

На правах рукописи

Тимошина Полина Александровна

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

03.01.02 - БИОФИЗИКА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Саратов – 2016

Работа выполнена на кафедре оптики и биофотоники физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, заслуженный деятель науки РФ, профессор, зав. кафедрой оптики и биофотоники ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» **Тучин Валерий Викторович**

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, заведующий кафедрой оториноларингологии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» **Мареев Глеб Олегович**

кандидат физико-математических наук, доцент кафедры общей физики и волновых процессов ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» **Приезжев Александр Васильевич**

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики»

Защита состоится «20» декабря 2016 года в 17 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д212.243.05, созданного на базе ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корпус III, аудитория 34.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» и на сайте <http://www.sgu.ru/research/dissertation-council/d-212-243-05/kandidatskaya-dissertaciya-timoshinoy-polinu>

Автореферат разослан « » _____ 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета Д212.243.05,

Профессор, доктор физико-математических наук

Павлов Алексей Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. 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 [1-4], интравитальная микроскопия [5, 6], спекл-визуализация [3, 7-12] и другие), а также методы, основанные на принципах оптической когерентной томографии [13-15]. 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.

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. 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**:

- 1) анализ основ спекл-контрастных измерений параметров кровотока с последующей отработкой технологии мