крыс, склонных к инсульту мозга [104], принцип действия которого связан с повреждающим воздействием звука на церебральные

сосуды, которое обусловлено его высокой проникающей способностью и гиперактивацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы как одной из первых вовлекаемых в стрессорную реакцию, что сопряжено с критическими сдвигами в работе вегетососудистых центров мозга [105]. Данная методика имеет большое преимущество перед другими, т.к. она является неинвазивным методом моделирования инсульта у лабораторных животных.

### 2.5.2 Панкреонекроз

Воспроизведение острого панкреатита у крыс представляет большие трудности, нежели у собаки, что связано с высокой устойчивостью поджелудочной железы данного животного к повреждению. В экспериментальной хирургии для этого наиболее часто используются следующие методы [106-108]:

1. замораживание поджелудочной железы хлористым этилом. Метод прост, однако клинического эквивалента не имеет. Кроме того, возможна резорбция хлористого этила через брюшину;
2. иммунизация животных антигенной смесью гомогената поджелудочной железы. Метод достаточно сложен, продолжителен, кроме того, при этом развивается абортивная (отёчная) форма острого панкреатита;
3. создание гипертензии в протоках поджелудочной железы путём перевязки или пережатия протоков, с последующей секретогенной (пищевой и медикаментозной) стимуляцией. Отсутствие чёткого описания авторами методики воспроизведения острого панкреатита не позволяет использовать результаты этих исследований;
4. интраоперационная травматизация поджелудочной железы;
5. гиперстимуляция поджелудочной железы секретогенами (церулеин, секретин, бомбезин). Модель широко используется за рубежом. Она проста,

обеспечивает высокую однотипность воспроизведения острого панкреатита, однако имеет существенные недостатки: у модели нет аналогов в клинической практике, характеризуется развитием отёчной формы острого панкреатита;

6. введение в ткань поджелудочной железы различных жидкостей. Метод прост, однако вызывает образование абсцессов в железе, а не истинный панкреатит;
7. пищевая стимуляция с иммобилизационно-холодовым стрессом;
8. введение в протоки поджелудочной железы под давлением различных смесей без перевязки протоков.

В наших экспериментах была использована экспериментальная модель ишемии – реперфузии тканей поджелудочной железы, путем моделирования обратимого нарушения кровотока в сосудах поджелудочной железы, т.к. каковы бы ни были специфические патофизиологические причины панкреатита, центральная патогенетическая роль в его прогрессировании, с последствиями в виде тканевой гипоксии и (или) аноксии, принадлежит микроциркуляторным нарушениям.

### 2.5.3 Диабет

Сахарный диабет встречается у 1 — 4% населения. Среди пожилых — в 2 — 30%. В разных регионах распространенность заболевания неодинакова — от нуля у жителей высокогорных районов Новой Гвинеи до 25% среди индейцев пима (США) [109]. Причиной сахарного диабета является инсулиновая недостаточность. По механизму возникновения инсулиновая недостаточность может быть панкреатической, т. е. связанной с нарушением биосинтеза и выделения инсулина, или внепанкреатической (относительной) при нормальном выделении инсулина панкреатическими островками.

Основные сведения об этиологии и патогенезе сахарного диабета стали известны благодаря опытам проводимых на животных. Впервые экспериментальная модель сахарного диабета была получена Мерингом и Минковским в 1889 г. путем удаления у собак всей или большей части (9/10) поджелудочной железы [110-112]. Эта форма экспериментального диабета характеризовалась всеми признаками, наблюдающимися у человека, но протекала более тяжело в виде осложнений, таких как высокая кетонемия, жировой инфильтрация печени, развитие диабетической комы. В результате удаления всей поджелудочной железы организм страдал не только от инсулиновой недостаточности, но и от дефицита пищеварительных ферментов. Существует еще одна модель экспериментального диабета, которая создается путем введения контринсулярных гормонов. После длительного периода введения гормонов передней доли гипофиза может развиваться гипофизарный диабет. Сахарный диабет у животных может быть получен с помощью антител к инсулину. Такой диабет возникает как при активной, так и пассивной иммунизации. Также сахарный диабет можно вызывать путем введения химических веществ, например дитизон, связывающий цинк, участвующий в депонировании и секреции инсулина. Повреждает панкреатические островки антибиотик стрептозотцин [110-112].

Но широкое распространение получила модель аллоксанового диабета, возникающего при введении животным аллоксана. Это вещество избирательно повреждает  $\beta$ -клетки панкреатических островков, в связи с чем развивается инсулиновая недостаточность различной тяжести. Изменения, которые происходят в организме при моделировании аллоксанового диабета, можно разделить на три стадии. Сначала уровень сахара в крови начинает резко повышаться, достигая максимума через 2-4 часа. После этого идет спад содержания сахара (гипогликемия), длящийся 15-20 ч. На этой стадии многие животные погибают вследствие некроза  $\beta$ -клеток, что приводит к освобождению в больших количествах инсулина. После этого наступает третья стадия - вторичная гипергликемия. Она является постоянной, поэтому ее называют перманентной.

Именно вторичная гипергликемия и является свидетельством диабета. Во время этой стадии через 24-36 ч. после начала эксперимента у подопытных крыс развиваются все симптомы заболевания. В наших исследованиях мы выбрали именно данную модель экспериментального диабета в силу своей легкости применения и функциональности [110-112].

## **Глава 3. Исследование церебральной микроциркуляции крови в условиях развития стресс-индуцированного инсульта головного мозга у лабораторных животных**

### **3.1 Введение**

Ежегодно в мире диагностируется от 5 до 6 миллионов инсультов, в России до 450 тысяч инсультов. В течение первого месяца умирают до 35%, а к концу года до 50%. Также опасны повторные инсульты, в первый год рецидив развивается у 5-25%, в течение трех лет у 20%, в течение пяти лет от 20 до 40% переболевших. Наибольший риск развития инсульта после 65 лет, заболеваемость в этом возрасте составляет до 90% всех случаев инсульта. В этом же возрасте наибольшее количество летальных исходов. До 80% инсультов развиваются по типу ишемических патологий головного мозга, с летальностью до 37%. У 20% больных с геморрагическим инсультом, гибель составляет до 82% [113].

Инсульт головного мозга – это острое нарушение мозгового кровообращения, а именно повреждение головного мозга, вызванное заблокированными или лопнувшими кровеносными сосудами. В большинстве случаев отсутствие кровотока вызывает инсульт, по статистике один из пяти пациентов будет иметь инсульт из-за мозговых геморрагий. Симптомы инсульта появляются внезапно и, как правило, нет никакого способа узнать, что мозг находится в беде, пока не начнется инсульт [113]. В основном симптомы инсульта зависят от того, какая часть мозга повреждена. Есть два основных типа инсульта:

- ишемический инсульт происходит, когда кровеносные сосуды блокируются, что ведет к отсутствию кровотока в части головного мозга.
- геморрагический инсульт вызван повреждением кровеносных сосудов, что ведет к кровоизлиянию в вещество головного мозга.

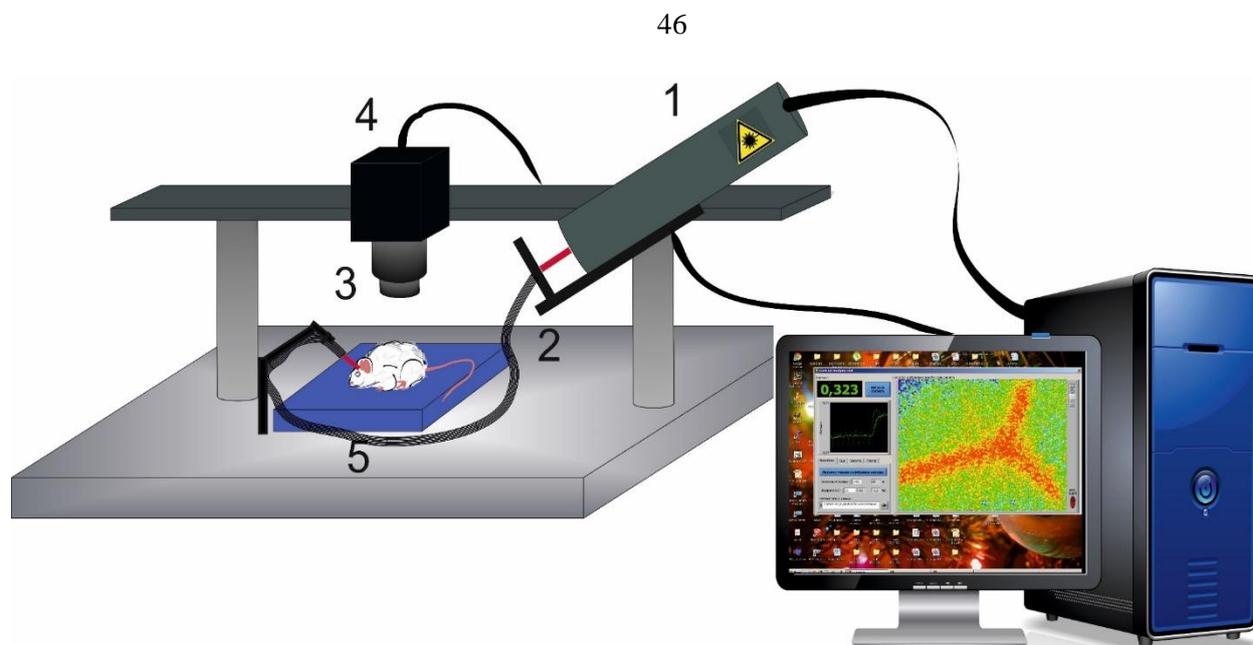
Смертность от внутримозговых кровоизлияний достигает 40 % [113]. При этом причиной кровоизлияния в головной мозг чаще всего является гипертоническая болезнь (80—85 % случаев). Реже кровоизлияния

обуславливаются атеросклерозом, заболеваниями крови, воспалительными изменениями мозговых сосудов, интоксикацией, авитаминозами и другими причинами. Внутримозговое кровоизлияние может наступить путем диапедеза или в результате разрыва сосуда. В обоих случаях в основе выхода крови за пределы сосудистого русла лежат функционально-динамические ангиодистонические расстройства общей и в особенности регионарной мозговой циркуляции. Основным патогенетическим фактором кровоизлияния являются артериальная гипертензия и гипертонические кризы, при которых возникают спазмы или параличи мозговых артерий и артериол. Обменные нарушения, возникающие в очаге ишемии, способствуют дезорганизации стенок сосудов, которые в этих условиях становятся проницаемыми для плазмы и эритроцитов. Так возникает кровоизлияние путем диапедеза. Одновременное развитие спазма многих сосудистых ветвей в сочетании с проникновением крови в мозговое вещество может привести к образованию обширного очага кровоизлияния, а иногда и множественных геморрагических очагов. В основе гипертонического криза может быть резкое расширение артерий с увеличением мозгового кровотока, обусловленное срывом его саморегуляции при высоком артериальном давлении. В этих условиях артерии утрачивают способность к сужению и пассивно расширяются. При этом повышается проницаемость сосудов, что приводит к диапедезу плазмы крови и эритроцитов. В механизме возникновения диапедезной геморрагии определенное значение придается нарушению взаимосвязи между свертывающей и противосвертывающей системами крови. В патогенезе разрыва сосудов играют роль и функционально-динамические нарушения сосудистого тонуса. Паралич стенки мелких мозговых сосудов ведет к острому нарастанию проницаемости сосудистых стенок и плазморрагии [113]. Мозговые геморрагии являются одним из ключевых показателей срыва механизмов сосудистой адаптации к стрессу. Обнаружение инсульта в первые часы, его точная локализация и уточнение объема поражения вещества головного мозга является одной из важных проблем в неврологии.

В работе представлены результаты исследования церебрального кровотока лабораторных крыс в условиях развития инсульта, вызванного стрессом, и при введении сосудорасширяющих и сосудосуживающих агентов.

### **3.2 Материалы и методы**

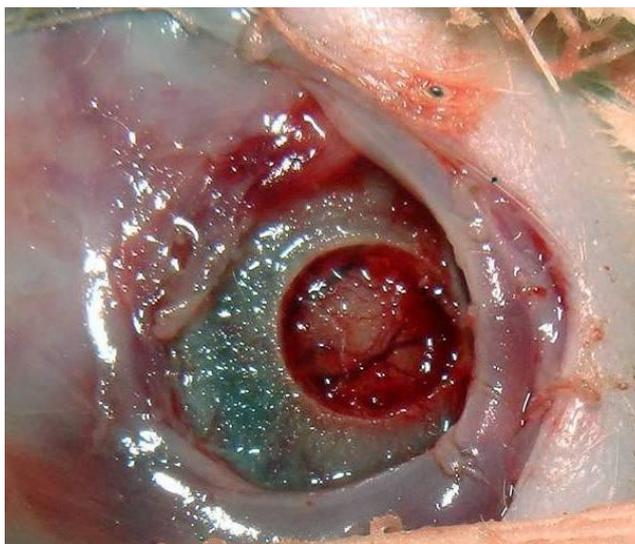
Для мониторинга состояния церебральной микроциркуляции в головном мозге лабораторных крыс при моделировании инсульта были внесены важные изменения, позволяющие более эффективно проводить мониторинг церебрального кровотока, а именно был использован кварц-полимерный волоконный световод для подведения зондирующего излучения к исследуемой зоне. Для проведения исследований использовалась экспериментальная установка, схема которой показана на Рис. 8. Также дополнительно использовался некогерентный источник света (светодиоды с длиной волны 517 нм) для параллельной микроскопической визуализации возможных очагов кровоизлияния в головном мозге в условиях развития стресс-индуцированного инсульта у лабораторных животных.



**Рисунок 8.** Схема экспериментальной установки: 1 - He-Ne лазер ГН-5П, длина волны — 633 нм; 2 – оптическое волокно; 3 - тубус микроскопа с микрообъективом (Ломо, 10×); 4 – детектор (КМОП камера Basler A602f); 5 – объект исследования.

В настоящей работе применялся метод моделирования инсульта, основанный на методе стрессирования Романовой [104]. Метод заключается в следующем: крыс фиксировали на спине, обеспечивая полную иммобилизацию. Затем их помещали в плексигласовую камеру объемом 2000 см<sup>3</sup> и подвергали воздействию прерывистым звуком силой 120 дБ по методике: звук 1 мин, прерывистый звук 15 мин (10 сек звук, 10 сек перерыв), перерыв 5 мин, звук 1 мин. Этот цикл повторяется 5 раз с минутным интервалом, таким образом, что общая продолжительность сочетанного действия стрессовых факторов составляла 2 часа. Все манипуляции на животных проведены в строгом соответствии с «Правилами проведения качественных клинических испытаний в РФ» (утв. МЗ РФ и введены в действие с 1 января 1999 г.), приложением 3 к приказу МЗ СССР №755 от 10.08.77, положениями Хельсинкской декларации (2000 г.) и рекомендациями, содержащимися в Директивах Европейского Сообщества (№86/609ЕС). На рис. 9 представлено изображение исследуемого участка головного мозга лабораторной крысы, после трепанации черепной кости. В экспериментах по мониторингу кровотока в коре головного мозга было

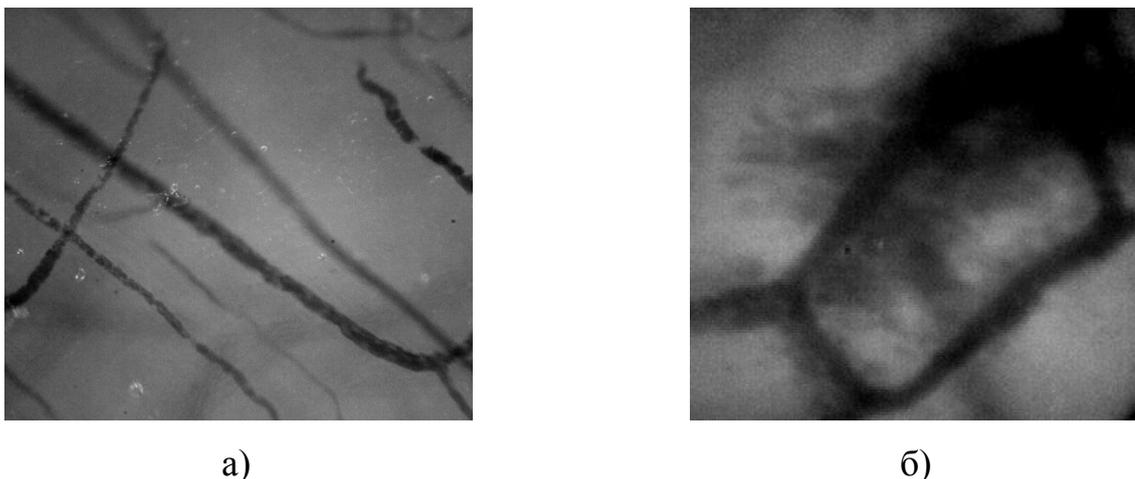
рассмотрено три группы лабораторных крыс по 5 особей обеих полов в каждой группе. Вес исследуемых животных варьировался от 200 до 300 г. Для первой группы подопытных животных исследование проводилось через сутки после стрессового воздействия, вторую группу животных исследовали сразу после стрессирования (предынсультная группа), третья группа была контрольной и состояла из здоровых животных. Для выявления чувствительности метода спекл-контрастной визуализации к изменениям в церебральной микроциркуляции за счет активации механизмов регуляции тонусом сосудов проводили измерения скорости церебрального кровотока в сосуде при стрессе и при фармакологическом моделировании сокращения и расслабления сосудов мозга. Для этих целей, всем животным внутривенно, с помощью катетера, вводились или вазодилататорные (ацетилхолин) агенты или вазоконстрикторные (мезатон) агенты.



**Рисунок 9.** Изображение исследуемого участка головного мозга.

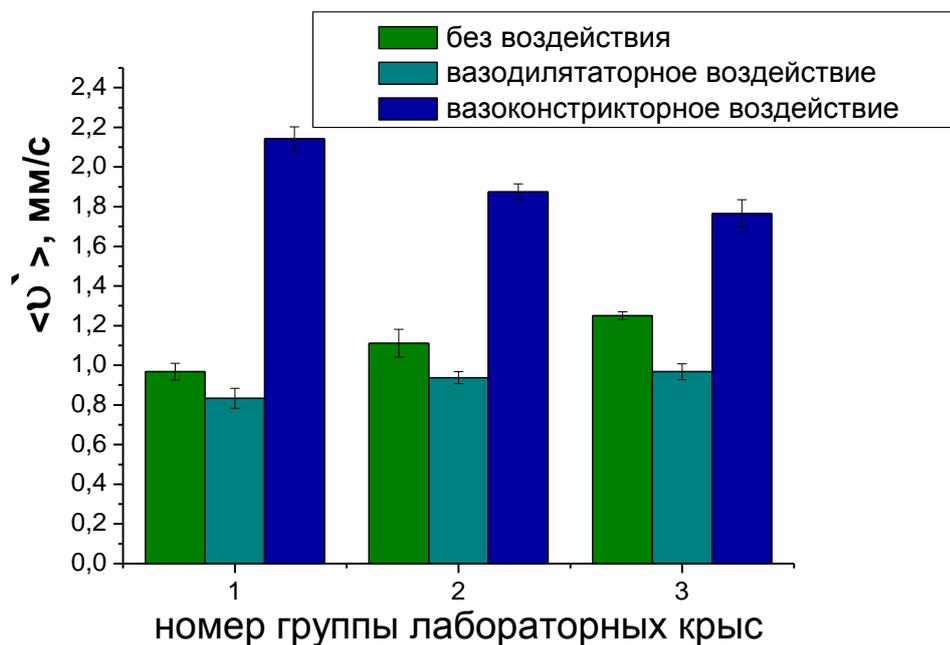
### **3.3 Результаты и их обсуждение**

На рисунке 10 приведены микроскопические изображения участка головного мозга лабораторной крысы в нормальном состоянии (а) и при развитии кровотечения в головной мозг, спустя сутки после стрессирования.



**Рисунок 10.** Микроскопические изображения эритроцитов, распространяющихся по сосудам головного мозга (а); развитие мозговых геморрагий спустя сутки после стрессирования (1 группа) (б)

На рисунке 11 представлены результаты мониторинга микроциркуляции крови в коре головного мозга методом спекл-контрастной визуализации.



**Рисунок 11.** Изменение приведенной скорости кровотока в сосуде головного мозга трех групп лабораторных животных: 1 – 24 ч после стрессирования, 2 – сразу после стрессирования, 3 – контрольная группа.

Приведенные данные, соответствующие установившимся режимам микрогемодинамики в норме и при патологиях, являются результатами усреднения по наборам измеренных в экспериментах значений для различных подопытных животных. Результаты исследований показали, что при установившемся физиологическом режиме для здоровых животных (3-я группа) приведенная скорость кровотока на 23 % выше 1 группы животных (через сутки после стрессового воздействия) и на 12 % второй группы (предынсультная группа). Также с помощью микроскопической визуализации (рис. 10) были обнаружены очаги кровоизлияний в головном мозге лабораторных крыс, в связи с этим снижение интенсивности кровотока на следующие сутки после вызванного у исследуемого животного инсульта является ожидаемым результатом. Результаты влияния вазоконстрикторного агента мезатон на микроциркуляцию крови в головном мозге, показали увеличение приведенной скорости кровотока, это соответствует ожидаемому физиологическому отклику, т.к. использование данного препарата, вызывает повышение артериального давления, также усиливает сердечные сокращения, что ведет к увеличению кровотока в исследуемых сосудах. А использование вазодилататорного агента ацетилхолин вызывает снижение артериального давления и замедление сердечных сокращений, приводящих к снижению скорости кровотока, что совпадает с полученными результатами (рис.11).

Таким образом, метод спекл-контрастной визуализации позволяет в режиме реального времени отслеживать изменения состояния микроциркуляции крови в головном мозге лабораторных крыс. К одному из возможных будущих применений метода спекл-коррелометрии полного поля в клинической практике можно отнести малоинвазивный мониторинг церебральной микроциркуляции крови в мозге малых животных без вскрытия черепа при иммерсионном оптическом просветлении кожных и костных тканей головы с помощью гиперосмотических агентов [114 – 116] и применения других алгоритмов обработки спекл-изображений [117 – 119]. Например, в [118] приведены результаты мониторинга церебрального кровотока методом спекл-визуализации с

временным усреднением без повреждения черепной коробки крысы. Среди работ, посвященных решению этой проблемы, стоит отметить работу, речь в которой идет об эффективности совместного применения методов оптического просветления и спекл-коррелометрии полного поля для мониторинга сильно рассеивающих сред с выраженной динамикой рассеивателей [120]. В работе [121] говорится об успешном применении метода спекл-контрастной визуализации для мониторинга церебрального кровотока с применением метода оптического просветления. Во многих исследованиях [114,122,123] продемонстрировали эффективность волоконной оптики не только для лазерной доставки излучения, но и для обнаружения рассеянного света [123,124].

### 3.4 Выводы

Таким образом, экспериментальное исследование динамики кровотока коры головного мозга в условиях развития стресс-индуцированного инсульта у лабораторных крыс демонстрирует высокую эффективность метода спекл-контрастной визуализации, разработанного устройства и алгоритма получения, и обработки данных полного поля при мониторинге состояния церебральной микроциркуляции, обусловленного патологическими изменениями или воздействием сосудорасширяющих и сосудосуживающих препаратов. Использование оптического волокна для доставки лазерного излучения является существенным преимуществом метода для будущих приложений. Результаты исследований показали, что при установившемся физиологическом режиме у здоровых животных приведенная скорость кровотока на 23% выше, чем у группы животных, проживших сутки после звукового стресса, и на 12%, чем у прединсультной группы. Т.е. на ранней стадии развития стресс-индуцированного инсульта удалось выявить изменения микроциркуляции крови в головном мозге.

## **Глава 4. Исследование микроциркуляции крови в условиях моделирования ишемии-реперфузии в тканях поджелудочной железы лабораторных животных**

### **4.1 Введение**

Острый панкреатит является распространенным заболеванием. Почти 75% пациентов страдают от легкой отечной формы панкреатита. У 25% пациентов развивается тяжелая степень болезни со смертностью 30-60%. При панкреатите происходит воспаление поджелудочной железы, при этом ферменты, выделяемые железой, не вбрасываются в двенадцатиперстную кишку, а активизируются в самой железе и начинают разрушать ее. Одну из основных ролей в патофизиологическом развитии панкреатита, приводящей к гипоксии тканей, играют микроциркуляторные нарушения. В 80-х годах прошлого века были проведены исследования, показывающие высокую чувствительность поджелудочной железы к понижению перфузии и ишемии и выявляющие прямую связь между патологическими изменениями тканей железы и повторным нарушением кровотока. [125]. Кроме этого, тяжелая ишемия поджелудочной железы является инициатором панкреатита. Особый интерес представляют работы Warshaw и соавт. [107,126], представивших клинические доказательства высокой чувствительности поджелудочной железы к снижению перфузии и ишемии, и показавших, наряду с другими авторами, что первичные или вторичные нарушения кровотока в поджелудочной железе вызывают в ней патологические изменения. Самыми значимыми событиями динамики острого панкреатита являются – высвобождение местных медиаторов (цитокинов, вазоактивных субстанций, свободных радикалов кислорода) и существенное прогрессирование микроциркуляторных нарушений, а также активация лейкоцитов и их инфильтрация в ткань [126]. Нарушения микроциркуляции зависят от формы панкреатита и тяжести деструктивных изменений в поджелудочной железе. Значительные изменения в микроциркуляции крови

приводят к гипоксии тканей, нарушения метаболизма и является одной из причин развития полиорганной недостаточности во время острого панкреатита. При тяжелой степени острого панкреатита возникает некроз ткани, основным методом лечения является лапароскопия, путем удаления по возможности некротической ткани и выведения токсичных и вазоактивных веществ, образовавшихся в процессе активизации ферментов в самой железе с помощью проведения перитонеального лаважа-диализа. Помимо этого, оперативное вмешательство не всегда устраняет возможность развития гнойных осложнений, продолжающегося панкреонекроза, абсцессов, кровотечений и приходится проводить повторную операцию, что увеличивает послеоперационную летальность. В связи с этим, также важно следить за ходом операции на микроуровне, за изменением микроциркуляции крови, структуры ткани микроскопическим путем в процессе хирургического вмешательства.

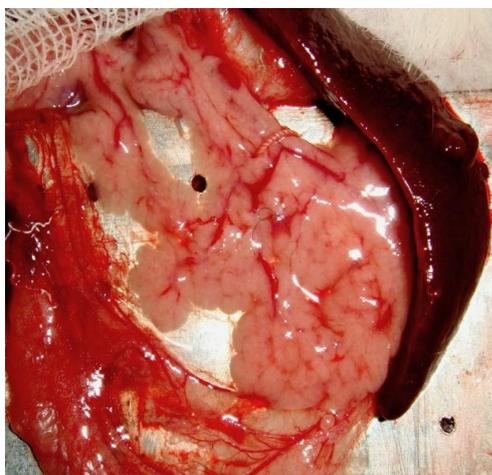
## **4.2 Материалы и методы**

Поджелудочная железа является органом пищеварительной системы, которая является главным источником ферментов для переваривания жиров, белков и углеводов. В анатомической структуре поджелудочной железы выделяют головку, тело и хвост. Головка поджелудочной железы примыкает к двенадцатиперстной кишке, располагаясь в её изгибе так, что последняя охватывает железу в виде подковы. Тело поджелудочной железы имеет трёхгранную (треугольную) форму. Хвост поджелудочной железы имеет конусовидную или грушевидную форму, направляясь влево и вверх, простирается до ворот селезёнки [127].

По строению это сложная альвеолярно-трубчатая железа. С поверхности орган покрыт тонкой соединительнотканной капсулой. Основное вещество разделено на дольки, меж которых залегают соединительнотканые тяжи,

закрывающие выводные протоки, сосуды, нервы, а также нервные ганглии и пластинчатые тела [127].

Моделирование панкреатической ишемии-реперфузии показало, что ишемия и реперфузия приводят к нарушениям микроциркуляции, возникновению отека тканей и к гистоморфологическим изменениям, схожим с теми, что наблюдаются при остром панкреатите. На рисунке 12 приведено изображение открытой брюшной полости подопытного животного в процессе регистрации последовательности спекл-модулированных изображений поверхности поджелудочной железы. Для мониторинга состояния микроциркуляции в приповерхностных слоях поджелудочной железы был сконструирован специальный столик, на котором располагалась исследуемая железа. Данное приспособление исключало физиологическое движение органов, вызванное, к примеру, дыханием и позволяло провести регистрацию данных, а также оценить морфологические изменения.



**Рисунок 12.** Фотография поджелудочной железы в процессе лапаротомии.

Для мониторинга микроциркуляции крови в поджелудочной железе была использована экспериментальная установка схема которой показана на рис. 4 описанная в главе 2.

Эксперименты проводились в два этапа:

- первый этап - анализ влияния полной ишемии разной длительности и последующей реперфузии на развитие патологии в поджелудочной железе крыс.
- второй этап - анализ динамики кровотока под влиянием частичной временной ишемии и последующей реперфузией в сосудах поджелудочной железы сытых, голодных и алкоголизированных крыс.

Оба этапа были выполнены на 82 белых крысах линии Wistar. Все манипуляции на животных проведены в строгом соответствии с «Правилами проведения качественных клинических испытаний в РФ» (утв. МЗ РФ и введены в действие с 1 января 1999 г.), приложением 3 к приказу МЗ СССР №755 от 10.08.77, положениями Хельсинкской декларации (2000 г.) и рекомендациями, содержащимися в Директивах Европейского Сообщества (№86/609ЕС). Вес, исследуемых животных, варьировался от 200 до 300 граммов. Для каждого животного производилась срединная лапаротомия. Наружу выводился органокомплекс, после чего поджелудочная железа помещалась на манипуляционный столик. Через перфорации в столике над сосудистым пучком, кровоснабжающим исследуемую область, накладывалась лигатура капроновой нитью. Животное помещалось под оптическую систему для визуализации исследуемой области и регистрации кровотока. Пережатие сосуда выполнялось с параллельной регистрацией кровотока. После пережатия вновь производилась регистрация кровотока. После завершения записи данных эксперимент завершался и органокомплекс помещался в брюшную полость. Послеоперационная рана зашивалась.

В первом этапе исследований лабораторные крысы были разделены на 6 групп:

- первая группа (5 особей) – животные у которых исследования кровотока проводились в первую минуту, через 5 и 20 минут исследования, а также через сутки после начала опыта;

- вторая группа (5 особей) - животные у которых исследования кровотока проводились в первую минуту, через 5 и 20 минут исследования, а также через 5 дней после начала опыта;
- третья группа (8 особей) - животные у которых исследования кровотока проводились до ишемии, в момент 5 минутной ишемии, а также через сутки после начала опыта;
- четвертая группа (8 особей) - животные у которых исследования кровотока проводились до ишемии, в момент 5 минутной ишемии, а также через 5 дней после начала опыта;
- пятая группа (8 особей) - животные у которых исследования кровотока проводились до ишемии, в момент 20 минутной ишемии, а также через сутки после начала опыта;
- шестая группа (8 особей) животные у которых исследования кровотока проводились до ишемии, в момент 20 минутной ишемии, а также через 5 дней после начала опыта.

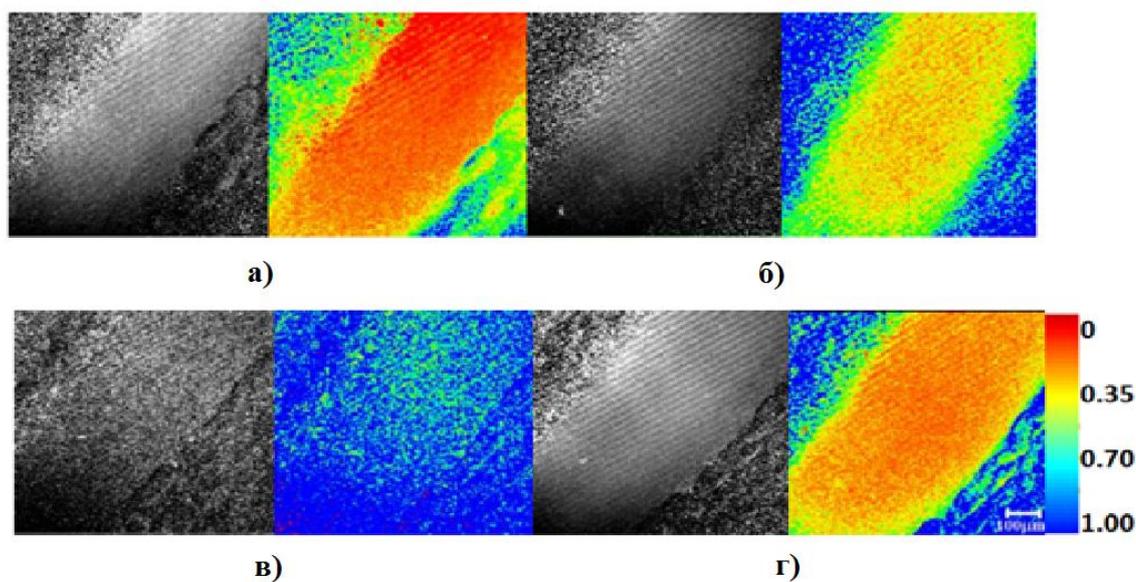
Дополнительно были проведены гистологические исследования. Материал для гистологических исследований фиксировали в 10%-ном растворе формалина, обезвоживали набором спиртов возрастающей концентрации, затем заливали парафином. Срезы толщиной 5–10 мкм готовили с помощью санного микротомы с подъемным объектодержателем по наклонной плоскости. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

На втором этапе исследований по анализу динамики кровотока под влиянием частичной временной локальной ишемии и последующей реперфузии в сосудах поджелудочной железы сытых, голодных и алкоголизированных крыс лабораторные животные были разделены на 6 групп по 8 особей обоих полов в каждой группе.

- первая группа (8 особей) – голодные животные у которых исследования кровотока проводились до 50% ишемии, в момент 5 минутной 50% ишемии, а также на 5 сутки после начала опыта;

- вторая группа (8 особей) - голодные животные у которых исследования кровотока проводились до 50% ишемии, в момент 20 минутной 50% ишемии, а также на 5 сутки после начала опыта;
- третья группа (8 особей) - сытые животные у которых исследования кровотока проводились до 50% ишемии, в момент 5 минутной 50% ишемии, а также на 5 сутки после начала опыта;
- четвертая группа (8 особей) - сытые животные у которых исследования кровотока проводились до 50% ишемии, в момент 20 мин 50% ишемии, а также на 5 сутки после начала опыта;
- пятая группа (8 особей) - алкоголизованные животные у которых исследования кровотока проводились до 50% ишемии, в момент 5 минутной 50% ишемии, а также на 5 сутки после начала опыта.
- шестая группа (8 особей) - алкоголизованные животные у которых исследования кровотока проводились до 50% ишемии, в момент 20 минутной 50% ишемии, а также на 5 сутки после начала опыта.

На рисунке 13 представлено спекл-изображение сосуда поджелудочной железы при различных состояниях скорости кровотока.

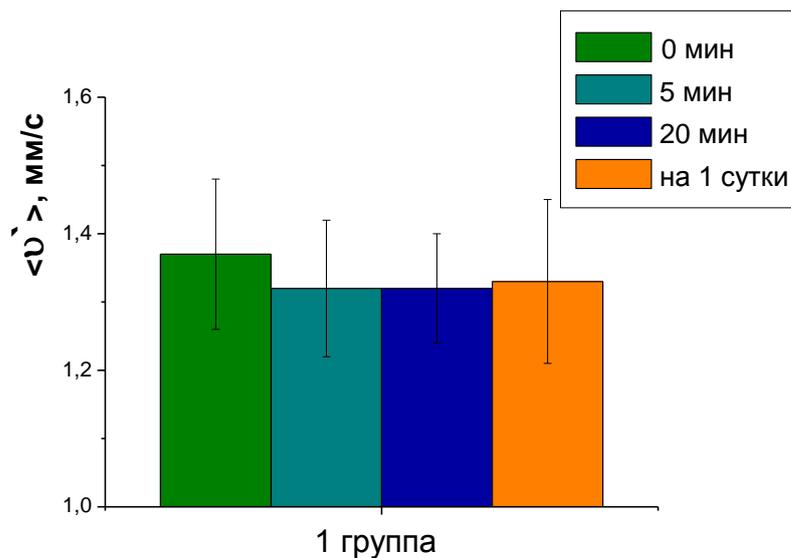


**Рисунок 13.** Изображение сосуда поджелудочной железы (диаметр 280 мкм) в когерентном свете (630 нм) (ч-б) и рассчитанное распределение контраста

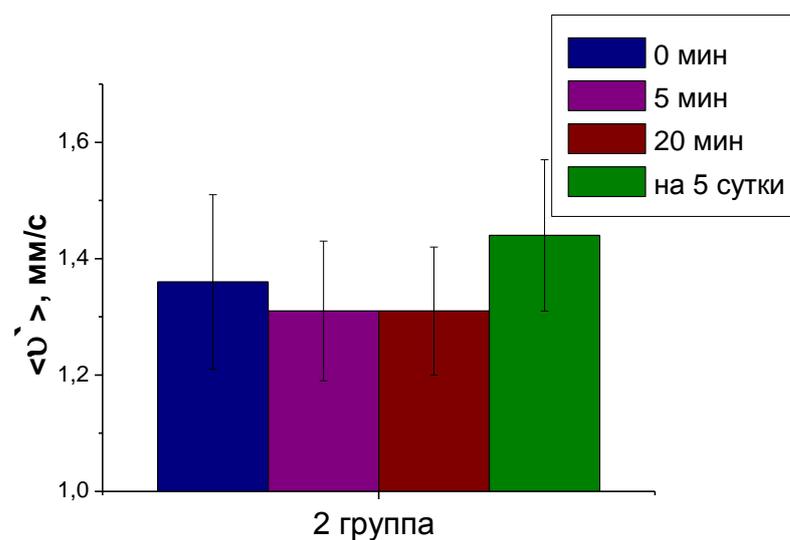
спекл-изображения (1-0) (цветной) в различных состояниях скорости кровотока:  
а) нормальное, б) 50% ишемия, в) 100% ишемия, г) реперфузия

### **4.3 Результаты и их обсуждение**

На рисунке 14 представлены результаты по контрольной группе животных, где исследования кровотока проводились в первую минуту, через 5 и 20 минут исследования, а также через сутки после начала опыта (а), и на 5 сутки после начала опыта (б).



а)

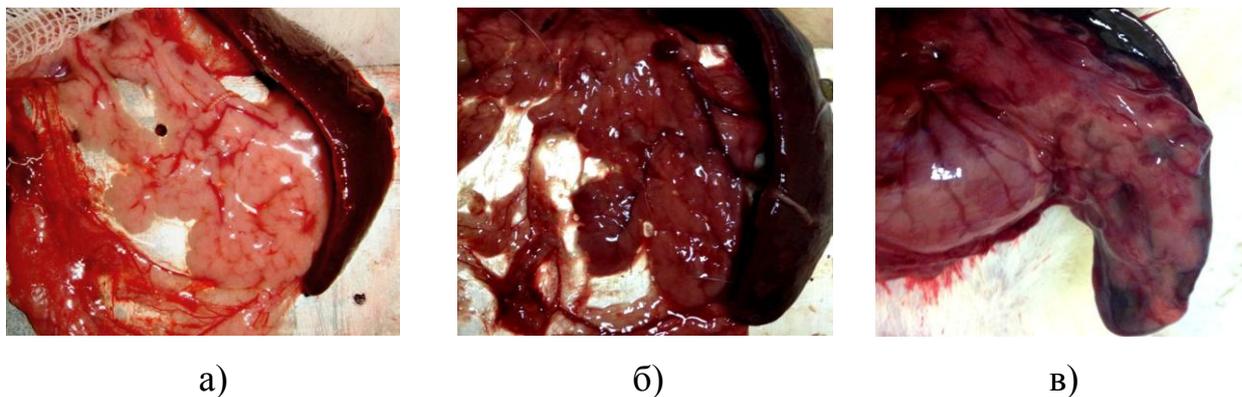


б)

**Рисунок 14.** Динамика приведенной скорости кровотока в сосудах поджелудочной железы крыс контрольных групп.

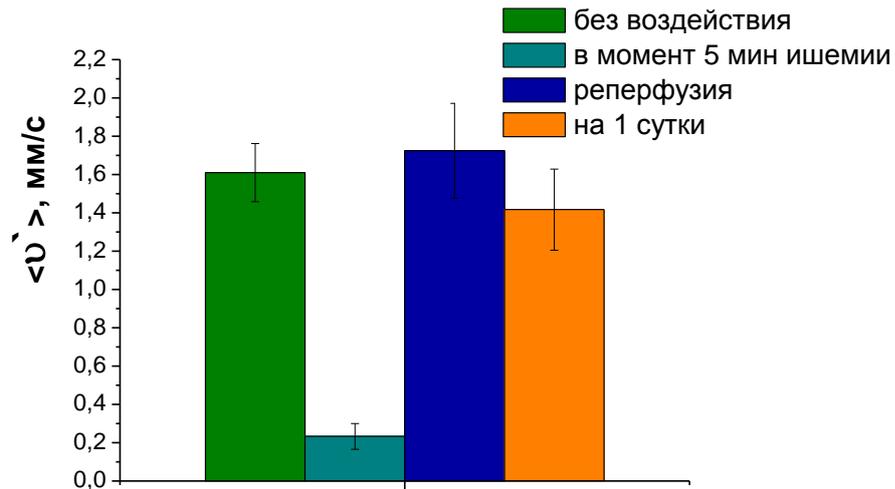
Некоторое снижение скорости кровотока (перфузии) в начале эксперимента объясняется воздействием факторов, связанных с извлечением органа из брюшной полости. Однако эти изменения не являются статистически значимыми и в дальнейшем с течением времени эксперимента практически не проявляются.

На рисунке 15 продемонстрированы фотографии поджелудочной железы в зависимости от функционального состояния поджелудочной железы.

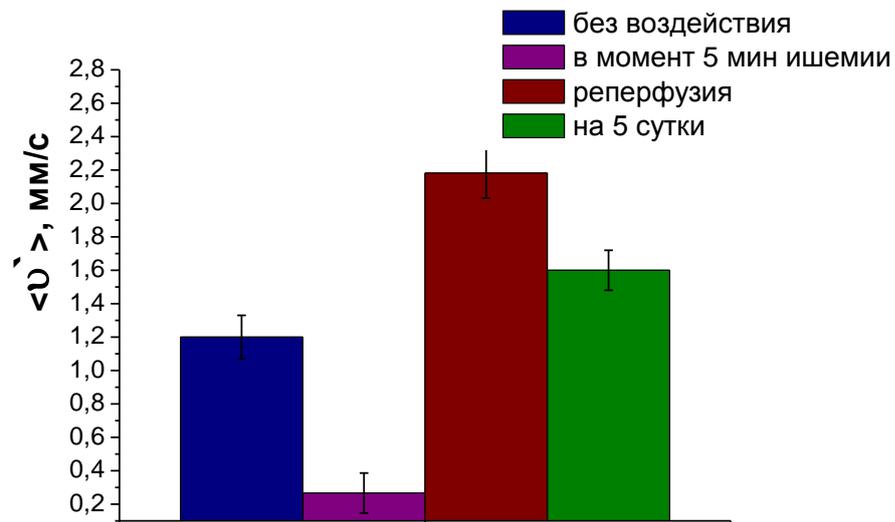


**Рисунок 15.** Изображение поджелудочной железы: а) здоровая, б) на 2 сутки после моделирования панкреатита с ишемией 20 мин, в) на 5 сутки после моделирования панкреатита с ишемией 20 мин

На рисунке 16 представлены результаты оценки микроциркуляции крови у третьей и четвертой групп, где исследования кровотока проводились до ишемии, в момент 5 минутной ишемии, а также через сутки после начала опыта (а) и на 5 сутки после начала эксперимента (б).



а)



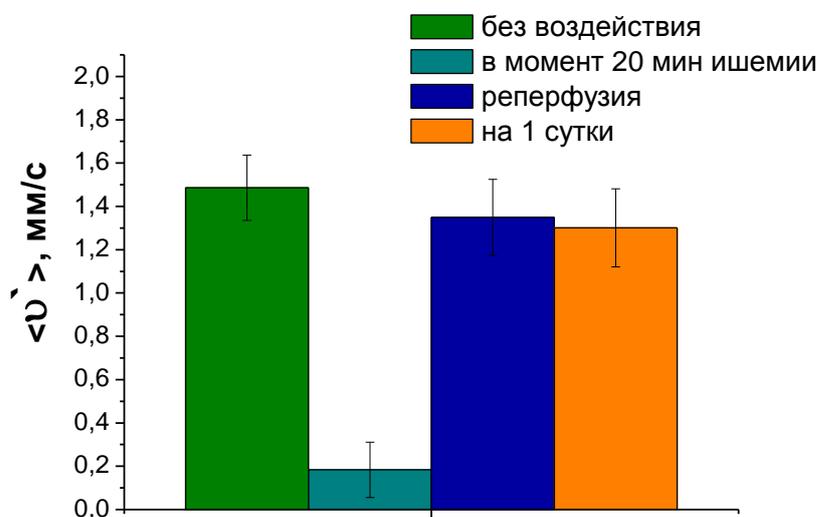
б)

**Рисунок 16.** Динамика микроциркуляции крови в зависимости от функционального состояния поджелудочной железы крысы: (а) до ишемии, в момент 5 минутной ишемии, через сутки после начала опыта; (б) до ишемии, в момент 5 минутной ишемии, на 5 сутки после начала эксперимента.

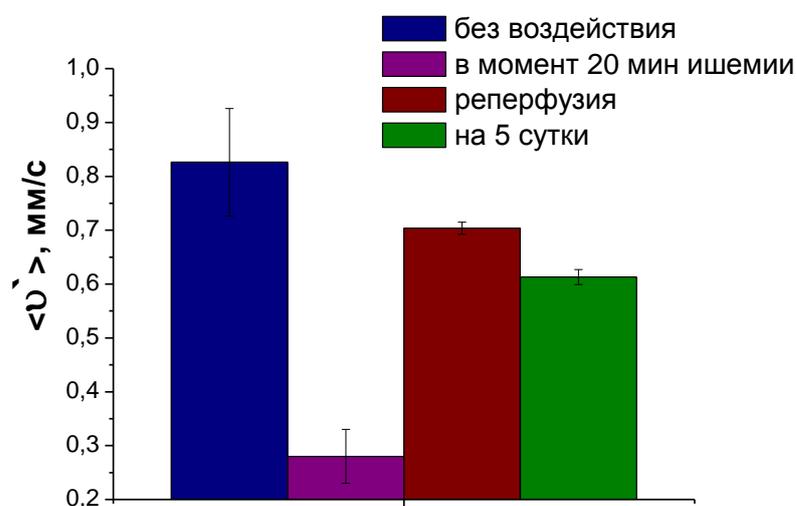
В результате возобновления кровотока после локальной ишемии происходило резкое увеличение скорости кровотока.

Далее на рисунке 17 представлены результаты оценки микроциркуляции крови у последних двух групп, где исследования кровотока проводились до

ишемии, в момент 20 минутной ишемии, а также через сутки после начала опыта (а) и на 5 сутки после начала эксперимента (б).



а)



б)

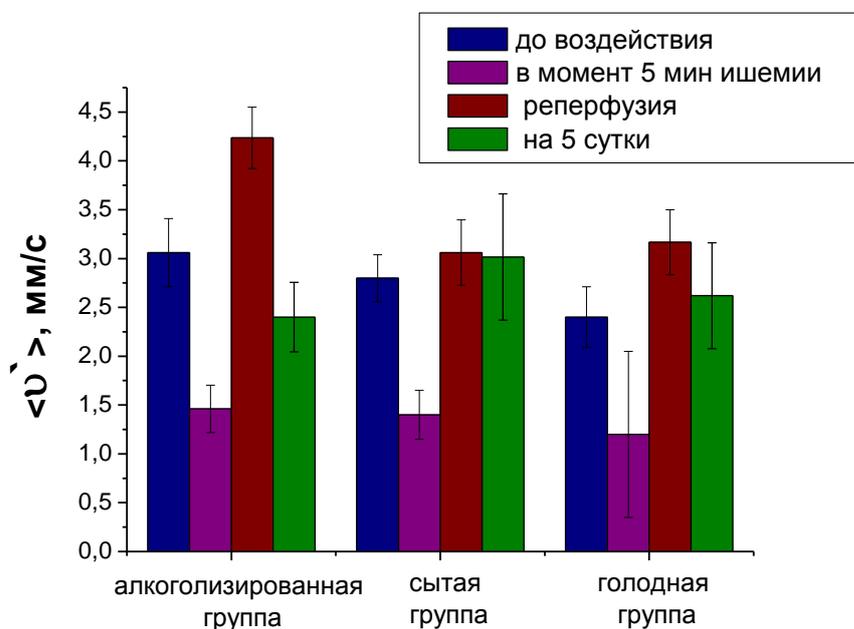
**Рисунок 17.** Динамика микроциркуляции крови в зависимости от функционального состояния поджелудочной железы крысы: (а) до ишемии, в момент 20 минутной ишемии, через сутки после начала опыта; (б) до ишемии, в момент 20 минутной ишемии, на 5 сутки после начала эксперимента.

В последних группах исследуемых животных (ишемия 20 минут) не наблюдалось ярко выраженного увеличения скорости кровотока при реперфузии,

что возможно было вызвано сильными структурными изменениями при длительной ишемии.

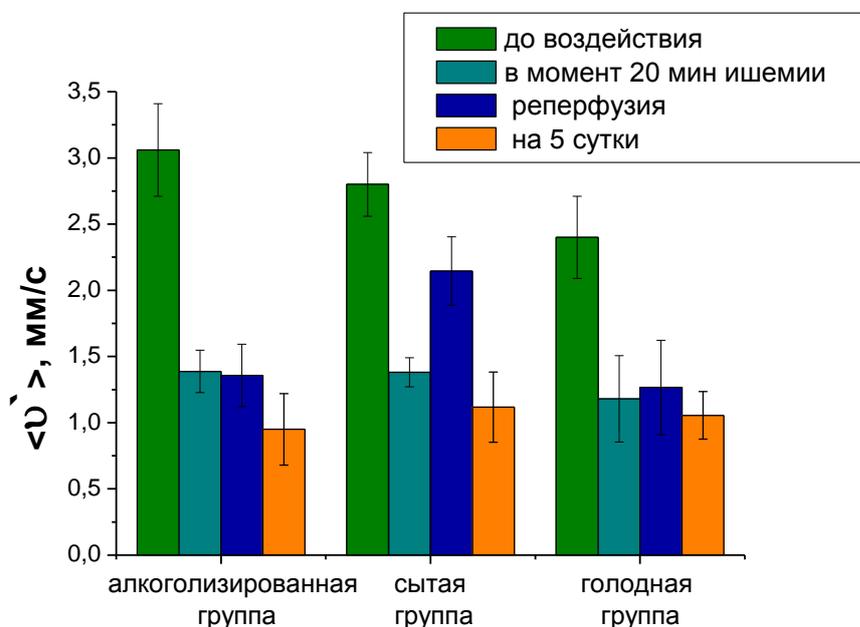
Результаты гистологического анализа показали, что в группе с 5 минутной ишемией в ткани поджелудочной железы появлялись отек стромы, неравномерное кровенаполнение сосудов, единичные кровоизлияния, феномен сепарации, мелкие очаги некроза. А в группе с 20 минутной ишемией половина животных погибла от панкреонекроза на 3–4-е сутки эксперимента. Среди выживших животных гистологически наряду с нарушениями кровообращения отмечался лейкостаз с лейкодиapedезом в строму, развитие распространенных очагов некроза, что говорит о развитии панкреонекроза.

Далее будут рассмотрены результаты, полученные во втором этапе исследований. На рисунке 18 представлены результаты оценки микроциркуляции крови у первой, третьей и пятой групп, где исследования кровотока проводились на алкоголизованных, сытых, голодных крысах до ишемии, в момент 5 минутной ишемии, и на 5 сутки после начала эксперимента.



**Рисунок 18.** Изменение микроциркуляции крови у алкоголизованных, сытых, голодных крыс в зависимости от функционального состояния поджелудочной железы.

На рисунке 19 представлены результаты оценки микроциркуляции крови у второй, четвертой и шестой групп, где исследования кровотока проводились на алкоголизованных, сытых, голодных крысах до ишемии, в момент 20 минутной ишемии, и на 5 сутки после начала эксперимента.



**Рисунок 19.** Изменение микроциркуляции крови у алкоголизованных, сытых, голодных крыс в зависимости от функционального состояния поджелудочной железы.

Исходные значения контраста спекл-изображения у алкоголизованных крыс достоверно ( $p < 0,05$ ) ниже значений у голодных крыс. Разница между значениями контраста спекл-изображения алкоголизованных и сытых крыс, а также группами голодных и сытых крыс, не достигала статистической значимости.

Вектор направленности реперфузионных изменений отличается в зависимости от продолжительности ишемии поджелудочной железы. Выраженность реперфузионного синдрома отличается у сытых, голодных и алкоголизованных крыс. После прекращения частичной ишемизации поджелудочной железы длительностью 5 минут приведенная скорость кровотока статистически значимо больше исходной. Это свидетельствует о развитии реактивной гиперемии в органе при реперфузии. В большей степени это выражено

в группе алкоголизованных животных. После прекращения частичной ишемизации поджелудочной железы длительностью 20 мин приведенная скорость кровотока останавливается на исходных уровнях, что соответствует отсутствию реактивной гиперемии. При этом треть животных погибает в первые 5 суток от начала опыта. Большая часть (80%) погибших животных представлена группой крыс, подвергшихся алкоголизации.

#### 4.4 Выводы

Лазерная спекл-контрастная визуализация является эффективным методом мониторинга микрогемодинамики поджелудочной железы. Метод лазерной спекл-контрастной визуализации позволяет контролировать степень сокращения кровотока в сосудах поджелудочной железы при создании локальной ишемии путем компрессии магистральных сосудов. При полном пережатии кровотока с длительной ишемией (20 минут) половина животных погибает от панкреонекроза на 3–4-е сутки эксперимента. Среди выживших животных гистологически, наряду с нарушениями кровообращения, отмечался лейкостаз с лейко-диapedезом в строму, развитие распространенных очагов некроза, что говорит о развитии панкреонекроза. После пятиминутного сокращения кровотока в тканях поджелудочной железы на 50%, возникает реактивная гиперемия, клинические и морфологические изменения носят обратимый характер. После двадцатиминутного сокращения кровотока на 50%, реактивной гиперемии нет, клинически и морфологически развивается панкреатит, не достигающий степени панкреонекроза. При этом треть животных погибает в течение первых 5 суток от начала опыта. Большая часть (80%) погибших животных представлена группой крыс, подвергшихся алкоголизации. В связи с этим видно, что поджелудочная железа алкоголизованных крыс более чувствительна к ишемии, чем у групп сытых и голодных крыс.

## **Глава 5. Оценка влияния оптических просветляющих агентов на микроциркуляцию крови в тканях лабораторных животных**

### **5.1 Введение**

Поскольку оптические технологии имеют быстрое и продуктивное развитие, оптические методы диагностики, мониторинга и лечения широко вошли в употребление в медицине и косметологии. Оптические методы обеспечивают безопасный и неинвазивный мониторинг биологических тканей и жидкостей, эффективную и целенаправленную хирургию, является информативным диагностическим аппаратом. Тем не менее, дальнейшее развитие оптических технологий часто ограничено высоким рассеянием света в биологических тканях. Сильное рассеяние света обусловлено неоднородной структурой ткани, которая включает в себя компоненты с различными показателями преломления: клеточные органеллы, волокна, интерстициальная жидкость [128-130].

Оптическое просветление ткани помогает решить проблему высокой степени рассеяния света в ткани, что ограничивает применение оптических методов в биомедицинской оптике из-за низкой глубины проникновения света. Техника оптического просветления эффективно используется для исследования различных тканей: кожи [129-139], скелетных мышц [140, 141], твёрдой мозговой оболочки [115], склеры глаза [128, 130] и других [128,129].

Различные ОПА применяются для оптического просветления биотканей и крови, такие как глюкоза [115, 128-130, 141], фруктоза [129], рибоза [129], маннитол [115], глицерин [128-130], этиленгликоль [141], полиэтиленгликоль [128,131] и некоторые другие [128-130]. Также с ОПА используются химические усилители проникновения их в ткань такие, как ДМСО [136], пропиленгликоль [131] и тиазон [130].

Возможность использования водных растворов маннитола для оптического просветления мембран головного мозга обсуждалась в работах [115, 142].

Влияние раствора маннитола на клетки печени было исследовано в работе [143]. Увеличение концентрации глюкозы или маннитола в ткани приводит к выравниванию показателей преломления рассеивателей и внутритканевой жидкости и, как следствие этого, снижению светорассеяния в биоткани. Компьютерное моделирование показывает, что применение в качестве просветляющих агентов водных растворов глюкозы вызывает значительное снижение светорассеяния и увеличение глубины проникновения зондирующего излучения в биоткани [128-130]. Проведенные исследования в работах показывают [144,145], что глицерин является высоко эффективным средством для оптического просветления биотканей, хотя механизм оптического просветления в данном случае основан в основном на осмотической дегидратации биотканей.

Методика ОП не применяется только к визуализации *in vitro*, но и показывает огромный потенциал оптической визуализации, диагностики и терапии *in vivo*. Перед тем как метод ОП применять *in vivo*, необходимо исследовать безопасность влияния ОПА на биоткань, например, существуют ли краткосрочные или долгосрочные побочные эффекты на коже, оказывает ли влияние на кровеносные сосуды, органы. В связи с этим важно знать, как именно ОПА влияют на микроциркуляцию крови, какие изменения они вызывают в микроциркуляторном русле, обратимые или нет, вызывают ли вообще изменения. Например, Варгас и др. исследовали влияние гиперосмотических агентов на морфологические изменения кровеносных сосудов [146]. Растворы глицерина с различными концентрациями (100% и 75%) были непосредственно применены на коже спины хомяка *in vivo*. Они обнаружили, что применение глицерина вызывает закупорку кровеносных сосудов. Тем не менее, морфологические изменения в кровеносных сосудах могли быть отменены путем применения фосфатно-буферного солевого раствора. Галанжа и др. также показали, что непосредственное применение глицерина и раствора глюкозы в микрососудах брюжейки крысы будут вызывать кратковременное местную закупорку микрососудов с некоторой степенью дилатации, но побочный эффект может быть уменьшен путем уменьшения концентрации ОПА [147]. Таким образом, задачи по

проектированию методики ОП применительно к *in vivo* исследованиям используются не только для оценки просветляющих эффектов и продолжительности действия химических агентов, но и для оценки влияния ОПА на физиологические функции.

В данной главе будут представлены экспериментальные исследования по оценке влияния различных ОПА на микроциркуляцию крови в поверхностных тканях внутренних органов.

## 5.2 Материалы и методы

Данные исследования по оценке влияния различных ОПА на микроциркуляцию крови в поверхностных тканях внутренних органов проводились с использованием установки, схема которой представлена на рисунке 4 главы 2.

В качестве исследуемых ОПА были взяты растворы:

- *40% водный раствор глюкозы.* Двухкомпонентный водный раствор глюкозы с концентрацией 0.4 г/мл, был приготовлен с использованием порошкообразного моногидрата глюкозы («ХимМед», Россия) и теплой дистиллированной воды. Измерение показателя преломления раствора  $n$  было выполнено на рефрактометре Аббе на длине волны 589 нм, его значение составило  $n=1.391$ . Мониторинг микроциркуляции крови в поверхностных слоях внутренних органов лабораторных крыс на основе анализа контраста спекл-изображения был проведен на беспородных белых крысах в количестве 8 штук массой 300 – 450 г. В качестве исследуемой области был исследован участок абдоминальной жировой ткани. Раствор наносился на исследуемый сосуд пипеткой в количестве 1 мл.
- *Раствор фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%).* Трехкомпонентный раствор фруктозы был приготовлен с использованием фруктозы и теплой дистиллированной воды, после чего добавлялся 99% этиловый спирт. Измерение показателя преломления раствора  $n$  было выполнено на

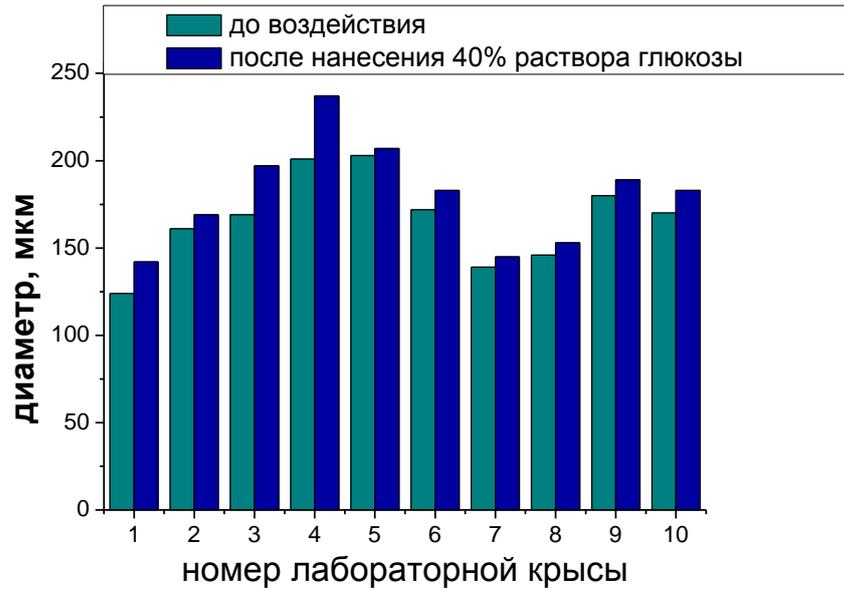
рефрактометре Аббе на длине волны 589 нм, его значение составило  $n=1.408$ . Методика проведения эксперимента проводилась аналогично с экспериментом по оценке влияния 40% водного раствора глюкозы.

Выбор данных растворов обусловлен высокой степенью просветления. В многих работах продемонстрирована эффективность данных растворов по просветлению биологических тканей [128-130].

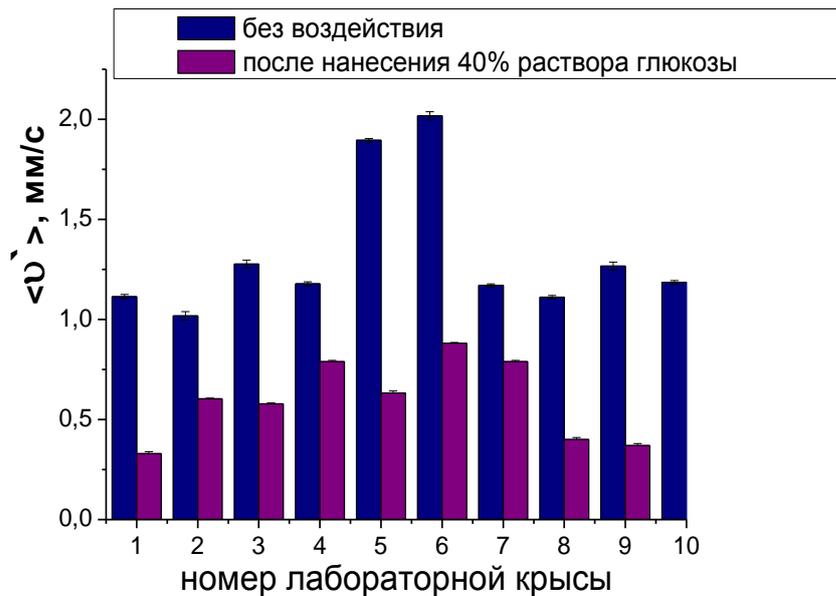
### **5.3 Результаты и их обсуждение**

#### *40% водный раствор глюкозы*

Характер морфологических изменений и изменений микроциркуляции крови под влиянием иммерсионной жидкости (40% водный раствор глюкозы,  $n=1.391$ ) представлен на рис 20.



а)



б)

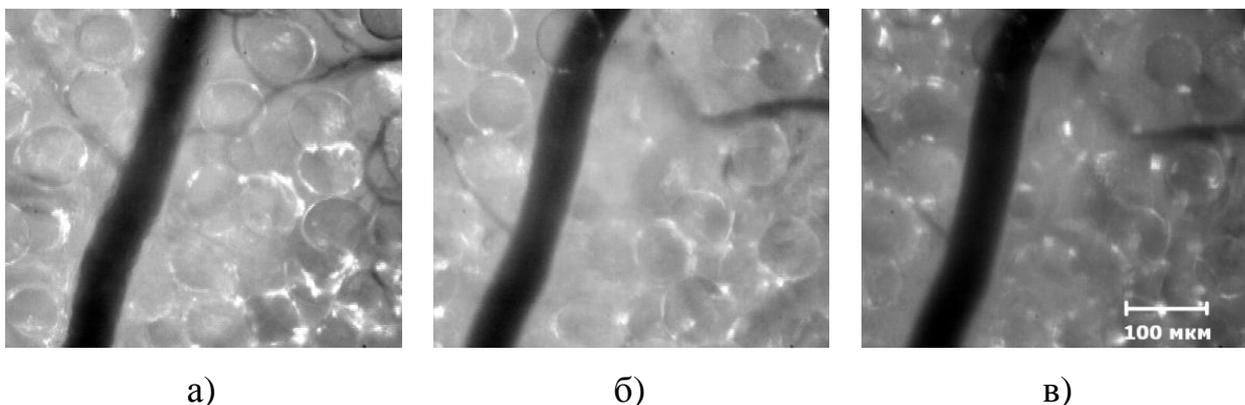
**Рисунок 20.** Изменение диаметра кровеносных сосудов (а) и приведенной скорости кровотока (б) в сосудах абдоминальной жировой ткани

Результаты показывают увеличение диаметра исследуемого сосуда (рис. 20а) после нанесения раствора, увеличение приведенной скорости кровотока (рис.20б). В течение последующего времени было замечено, что контраст спекл-изображения не достиг начальных значений, это говорит о том, что кровоток не

восстановился. Характер данных изменений соответствует ожидаемому отклику на воздействие 40% водного раствора глюкозы на микроциркуляцию крови. В работе [148] применили методику лазерной спекл-визуализации для оценки краткосрочного и долгосрочного эффектов влияния глицерина и глюкозы разных концентраций на кровеносные сосуды в куриной хорионлантоисной мембране, и характер изменений при воздействии раствора глюкозы соответствует полученным нами результатам. Скорость кровотока также снижалась. Сравнение данных результатов свидетельствует о правдивости полученных данных и подтверждает использование данной техники для оценки влияния ОПА на микроциркуляцию крови.

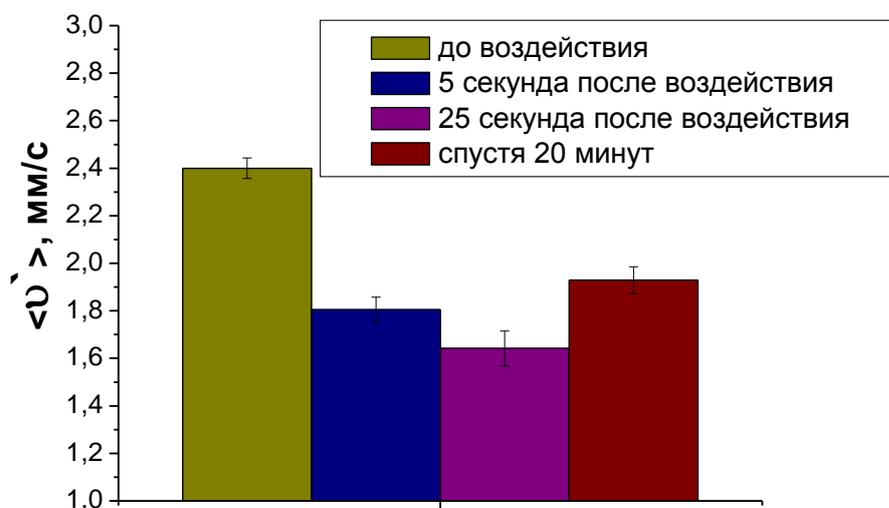
*Раствор фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%)*

Исследование характера морфологических изменений (рис. 21) под влиянием иммерсионной жидкости (раствор фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%),  $n=1.408$ ) показало уширение диаметра сосуда в первые секунды после нанесения раствора, на 25 секунде диаметр увеличился на 15 % и больше не изменялся.



**Рисунок 21.** Микроскопические изображения сосуда абдоминальной жировой ткани: а) до воздействия раствора фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%) диаметр  $61 \pm 1$  мкм; б) спустя 5 секунд после нанесения раствора фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%) диаметр  $69 \pm 2$  мкм; в) спустя 25 секунд после нанесения раствора фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%) диаметр  $71 \pm 2$  мкм.

На рисунке 22 представлена диаграмма изменения приведенной скорости кровотока в сосудах абдоминальной жировой ткани под воздействием раствора фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%) в разные моменты времени (до воздействия, 5 секунд и 25 секунд спустя после нанесения раствора, спустя 20 минут). В течение последующего времени было замечено, что контраст спекл-изображения, соответственно скорость кровотока не достигли начальных значений, это говорит о том, что кровоток не восстановился.



**Рисунок 22.** Изменение приведенной скорости кровотока под воздействием раствора фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%) в разные моменты времени

Полученные данные показали, что, не смотря на высокую эффективность данного раствора в просветлении биологических тканей, характер его влияния на микроциркуляцию достаточно высок, кровоток снижается на 25 % и спустя 20 минут не восстанавливается, возможно, через более длительное время кровоток может восстановиться до своих начальных значений.

#### 5.4 Выводы

В связи с применением осмотического раствора глюкозы происходит изменение проницаемости сосуда, раствор начинает притягивать воду из окружающих тканей, тем самым увеличивая диаметр сосуда, и, соответственно,

замедление тока крови [128]. Результаты показывают, что 40% раствор глюкозы обеспечивает немедленное уширение кровеносных сосудов на 9% и спад приведенной скорости кровотока примерно на 40%. Данный характер изменений соответствует результатам, полученным в работах [130,149], в связи с этим результаты, полученные по оценке влияния других просветляющих агентов можно считать достоверными. При нанесении раствора фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%) диаметр сосудов увеличивается примерно на 14%, а приведенная скорость кровотока снижается на 25% и в течение 20 минут не восстанавливается.

Метод спекл-контрастной визуализации применяемый для измерения скорости кровотока в режиме реального времени является перспективным методом для использования в исследованиях оценки влияния оптических просветляющих агентов на микроциркуляцию крови в сосудах поверхностных слоев биологических тканей. Одним из возможных применений метода является мониторинг церебральной микроциркуляции крови в головном мозге мелких животных, или новорожденных [121] без трепанации в условиях использования метода оптического просветления кожи головы и черепно-мозговых тканей с помощью гиперосмотических агентов [115].

## **Глава 6. Исследование микроциркуляции крови в условиях развития аллоксанового диабета у лабораторных животных**

### **6.1 Введение**

Многие заболевания, такие как сердечно-сосудистые заболевания, атеросклероз, сахарный диабет, хроническая венозная недостаточность вызывают функциональные и морфологические изменения в кровеносных сосудах. При диабете, возникает диабетическая ангиопатия (поражение кровеносных сосудов). Есть два типа диабетической ангиопатии: микроангиопатия, возникающая в результате разрушения мелких сосудов - капилляров, артериол, венул и макроангиопатия - ишемическая болезнь головного мозга, окклюзия периферических сосудов - возникающая в результате разрушения крупных сосудов [150]. Главным признаком диабета является повышение уровня глюкозы в крови, это происходит по причине того, что выработка пептидного гормона инсулина в бета-клетках поджелудочной железы недостаточна (тип 1 инсулин-зависимый) или клетки не реагирует должным образом на производство инсулина (тип II, инсулиннезависимый) [151,152]. По данным Всемирной организации здравоохранения, заболеваемость диабетом в мире составляет около 347 млн. человек. Диабет занимает третье место в мире после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [151]. Сахарный диабет 1 типа является известной причиной повреждения микрососудов, что приводит в конечном итоге к уничтожению капилляров. Этот тип диабета в результате приводит к потере капилляров и/или образованию бессосудистых областей, увеличению диаметра капилляров (микроаневризмы), ангиогенезу (очень извилистые или разветвленные капиллярные петли, в окружении нормальных капиллярных петель), местным микрогеморрагиям. Гемодинамические изменения при диабете способствуют возникновению гипоксемии в различных органах, что приводит к ретинопатии, нефропатии, нейропатии, ишемической болезни сердца, и заболеваниям периферических артерий [152-154]. При этом все эти изменения кровотока в

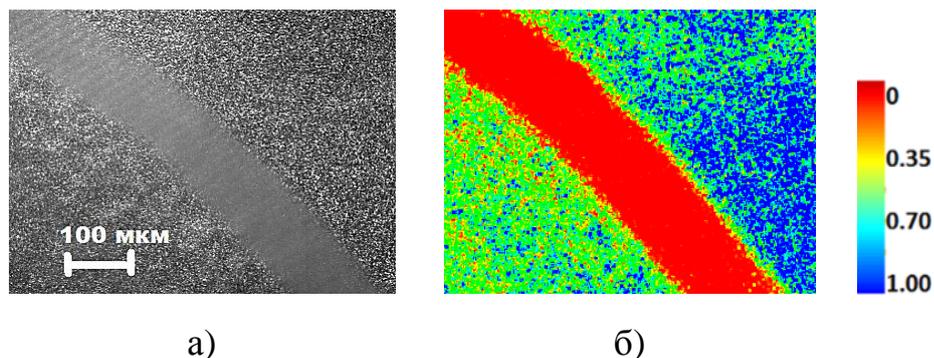
сосудах и микроциркуляции крови связаны в первую очередь с эндотелиальной дисфункцией. Функции эндотелия включают в себя регулирование целостности сосуда, рост сосудов и ремоделирование, рост тканей и обмен веществ, иммунные реакции, клеточную адгезию, ангиогенез, гемостаз и проницаемость сосудов. Эндотелиальная дисфункция характеризуется такими особенностями, как снижение эндотелий-опосредованной вазорелаксации, регулирования гемодинамики, чрезмерная генерация реактивных форм кислорода, увеличение окислительного стресса, и повышенная проницаемость клеточного слоя [154].

В данной главе представлены результаты оценки изменений микроциркуляции крови в поджелудочной железе в условиях развития аллоксанового диабета методом спекл-контрастной визуализации.

## **6.2 Материалы и методы**

Для мониторинга микроциркуляции крови в сосудах поджелудочной железы в условиях развития аллоксанового диабета методом спекл-контрастной визуализации был использован специально разработанный лабораторный образец устройства, схема которого представлена на рисунке 4 главы 2.

Визуализация микроциркуляции крови в сосудах поджелудочной железы в условиях развития аллоксанового диабета была проведена на беспородных белых крысах в количестве 32 штук массой 300 – 450 г. В качестве исследуемой области был исследован участок поджелудочной железы. На рисунке 23 представлено типичное черно-белое спекл-изображение сосуда поджелудочной железы в когерентном свете (630 нм) (а) и рассчитанное распределение контраста спеклов (б).



**Рисунок 23.** Изображение сосуда поджелудочной железы: в когерентном свете (630 нм) (а) и рассчитанное распределение контраста спеклов (1-0) (б).

Лабораторные животные были разделены на две группы, первая включала в себя здоровых животных, вторая - животных с привитым аллоксановым диабетом. Аллоксановый диабет прививался лабораторным животным путем однократного подкожного введения аллоксана в дозе 220 мг / кг массы тела животного, схематичное изображение представлено на рисунке 24. Через 10 дней после инъекции аллоксана, за счет индуцированного нарушения функции поджелудочной железы у крыс развивался диабет. Состояние диабета подтверждалось увеличением уровня свободной глюкозы в крови. Для анализа уровня глюкозы в крови использовался глюкометр Ассу-Chek Perfoma Nano (Roche Diagnostics, Германия). Этот анализ показал увеличение уровня глюкозы в крови по сравнению с нормой. Средние значения уровня свободной глюкозы в крови до введения аллоксана и в день проведения эксперимента (спустя 16 дней) были  $120 \pm 16$ ,  $403 \pm 105$  мг/дл, соответственно.



**Рисунок 24.** Моделирование аллоксанового диабета.

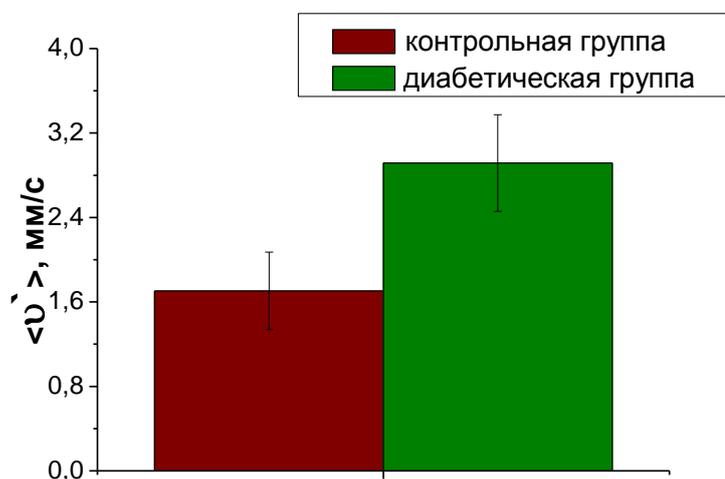
Под общим обезболиванием (внутримышечное введение анестетика) выполнялась лапароскопия. Значение диаметра исследуемых сосудов составляло  $180 \pm 50$  мкм. Была проведена оценка изменений микроциркуляции в условиях развития аллоксанового диабета. Помимо этого, представлены результаты исследований проницаемости кровеносных сосудов путем применения просветляющего агента «Омнипак-300» в 100% и 70% концентрации, а именно оценка его влияния на микроциркуляцию крови. «Омнипак-300» относится к так называемым неионным рентгеноконтрастным средствам. Раствор «Омнипак-300» представляет собой стерильный водный раствор бесцветного или желтоватого цвета, активным веществом которого является Йогексол. В зависимости от содержания данного вещества в растворе выпускают Омнипак 240, 300, 350 и т.д.. В наших исследованиях был выбран «Омнипак-300», который содержит 647 мг йогексола, это эквивалентно 300 мг органического йода на мл. Каждый миллилитр раствора йогексола содержит 1,21 мг трометамин и 0,1 мг динатрий-эдетат кальция с рН, доведенным от 6,8 до 7,7 с помощью хлористоводородной кислоты или гидроксида натрия. «Омнипак-300» имеет осмолярность приблизительно от 1,1 до 3,0 раз выше, чем в плазме (285 мОсм / кг воды) или

спинномозговой жидкости (301 мОсм / кг воды), является гипертоническим [155]. Для снижения вязкости «Омнипак-300» его концентрацию снизили путем добавления воды. Растворы наносились на исследуемый участок ткани с помощью пипетки в объеме 0.5 мл.

Все манипуляции на животных проведены в строгом соответствии с «Правилами проведения качественных клинических испытаний в РФ» (утв. МЗ РФ и введены в действие с 1 января 1999 г.), приложением 3 к приказу МЗ СССР №755 от 10.08.77, положениями Хельсинкской декларации (2000 г.) и рекомендациями, содержащимися в Директивах Европейского Сообщества (№86/609ЕС).

### 6.3 Результаты и обсуждение

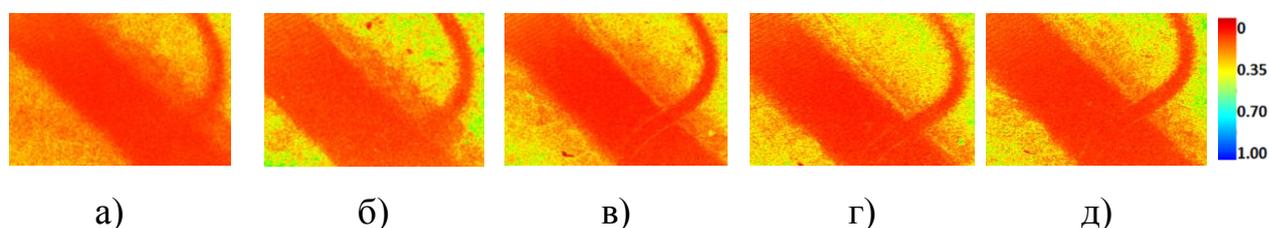
Результаты измерений приведенной скорости кровотока в сосудах поджелудочной железы контрольной и диабетической групп лабораторных крыс, показаны на рис. 25.



**Рисунок 25.** Изменение кровотока в сосудах поджелудочной железы в условиях развития аллоксанового диабета.

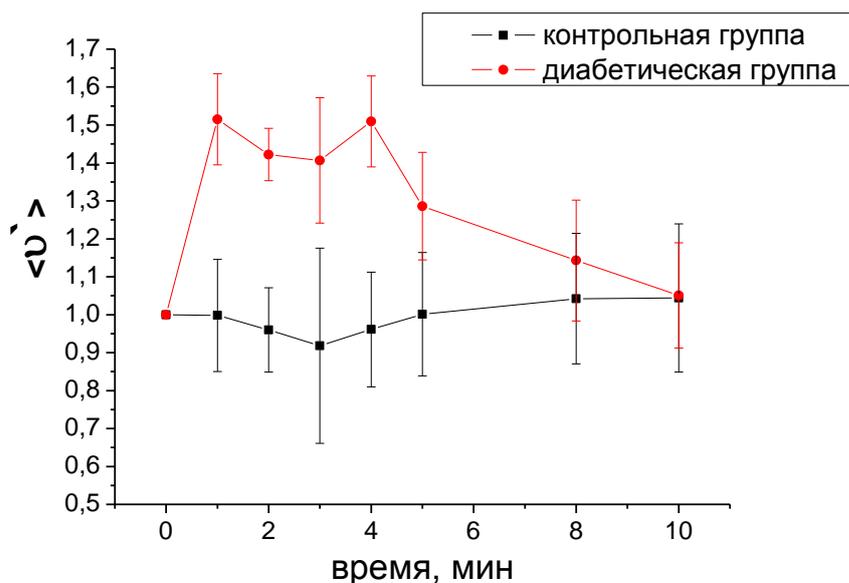
Развитие диабета повлияло на изменение микроциркуляции крови относительно контрольной группы животных. Из рисунка 25 видно, что уровень относительной перфузии кровотока выше уровня контрольной группы на 40%.

На рисунке 26 представлено рассчитанное распределение контраста спекл-изображений сосудов поджелудочной железы в различных состояниях кровотока при воздействии на него водного 70%-раствора «Омнипак-300». Использование данного просветляющего агента улучшило визуализацию исследуемых сосудов.

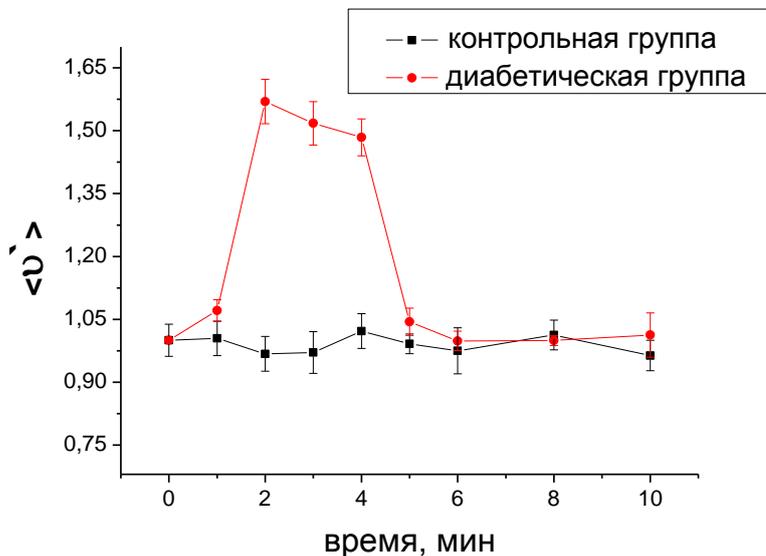


**Рисунок 26.** Рассчитанное распределение контраста спекл-изображений сосудов поджелудочной железы в различных состояниях кровотока при воздействии на него водного 70%-раствора «Омнипак-300»: а) до воздействия, б) через 1, в) 5, г) 7, д) 20 минут после нанесения агента.

Далее представлены нормированные кривые изменений микроциркуляции крови в сосудах поджелудочной железы лабораторных крыс контрольных и диабетических групп под воздействием водного 70% раствора «Омнипак-300» (рис.27) и 100% раствора «Омнипак-300» (рис. 28). Данные усреднялись по 8 лабораторным животным для каждой группы и для каждого раствора соответственно.



**Рисунок 27.** Изменения микроциркуляции крови в сосудах поджелудочной железы лабораторных крыс обеих групп под воздействием водного 70% раствора «Омнипак-300».



**Рисунок 28.** Изменения микроциркуляции крови в сосудах поджелудочной железы лабораторных крыс обеих групп под воздействием 100% раствора «Омнипак-300».

Из графика видно, что статистически значимых изменений кровотока под воздействием водного 70% раствора «Омнипак-300» и 100% раствора «Омнипак-

300» в здоровой группе животных не наблюдается, при этом в обеих диабетических группах животных отчетливо видно увеличение кровотока в течение 4 минут с последующим восстановлением кровотока. К 10 минуте кровотоки полностью восстанавливаются. Увеличение кровотока после нанесения просветляющего агента могло быть вызвано нарушением эндотелиальной проницаемости сосудов из-за развитого диабета и повышенным уровнем глюкозы в крови. Также было установлено, что диаметр сосудов под влиянием растворов не изменился.

#### **6.4 Выводы**

В ходе данных исследований было установлено, что лазерная спекл-контрастная визуализация может быть применима для мониторинга изменений микрогемодинамики поджелудочной железы в условиях развития диабета. Также метод лазерной спекл-контрастной визуализации позволяет контролировать изменения кровотока в сосудах поджелудочной железы при внешнем воздействии на сосуды не только здоровых животных, но и в условиях развития аллоксанового диабета, а именно нанесение водного 70% раствора «Омнипак-300» и раствора «Омнипак-300». Оценка влияния водного 70% раствора «Омнипак-300» показала увеличение приведенной скорости кровотока почти на 50% в диабетической группе животных, а оценка влияния 100% раствора «Омнипак-300» показала увеличение скорости кровотока почти на 65%, но к 10 минуте скорость кровотока полностью восстановилась, в контрольной группе кровотоки не изменились.

## Заключение

Экспериментальное исследование динамики скорости кровотока коры головного мозга в условиях развития стресс-индуцированного инсульта у лабораторных крыс демонстрирует высокую эффективность метода спекл-контрастной визуализации, разработанного устройства и алгоритма получения и обработки данных при мониторинге состояния церебральной микроциркуляции, обусловленного патологическими изменениями или воздействием сосудорасширяющих и сосудосуживающих препаратов. Также при применении данной методики удалось выявить изменения микроциркуляции крови в головном мозге на ранней стадии развития стресс-индуцированного инсульта, в прединсультной группе животных. Использование оптического волокна для доставки лазерного излучения является существенным преимуществом метода для будущих приложений.

Мониторинг кровотока методом спекл-контрастной визуализации при моделировании ишемии-реперфузии в тканях поджелудочной железы, показал, что данный метод эффективен для мониторинга микрогемодинамики поджелудочной железы. Метод лазерной спекл-контрастной визуализации позволяет контролировать степень сокращения кровотока в сосудах поджелудочной железы при создании локальной ишемии путем компрессии магистральных сосудов. Было установлено, что после пятиминутного сокращения кровотока в тканях поджелудочной железы на 50%, возникает реактивная гиперемия, клинические и морфологические изменения носят обратимый характер. После двадцатиминутного сокращения кровотока на 50%, реактивной гиперемии нет, клинически и морфологически развивается панкреатит, не достигающий степени панкреонекроза. При этом при полном пережатии кровотока с длительной ишемией (20 минут) половина животных погибает от панкреонекроза на 3–4-е сутки эксперимента. Среди выживших животных

гистологически наряду с нарушениями кровообращения отмечался лейкостаз с лейкодиapedезом в строму, развитие распространенных очагов некроза, что говорит о развитии панкреонекроза. Также большая часть (80%) погибших животных представлена группой крыс, подвергшихся алкоголизации. В связи с этим видно, что поджелудочная железа алкоголизированных крыс более чувствительна к ишемии, чем у групп сытых и голодных крыс.

Данный метод продемонстрировал свою эффективность по оценке влияния различных просветляющих агентов на микроциркуляцию крови в сосудах поверхностных тканей внутренних органов. Также он может быть применим для мониторинга изменений микрогемодинамики внутренних органов в условиях развития диабета. Метод спекл-контрастной визуализации позволяет контролировать изменения кровотока в сосудах поджелудочной железы при внешнем воздействии на сосуды не только здоровых животных, но и в условиях развития аллоксанового диабета.

Таким образом на многочисленных примерах в экспериментах на моделях ряда патологий животных показано, что метод спекл-контрастной визуализации позволяет осуществлять количественный мониторинг параметров кровотока, он достаточно прост и надежен и может быть рекомендован к широкому распространению в биомедицинских исследованиях. Способность метода спекл-контрастной визуализации производить оценку изменений скорости кровотока в режиме реального времени является перспективным для использования в трансоперационной и экстренной хирургии для оценки состояния внутренних органов и их микроциркуляции. Кроме того, одним из возможных применений метода является мониторинг мозговой микроциркуляции крови в головном мозге мелких животных, или новорожденных без трепанации в условиях использования метода оптического просветления кожи головы и черепно-мозговых тканей с помощью гиперосмотических агентов.

По результатам работы опубликованы статьи в реферируемых журналах и изданиях и в материалах международных и российских конференций:

### **Статьи, включенные в SCOPUS**

1. Vilensky M.A., Agafonov D.N., Timoshina P.A., Shipovskaya O.V., Novikov P.A., Zimnyakov D.A., Tuchin V.V. Full-field speckle correlation technique as applied to blood flow monitoring // Proc. SPIE. – 2011. - Vol. 7898.
2. Vilensky M.A. Semyachkina-Glushkovskaya O.V., Timoshina P.A., Berdnikova V.A., Kuznetsova Y.A., Agafonov D.N., Tuchin V.V. Monitoring of the microgemodynamic in an aggressive clinical behavior of cerebral hemorrhage using dynamic light scattering techniques // SPIE Proceedings. – 2012. - Vol. 8427
3. Kurochkin M.A., Timoshina P.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V. Advanced digital image processing for in vivo analysis of blood flow in capillary network // Asia Communications and Photonics Conference, ACPC. – 2014.
4. Rui Shi, Min Chen, Ruilin Wang, Cong Ma, Junbo Jin, Yuhua Lu, Polina Timoshina, Valery V. Tuchin, Dan Zhu, Optical clearing method for monitoring cutaneous microcirculation response to vasoactive drugs with high sensitivity // SPIE Proceedings. – 2014. - Vol. 8951.
5. Kurochkin M.A., Timoshina P.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V., «Advanced digital methods for blood flow flux analysis using  $\mu$ PIV approach // SPIE Proceedings. – 2015. - Vol. 9448.
6. Polina A. Timoshina, Rui Shi, Yang Zhang, Dan Zhu, Oxana V. Semyachkina-Glushkovskaya, Valery V. Tuchin, Qingming Luo Comparison of cerebral microcirculation of alloxan diabetes and healthy mice using laser speckle contrast imaging // SPIE Proceedings. – 2015. - Vol. 9448.

### **Статьи в журналах из Переченя ВАК**

7. Vilensky M.A., Semyachkina-Glushkovskaya O.V., Timoshina P.A., Kuznetsova Ya.V., Semyachkin-Glushkovsky I.A., Agafonov D.N., Tuchin V.V. Laser speckle-imaging of blood microcirculation in the brain cortex of laboratory rats in stress // Quantum Electronics. – 2012. - Vol. 42(6). - P. 489-494.

8. Агафонов Д.Н., Тимошина П.А., Виленский М.А., Федосов И.В., Тучин В.В. Исследование параметров микроциркуляции крови в области ногтевого ложа с использованием метода лазерной спекл визуализации // Известия Саратовского Университета. Новая Серия. Серия: Физика. -2011. - Т. 11. № 2. - С. 14-19.
9. Виленский М.А., Александров Д.А., Тимошина П.А., Тучин В.В., Скороход А.А., Яровой А.С. Возможности мониторинга кровотока в тканях поджелудочной железы методом «лазерной спекл-визуализации в норме и при реперфузии // Медицина экстремальных ситуаций. – 2013. - № 2 (44). - С. 28-32.

### **Прочие статьи**

10. Timoshina P.A, Jarovoi A.S., Alexandrov D.A., Semyachkina-Glushkovskaya O.V, Tuchin V.V., Полнопольная спекл-коррелометрия в исследованиях микроциркуляции крови для трансоперационного мониторинга // XII Всероссийская молодежная Самарская конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике, Сборник конкурсных докладов. – 2014. - с. 422-433.
11. Александров Д.А., Тимошина П.А., Тучин В.В., Маслякова Г.Н., Палатова Т.В., Скороход А.А., Лукашевич К.А., Яровой А.С. Динамика показателей лазерной спекл-визуализации кровотока и морфологических изменений в тканях при полной временной локальной ишемии поджелудочной железы // Саратовский Научно-Медицинский Журнал. - 2014. - Т. 10. № 4. - С. 596-600.
12. Tuchina D.K., Bashkatov A.N., Timoshina P.A., Genina E.A., Tuchin V.V. Study of the Optical Clearing Kinetics of Skin Using Aqueous 40%-glucose Solution // AIP Conf. Proc. – 2014. - Vol. 1688.
13. Тучина Д.К., Тимошина П.А., Зюрюкина О.А., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. Исследование кинетики оптического просветления кожи человека *in vivo*», // Материалы всероссийской научной школы-семинара – 2015. - С. 90-92.

14. Акчурин Г.Г., Акчурин Ге.Г., Алибади З.Х., Тимошина П.А., «Динамика локальных температурных полей при воздействии ик лазерного излучения на сердце крысы *in vivo* // Материалы всероссийской научной школы-семинара. – 2015. - С. 90-92.
15. Д.К. Тучина, П.А. Тимошина, А.С. Абдурашитов, М.М. Сагатова, Е.М. Зинченко, О.В. Семячкина-Глушковская, В.В. Тучин, «Применение оптических просветляющих агентов для повышения качества визуализации мозгового кровотока у новорожденных мышей // Материалы Всероссийской научной школы-семинара. – 2015. - С. 76-80.
16. Александров Д.А., Тимошина П.А., Тучин В.В., Маслякова Г.Н., Палатова Т.В., Седов Д.С., Измайлов Р.Р. Динамика показателей лазерной спекл-визуализации кровотока в тканях при временной частичной локальной ишемии поджелудочной железы у голодных, сытых и алкоголизированных крыс // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2016. - 12 (2). – С.106–109.

## Список литературы:

1. Leahy M.J., de Mul F.F., Nilsson G.E., Maniewski R. Principles and practice of the laser-Doppler perfusion technique // Technol. Health Care. – 1999. – V.7. - P. 143.
2. Yaoeda K., Shirakashi M., Funaki S., Nakatsue T., Abe H. Measurement of microcirculation in the optic nerve head by laser speckle flowgraphy and scanning laser doppler flowmetry // Am. J. Ophtalmol. – 2000. - V.129 – 2000 - P.734.
3. Hanazawa S., Prewitt R.L., Terzis J.K. J. Reconstr. Microsurg. He effect of pentoxifylline on ischemia and reperfusion injury in the rat cremaster muscle // J. Reconstructive Microsurg. – 1994. - V.10. - P.21.
4. Dixon J.B., Zawieja D.C., Gashev A.A., Coté G.L. Measuring microlymphatic flow using fast video microscopy //J. Biomed. Opt. - 2005. – V.10, 064016
5. Lipowsky H.H., Usami S. and Chien S. In vivo measurements of "apparent viscosity" and microvessel hematocrit in the mesentery of the cat //Microvasc. Res. - 1980. - V. 19. - P. 297-319.
6. Chen Z.P., Milner T.E., Dave D., Nelson J.S. Optical doppler tomographic imaging of uid ow velocity in highly scattering media // Opt. Lett. – 1997. - V.22. - P.64.
7. Schvartzman P.R., White R.D. Textbook of Cardiovascular Medicine // Ed. by E.J.Topol. - Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. – 2002. - P. 112.
8. Bonner R., Nossal R. Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue // Appl. Opt. – 1981. – V.20. – P. 2097–2107.
9. Serov A., Steinacher B., Lasser T. Full-field laser Doppler perfusion imaging and monitoring with an intelligent CMOS camera // Opt. Express. – 2005. – V.13. – P.3681–3689.

10. Dunn A.K., Bolay H., Moskowitz M.A., Boas D.A. Impact of velocity distribution assumption on simplified laser speckle imaging equation // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2001. – V. 21. – P. 195–201.
11. Peiponen K.E. Optical measurement techniques: innovations for industry and the lifesciences / K.-E.Peiponen, R.Myllyla, A.V.Priezzhev.- Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. – P. 155
12. Tuchin V.V. Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses / Ed. by V. V. Tuchin. — Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2011. — P. 24.
13. Zimnyakov D.A. Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science / Ed. by Tuchin V.V. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. - V.1. - P. 3–41.
14. Виленский М.А., Агафонов Д.Н., Зимняков Д.А., Тучин В.В., Здражевский Р.А. Спекл-корреляционный анализ микрокапиллярного кровотока ногтевого ложа // Квант. электрон. – 2011. – V.41, № 4. - 324-328.
15. Briers J. D. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging // Institute of Physics Publishing, Physiol. Meas. – 2001. – V. 22. – P. 35–66.
16. Зимняков Д. А., Брайерс Дж. Д., Тучин В.В. Оптическая биомедицинская диагностика / В.В. Тучин. – М: Физматлит, 2007. - Т.2. - С. 284-321.
17. Виленский М. А. Спекл-коррелометрия полного поля: методы и приложения в диагностике случайно-неоднородных сред : диссертация ... кандидата физ.-мат. наук : 01.04.21 / Виленский Максим Алексеевич. – С., - 2010. –175 С.
18. Polzer K., Schuhfried F., Heeger H. Rheography /Polzer K., Schuhfried F., Heeger H., Cardiac Department of the Hanusch-Hospital, Vienna: 1958, 148 P.
19. Эниня Р. И. Реография, как метод оценки мозгового кровообращения. Рига: Зинатне, 1973. - 123 С.

20. Zubarev A.M., Zorina G.A., Kiseleva O.S., Amman-Ben-Salem L. Rheocardiographic evaluation of cardiohemokinetics // Russian Journal of Biomechanics. – 2000.- V.4, №4.- P. 44-49.
21. Козлов, В. А., Артюшенко, Н. К., Шалак, О. В. и др. Ультразвуковая доплерография сосудов макро-и микроциркуляторного русла тканей полости рта, лица и шеи: учеб.-метод. пособие. Санкт-Петербург, 1999. - 22 С.
22. Кунцевич, Г. И. Ультразвуковая доплерография сосудов дуги аорты и их ветвей: методические рекомендации. М., 1996. - 20 С.
23. Кошкин В.М., Гирина М.Б., Каралкин А.В. и др. Исследование микроциркуляции при хронической венозной недостаточности нижних конечностей, учеб.-метод. пособие. М.: 2006. – 20 С.
24. Garhofer G., Werkmeister R., Dragostinoff N., Schmetterer L. Neurovascular dysfunction precedes neural dysfunction in the retina of patients with type 1 diabetes neurovascular dysfunction precedes neural dysfunction // Inv. Opht. & Vis. Sci. – 2012. – V.53, № 2 – P. 698.
25. Cherecheanu P., Garhofer G., Schmidl D., Werkmeister R., and Schmetterer L. Ocular perfusion pressure and ocular blood flow in glaucoma // Curr. Opin. Pharmacol. – 2013. – V.13 – P.36.
26. Pemp B., Polska E., Garhofer G., Bayerle-Eder M., Kautzky-Willer A., and Schmetterer L. Retinal blood flow in type 1 diabetic patients with no or mild diabetic retinopathy during euglycemic clamp // Diabetes Care. – 2010. - V. 33. – P. 2038.
27. Doblhoff-Dier V., Schmetterer L., Vilser W., Garhöfer G., Gröschl M., Rainer L., Werkmeister R. M. Measurement of the total retinal blood flow using dual beam fourier-domain doppler optical coherence tomography with orthogonal detection planes // Biomedical optics express. – 2014. – V. 5, № 2. P. 630.
28. Feuerstein D., Takagaki M., Gramer M., Manning A., Endepols H., Vollmar S., Yoshimine T., Strong A. J., Graf R., Backes H. Detecting tissue deterioration

- after brain injury: regional blood flow level versus capacity to raise blood flow // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2014. V. 53, № 10. – 1038.
29. Sigal I., Gad R., Caravaca-Aguirre M., Atchia Y., Conkey D., R. Piestun, Ofer L. Laser speckle contrast imaging with extended depth of field for in-vivo tissue imaging // *Biomed. Opt. Express*. – 2014 – V. 5, № 1. – P. 123–134.
30. Briers D., Duncan D., Hirst E. // *J. Biomed. Opt.* – 2013. – V. 18, № 6. - 066018.
31. Meglinski I., Tuchin V. Diffusing wave spectroscopy: application for blood diagnostics / *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science*, 2<sup>nd</sup> ed., V. V. Tuchin (ed.), Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 2013. – P.149–166.
32. Meglinski I., Kal'chenko V., Kuznetsov Y., Kuznik B., Tuchin V. Towards the nature of biological zero in the dynamic light scattering diagnostic modalities // *Dokl. Physics*. - 2013. - V.58, № 8. – P.323–326.
33. Pinhas A., Dubow M., Shah N., Chui T. Y., Scoles D., Sulai Y. N., Weitz R., Walsh J. B., Carroll J., Dubra A., Rosen R. B. In vivo imaging of human retinal microvasculature using adaptive optics scanning light ophthalmoscope fluorescein angiography // *Biomed. Opt. Express*. – 2013. – V.4, № 8. – 1305–17.
34. Jia Y., Morrison J. C., Tokayer J., Tan O., Lombardi L., Baumann B., Lu C. D., Choi W. J., Fujimoto J. G., Huang D. Quantitative OCT angiography of optic nerve head blood flow // *Biomed. Opt. Express*. – 2012. – V.3, № 12. - 3127–37.
35. Диагностика функции сосудистого эндотелия у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями: Метод. указания Самарский государственный аэрокосмический университет; Лебедев П.А., Калакутский Л.И., Власова С.П., Горлов А.П. – Самара, 2004. – 18С.
36. Малиновский Е.Л. Учебно-методическое пособие по использованию пальцевой фотоплетизмографии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http:// www.tokranmed.ru/metod/fpg.htm](http://www.tokranmed.ru/metod/fpg.htm)

37. Ганьшина Т.С., Мирзоян Р.С. Использование ультразвукового флоуметра в цереброваскулярной фармакологии // В сб.: Методология флоуметрии. - 1997. - С. 125-129.
38. Дубнищев Ю.Н. Лазерные доплеровские измерительные технологии / Новосибир. гос. техн. ун-т. - Новосибирск: НГТУ, 2002. - 414 С.
39. Лазерно-доплеровский метод исследования капиллярного кровотока./ Козлов В.И., Морсков В.Ф., Кишко В.И., Соколов В.Г., Терман О.А. // Известия АН, сер. физическая., 1995. - Т. 59, №6. – С. 179-182
40. Borozdova M. A., Fedosov I. V., Tuchin V. V. Laser Doppler anemometer signal processing for blood flow velocity measurements // Quantum Electronics. – 2015. – V.45, №3. - P. 275–282.
41. Huang Y., Ibrahim Z., Tong D., Zhu S., Mao Q., Pang J., Lee W. P. A., Brandacher G., Kang J. U. Microvascular anastomosis guidance and evaluation using real-time three-dimensional Fourier-domain Doppler optical coherence tomography // Journal of Biomedical Optics. – 2013. – V.18, № 11. – 111404.
42. Mahmud M. S., Cadotte D. W., Vuong B., Sun C., Luk T. W. H., Mariampillai A., and Yang V. X. D. Review of speckle and phase variance optical coherence tomography to visualize microvascular networks // Journal of Biomedical Optics. – 2013. – V.18, №5. - 050901.
43. Trasischker W., Werkmeister R. M., Zotter S., Baumann B., Torzicky T., Pircher M., and Hitzenberger C. K. In vitro and in vivo three-dimensional velocity vector measurement by three-beam spectral-domain Doppler optical coherence tomography // Journal of Biomedical Optics. – 2013. – V.18, №11. - 116010.
44. Kalchenko V., Harmelin A., Fine I., Zharov V., Galanzha E., Tuchin V. Advances in intravital microscopy for monitoring cell flow dynamics in vivo // Proc. SPIE. – 2007. – 6436, 64360D-1–64360D-15.
45. Fedosov I. V., Ulyanov S. S., Galanzha E. I., Galanzha V. A., Tuchin V. V. Coherent-domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science 1, Chapter 10 / ed. V. V. Tuchin, Boston: Kluwer Academic Publishers, 2007. - P. 397–435.

46. Kedrin D., Gligorijevic B., Wyckoff J., Verkhusha V. V., Condeelis J., Segall J. E., Rhee J. Intravital imaging of metastatic behavior through a mammary imaging window // *Nature Methods*. – 2008. – 5. - P.141-175.
47. Hrebesh M. Subhash, Biophotonics Modalities for High-Resolution Imaging of Microcirculatory Tissue Beds Using Endogenous Contrast: A Review on Present Scenario and Prospects // *International Journal of Optics*. – 2011. – P. 20.
48. Iabichella M.L., Melillo E., Mosti G. A. Review of microvascular measurements in wound healing // *Int. J. Low. Extrem. Wounds*. - 2006. – 5. - P. 181–199.
49. Carpentier P. H. Current techniques for the clinical evaluation of the microcirculation // *J. Mal. Vasc.* – 2001. – №26. – P. 142–147.
50. Tuchin V. V., Galanzha E. I., Zharov V. P., In vivo image flow cytometry // V. V. Tuchin, *Advanced Optical Flow Cytometry: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, 2011. - P. 387–433.
51. Galanzha E. I. In vivo integrated flow image cytometry and lymph/blood vessels dynamic microscopy / E. I. Galanzha, V. V. Tuchin, V. P. Zharov // *J. Biomed. Opt.* – 2005. – V. 10. – P. 54018.
52. Hirche N. Real-time lymphography by indocyanine green fluorescence: improved navigation for regional lymph node staging / N Hirche, H. Engel, Z. Hirche, et al. // *Ann. Plast. Surg.* – 2014. – V.73, № 6. – P. 701–705.
53. Unno N Preliminary experience with a novel fluorescence lymphography using indocyanine green in patients with secondary lymphedema / N. Unno, K. Inuzuka, M. Suzuki et al. // *J. Vasc. Surg.* – 2007. – V.45, № 5. – P. 1016–1021.
54. Zhu B. A review of performance of near- infrared fluorescence imaging devices used in clinical studies / B. Zhu, E. M. Sevick-Muraca // *Br. J. Radio.* – 2015. – V. 188, № 1045. – P. 20140547.
55. Horstick G. Plastic Foil Technique Attenuates Inflammation in Mesenteric Intravital Microscopy / G. Horstick, T. Kempf, M. Lauterbach, et al. // *J. Surg. Res.* – 2000. – 94. – P. 28–34.

56. Bhushan M., Moore T., Herrick A. and Griffiths C. —Nailfold video capillaroscopy in psoriasis // *British Journal of Dermatology*. – 2000. – 142. – P.1171–1176.
57. Butti P., Intaglietta M., Reimann H., Holliger C., Bollinger A., Anliker M., Capillary red blood cell velocity measurements in human nail fold by video densitometric method // *Microvasc. Res.* – 1975. – V.10. – 220–227.
58. Ryan T. J. Measurement of blood flow and other properties of the vessels of the skin / Jarrett A.: *The physiology and pathophysiology of the skin*, vol. 1. London: Academic Press, 1973. - P. 653–679.
59. Fagrell B., Fronek A., Intaglietta M. A. Microscopetelevision system for studying flow velocity in humanskin capillaries // *Am. J. Physiol.* – 1977. – V.233. – P. 318–321.
60. Kwiterovich K. A., Maguire M. G., Murphy R. P., Schachat A. P., Bressler N.M., Bressler S. B., Fine S. L. Frequency of adverse systemic reactions after fluorescein angiography // *Ophthalmology*. - 1991. – V.98. – P.1139–1142.
61. Backer D., Dubois M. J., Assessment of the microcirculatory flow in patients in the intensive care uni // *Curr. Opin. Crit. Care*. – 2001. – V. 7. – P. 200-203.
62. Sugii Y. In vivo PIV measurement of red blood cell mesentery motion / Y. Sugii, S. Nishio, K. Okamoto // *Physiol. Meas.* – 2002. – V. 23. – P. 403–416.
63. Lindken R. Micro-Particle Image Velocimetry (PIV): Recent developments, applications, and guidelines / R. Lindken, M. Rossi, S. Große, J. Westerweel // *Lab. Chip*. – 2009. – V.9. – P. 2551–2567.
64. Shakeria M Optical Imaging of Steady Flow in a Phantom Model of Iliac Artery Stenosis: Comparison of CFD Simulations with PIV Measurements / M. Shakeria, I. Khodarahmia, M. S. Keith, A. A. // *Aminia Proc. SPIE*. – 2010. – 7626. – 76260L-1.
65. Kazemzadeh A. The Effect of Contact Angles and Capillary Dimensions on the Burst Frequency of Super Hydrophilic and Hydrophilic Centrifugal Microfluidic Platforms, a CFD Study / A. Kazemzadeh, P. Ganesan, F. Ibrahim, et al. // *PLoS One*. – 2013. – V.8, № 9. – P. e73002.

66. Lima R. In vitro confocal micro-PIV measurements of blood flow in a square microchannel: The effect of the haematocrit on instantaneous velocity profiles / R. Lima, S. Wada, M. Takeda, et al. // J. of Biomechanics. – 2007. – 40. – P.2752–2757.
67. Kurochkin M. A. In vivo study of blood flow in capillaries using  $\mu$ PIV method / M. A. Kurochkin, I. V. Fedosov, V. V. Tuchin // Proc. SPIE. – 2015. – 9031. – P. 903107–1.
68. Maheswari R. U. Novel functional imaging technique from brain surface with optical coherence tomography enabling visualization of depth resolved functional structure in vivo / R. U. Maheswari, H. Takaoka, H. Kadono, et al. // Journal of Neuroscience Methods. – 2003. – V. 124, № 1. – P. 83-92.
69. Boas D.A., Bizheva K.K., Siegel A.M. Using dynamic low-coherence interferometry to image Brownian motion within highly scattering media // Opt. Lett. - 1998. - V.23. - P.319.
70. Chen Z., Milner T.E., Wang X., Srinivas S., Nelson J.S. Optical doppler tomography: Imaging in vivo blood flow dynamics following pharmacological intervention and photodynamic therapy // Photochemistry and Photobiology. - 1998. - V.67. - P.328.
71. Riva C. H. A. R., Ross B. E. N. J., Benedek G. B. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1972. - V.11. – P. 936-944.
72. Stern M. D. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering // Nature. – 1975. - V. 254. – P. 56-58.
73. Саркисов К.Г., Дужак Г.В. Лазерная доплеровская флоуметрия как метод оценки состояния кровотока в микрососудах // Методология флоуметрии. – 1999. - С.9-14.
74. Briers J.D., Webster S. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow // J. Biomed. Opt. – 1996. – V. 1. - P. 174–179.

75. Fercher A. F. Flow visualization by means of single-exposure speckle photography / A. F. Fercher, J. D. Briers // *Optics Communications*. – 1981. – V. 37, № 5. – P. 326-330.
76. Archbold E. Displacement Measurement from Double-exposure Laser Photographs / E. Archbold, A. E. Ennos // *Journal of Modern Optics*. – 1972. – V. 19, № 4. – P. 253-271.
77. Laser speckle and related phenomena. Topics in Applied Physics / Ed. J.C. Dainty. – V. 9. – Berlin: Springer-Verlag, 1975. – 286 P.
78. Джоунс Р. Голографическая и спекл-интерферометрия / Р. Джоунс, К. Уайкс; пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – 328 С.
79. Cuccia J. Quantitative in vivo imaging of tissue absorption, scattering, and hemoglobin concentration in rat cortex using spatially-modulated structured light / R.D. Frostig, In *Vivo Optical Imaging of Brain Function* - CRC Press, 2009 — 428 P.
80. Briers J. D. Time-varying laser speckle for measuring motion and flow / J. D. Briers // *Saratov Fall Meeting 2000: Coherent Optics of Ordered and Random Media*. – 2001. – V. 4242. – P. 25-39.
81. Briers J. D. Quasi real-time digital version of single-exposure speckle photography for full-field monitoring of velocity or flow fields / J. D. Briers, S. Webster // *Optics Communications*. – 1995. – V. 116, № 1-3. – P. 36-42.
82. Atchia Y. Rapid multiexposure in vivo brain imaging system using vertical cavity surface emitting lasers as a light source / Y. Atchia, H. Levy, S. Dufour, O. Levi // *Appl. opt.* – 2013. – V. 52, №7. – P. 64-71.
83. Briers J. D. Capillary Blood Flow Monitoring Using Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA) / J. D. Briers, G. Richards, X. W. He // *J. Biomed. Opt.* – 1999. – V. 4, №1. – P. 164-175.
84. Basak K. Review of laser speckle-based analysis in medical imaging / K. Basak, M. Manjunatha, P. K. Dutta // *Med. Biol. Eng. Comput.* – 2012. – V. 50, №6. – P. 547-558.

85. Draijer M. Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion / M. Draijer, E. Hondebrink, T. Leeuwen, W. Steenbergen // *Lasers Med. Sci.* – 2009. – V. 24. – P. 639–651.
86. Dunn A. K. Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow / A. K. Dunn // *Ann. Biomed. Eng.* – 2012. – V. 40. – P. 367–377.
87. Zimnyakov D. A. Time-dependent speckle contrast measurements for blood microcirculation monitoring / D. A. Zimnyakov, A. B. Mishin, A. A. Bednov, et al. // In: *Optical Diagnostics of Biological Fluids IV, Proc. SPIE.* 1999. – V. 3599. – P. 157-166.
88. MacKintosh F. C. Polarization memory of multiply scattered light / F. C. MacKintosh, J. X. Zhu, D. J. Pine, D. A. Weitz // *Phys. Rev. B.* – 1989. – V. 40, №13. – P. 9342.
89. Cheng H. Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution / H. Cheng, Q. Luo, S. Zeng, et al. // *J. Biomed. Opt.* – 2003. – V. 8, № 3. – P. 559- 564.
90. Nothdurft R. Imaging obscured subsurface inhomogeneity using laser speckle / R. Nothdurft, G. Yao // *Opt. Express.* – 2005. – V. 13, № 25. – P. 10034-10039.
91. Li P. Imaging cerebral blood flow through the intact rat skull with temporal laser speckle imaging / P. Li, S. Ni, L. Zhang, et al. // *Opt. Lett.* – 2006. – V. 31, № 12. – P. 1824-1826.
92. Cheng H. Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution / H. Cheng, Q. Luo, S. Zeng, et al. // *J. Biomed. Opt.* – 2003. – V. 8, № 3. – P. 559- 564.
93. Luo Q., Qiu J., Li P. Blood flow cytometry and cell aggregation study with laser speckle // *Advanced optical flow cytometry: methods and disease diagnoses* / Ed. V. V. Tuchin. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. – P.734.
94. Sadhwani A., Schomacker K.T., Tearney G.J., Nishioka N.S. Determination of Teflon thickness with laser speckle. I. Potential for burn depth diagnosis // *Appl. Opt.* – 1996. – V.35. – P.5727-5735.

95. Parthasarathy A. B., Tom W. J., Gopal A., Zhang X., and Dunn A. K. Robust flow measurement with multi-exposure speckle imaging // *Opt. Express.* – 2008. – V.16. – P. 1975-1989.
96. Tuchin V. V., Bashkatov A.N., Genina E. A., Kochubey V. I., Lychagov V. V., Portnov S. A., Trunina N. A., Cho S. et al., Finger tissue model and blood perfused skin tissue phantom // *Proc SPIE.* – 2011. - №.7898, 78980Z -1-10
97. Aquilina K. Do drugs that block transforming growth factor beta reduce posthaemorrhagic ventricular dilatation in a neonatal rat model? / K. Aquilina, C. Hobbs, A. Tucker et al. // *Act. Pediatr.* – 2008. – V. 97(9). – P. 1181–1186.
98. Hoque N. Decorin and colchicine as potential treatments for post– haemorrhagic ventricular dilatation in a neonatal rat model / N. Hoque, M. Thoresen, K. Aquilina et al. // *Neonatology.* – 2011. – V. 100(3). – P. 271–276.
99. Sadleir R.J. Detection of intraventricular blood using EIT in a neonatal piglet model / R.J. Sadleir, T. Tang, A.S. Tucker et al. // *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol Soc.* – 2009. – P. 3169–3172.
100. Dieni S. The pattern of cerebral injury in a primate model of preterm birth and neonatal intensive care / S. Dieni, T. Inder, B. Yoder et al. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2004. – V. 63(12). – P. 1297–1309.
101. Lekic T. Novel Preclinical Model of Germinal Matrix Hemorrhage Using Neonatal Rats / T. Lekic, A. Manaenko, W. Rolland et al. // *Act. Neurochir. Suppl.* – 2011. – V. 111. – P. 55–60.
102. Alles Y.C. A novel preclinical rodent model of collagenase–induced germinal matrix/intraventricular hemorrhage / Y.C. Alles, S. Greggio, R.M. Alles et al. // *Brain Res.* – 2010. – V. 1356. – P. 130–138
103. Tamura A., Graham D. I., McCulloch J. and Teasdale G. M. Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1981. – V.1, №1. – P. 53-60.

104. Романова Т.П. Способ моделирования внутримозговых гематом при артериальной гипертензии / Т.П. Романова // Патол. физиол. эксперим. тер. – 1989. – №3. – С. 80–81.
105. Nishimura K. The effects of infrasound in pituitary adreno–cortical response and gastric microcirculation in rats // J. of Low Frequency Noise and Vibration. – 1988. – V. 7, №1. – P. 20–33.
106. Ярош А. А., Криворучко И. Ф. Нервные болезни / Киев: Вища школа, 1985. - С. 462.
107. Warshaw A. Pain in chronic pancreatitis. // Gastroenterol. - 1984. – V. 86, № 5. - P.987-989.
108. Алехин С.А., Емельянов Р.А., Назаренко Д.П. Моделирование острого панкреатита у крыс / Алехин С.А., Емельянов Р.А., Назаренко Д.П. – Курск: КГМУ, 2006. - С. 64.
109. Дедов И.И., Шестакова М.В., Галстян Г.Р. Распространенность сахарного диабета 2 типа у взрослого населения России (исследование NATION) // научно-практический медицинский журнал. – 2016. –Т.19. - №2.
110. Баранов В.Г., Соколоверова И.М., Гаспарян Э.Г. и др. Экспериментальный сахарный диабет. Роль в клинической диабетологии - Л.: Наука, 1983. - 240 С.
111. Закирьянов А.Р., Плахотный М.А., Онищенко Н.А. и др. Диабетические осложнения у крыс при длительных сроках моделирования сахарного диабета 1-го типа // Патол. физиол. эксперим. терапии. - 2007. - №4. – С.21–25.
112. Байрашева В.К., Байрашева В.К. Моделирование сахарного диабета и диабетической нефропатии в эксперименте // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4.
113. Соков А.В. Причины, виды, признаки и последствия инсульта [Электронный ресурс] / А.В. Соков // Я – здоров. 2014. - режим доступа: [http://www.ayzdorov.ru/lechenie\\_insylyt\\_chno.php](http://www.ayzdorov.ru/lechenie_insylyt_chno.php)

114. Elliott J.T. et al., On The Development Of A Dynamic Contrast-Enhanced Near-Infrared Technique To Measure Cerebral Blood Flow In The Neurocritical Care Unit // *Biomed Opt Exp.* – 2014. – V.4, №2. – P.206-218.
115. Bashkatov A.N., Genina E.A., Sinichkin Yu.P., Kochubey V.I., Lakodina N.A., Tuchin V.V. Glucose and Mannitol Diffusion in Human Dura Mater // *Biophys. J.* – 2003. - V. 85, №5. - P.3310-3318.
116. Genina E.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Optical clearing of cranial bone // *Adv. Opt. Technol.* – 2008. - № 267867.
117. Shang Yu, Symons T. B., Durduran T., Yodh A. G., Yu G., Effects of muscle fiber motion on diffuse correlation spectroscopy blood flow measurements during exercise // *Optical Society of America.* – 2010.
118. Zhang H., Li P., Feng N., Qiu J., Li B., Luo W., and Luo Q., Correcting the detrimental effects of nonuniform intensity distribution on fiber-transmitting laser speckle imaging of blood flow // *Virtual J. Biomed. Opt.* - 2012. V. 20. – P.508-517.
119. Zimnyakov D.A., Tuchin V.V., and Yodh A.G., “Characteristic scales of optical field depolarization and decorrelation for multiple scattering media and tissues // *J. Biomed. Opt.* – 1999. – V.4, №1. – P.157-163.
120. Bashkatov A.N., Genina E.A., and Tuchin V.V. Tissue Optical Properties Chapter 5 in *Handbook of Biomedical Optics* / Ed. by Boas D.A, Pitris C., Ramanujam N., Taylor & Francis Group. - LLC, CRC Press Inc.- 2011.
121. Тучина Д.К., Тимошина П.А., Абдурашитов А.С., Сагатова М.М., Зинченко Е.М., Семячкина-Глушковская О.В., Тучин В.В., Применение оптических просветляющих агентов для повышения качества визуализации мозгового кровотока у новорожденных мышей // *Материалы Всероссийской научной школы-семинара.* – 2016. - С. 76-80
122. Srienc A. I., Kurth-Nelson Z. L. and Newman E. A., Imaging retinal blood flow with laser speckle flowmetry // *Frontiers in Neuroenergetics.* – 2010. – V.2.

123. Silvestri S., Schena E., Optical-Fiber Measurement Systems for Medical Applications, Optoelectronics - Devices and Applications / P. Predeep (Ed.). - 2011. – P.206-224.
124. Yu Shang, T. B. Symons, T. Durduran, A. G. Yodh, and G.Yu, Effects of muscle fiber motion on diffuse correlation spectroscopy blood flow measurements during exercise, Optical Society of America, 2010
125. Вашетко Р.В., Толстой А.Д., Курыгин А.А., Стойко Ю.М., Краснорогов В.Б. Острый панкреатит и травмы поджелудочной железы. Спб.: Питер, 2000. - С. 320
126. Uhl W., Warshaw A., Imrie C. et al. IAP guidelines for the surgical management of acute pancreatitis // Pancreatology. – 2002. – № 2. – P. 565–573
127. Маев И. В. Болезни поджелудочной железы / И. В. Маев, Ю. А. Кучерявый. – М.:ГЭОТАРМедиа, 2009.— 736 С.
128. V.V. Tuchin, Optical Clearing of Tissues and Blood / V.V. Tuchin ,SPIE Press, Bellingham, WA, 2006.- P.254.
129. Genina E. A. , Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues / Tuchin V. V. - Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, 2009. – P. 657–692.
130. Zhu D. Larin K.V., Luo Q., Tuchin V. V. Recent progress in tissue optical clearing // Laser Photonics Rev. – 2013. – Vol. 7, № 5. – P. 732–757.
131. Genina E. A., Bashkatov A. N., Korobko A. A., et al. Optical clearing of human skin: comparative study of permeability and dehydration of intact and photothermally perforated skin // J. Biomed. Opt. – 2008. – V. 13, №2. – P. 021102-1–8.
132. Zhi Z., Han Z., Luo Q., et al. Improve optical clearing of skin in vitro with propylene glycol as a penetration enhancer // J. Innovat. Opt. Health Sci. – 2009. – V. 2, № 3. – P. 269–278.
133. Samatham R., Phillips K. G., Jacques S. L. // J. Innov. Opt. Health Sci. – 2010. – V. 3. – P. 183–188.

134. Fox A. M., Diven D. G., Sra K., et al. Dermal scatter reduction in human skin: a method using controlled application of glycerol // *Lasers Surg. Med.* – 2009. – V. 41. – P. 251–255.
135. Bui A. K., McClure R. A., Chang J., et al. // *Lasers Surg. Med.* – 2009. – V. 41, № 2. – P. 142–148.
136. Guo X., Guo Z., Wei H., et al. // *Laser Phys.* – 2010. – V. 20, № 9. – P. 1849–1855.
137. Zhong H., Guo Z., Wei H., et al. Quantification of glycerol diffusion in human normal and cancer breast tissues with optical coherence tomography // *J. Biomed. Opt.* – 2010. – V. 15, № 3. – P. 036012.
138. Yoon J., Park D., Son T., et al. // *Lasers Surg. Med.* – 2010. – V. 42, № 5. – P. 412–417.
139. Wen X., Mao Z., Han Z., et al. // *J. Biophotonics.* – 2010. – V. 3, № 1. – P. 44–52.
140. Nadiarnykh O. In: F. S. Pavone and P. J. Campagnola (eds.), *Second Harmonic Generation Imaging: SHG and optical clearing* / O. Nadiarnykh, P. J. Campagnola. – Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, NY, CRC Press, 2014. – P. 169–189.
141. Oliveira L. M., Carvalho M. I., Nogueira E., Tuchin V. V. The characteristic time of glucose diffusion measured for muscle tissue at optical clearing // *Laser Phys.* – 2013. – V. 23, № 7. – P. 075606.
142. Chance B., Mayevsky A., Guan B., Zhang Y. Hypoxia/ischemia triggers a light scattering event in rat brain // *Oxygen transport to tissue XIX* / Ed. by D.K. Harrison, D.T. Delpy. - New York: Plenum Press., 1997. - P. 457-467.
143. Liu H., Beauvoit B., Kimura M., Chance B. Dependence of tissue optical properties on solute-induced changes in refractive index and osmolarity // *J. Biomed. Opt.* - 1996. - V. 1. - P. 200-211.
144. Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Optical immersion as a tool for tissue scattering properties control // *Perspectives in Engineering Optics* / Ed. by

- K. Singh, V.K. Rastogi. B-28 II Floor, Sarvodaya Enclave, New Delhi, India: Anita Publications, 2002. - P. 313-334.
145. Meglinski I.V., Bashkatov A.N., Genina E.A., Churmakov D.Y., Tuchin V.V. The enhancement of confocal images of tissues at bulk optical immersion // *Laser Physics*. - 2003. - V. 13. - P. 65-69.
146. Vargas G., Readinger A., Dosier S. S., Welch A. J. // *Photochem. Photobiol.* – 2003. – V.77. – P.541–549
147. Galanzha E. I., Tuchin V. V., Solovieva A. V., Stepanova T. V., Luo Q., Cheng H. // *J. Phys. D: Appl. Phys.* – 2003. – V.36. – P.1739–1746.
148. Zhu D., Zhang J., Cui H., Mao Z., Li P., Luo Q. Short-term and long-term effects of optical clearing agents on blood vessels in chick chorioallantoic membrane // *J. Biomed. Opt.* – 2008. - V.13. – P.021106.
149. P. A. Timoshina, Shi R., Zhang Y., Zhu D., Semyachkina-Glushkovskaya O. V., et al. Comparison of cerebral microcirculation of alloxan diabetes and healthy mice using laser speckle contrast imaging // *Proc. SPIE.* – 2015. – 9448.
150. Tripathy B. B. *RSSDI Textbook of Diabetes Mellitus* / Tripathy B. B. - New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2012.
151. Tuchina D.K., Shi R., Bashkatov A.N., Genina E.A., Zhu D., Luo Q., Tuchin V.V. Ex vivo optical measurements of glucose diffusion kinetics in native and diabetic mouse skin // *Journal of Biophotonics*. – 2015. - V. 8, № 4. - P. 332-346.
152. Hosking S. P. M., Bhatia R., Crock P. A, Wright I., Squance M. L., Reeves G. Non-invasive detection of microvascular changes in a paediatric and adolescent population with type 1 diabetes: a pilot cross-sectional study // *Hypertension*. – 2009. - V.54. - P. 919-950.
153. Vallance P., Importance of asymmetrical dimethylarginine in cardiovascular risk // *Lancet*. 2001. – V.358. – P. 2096–2097.
154. Bonetti P.O., Lerman L.O., Lerman A., Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003. – V.23. – P.168–175.

155. Омнипак (Omniраque®) инструкция по применению [электронный ресурс]. - Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. -2003.  
– Режим доступа: [http://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_2438.htm](http://www.rlsnet.ru/tn_index_id_2438.htm)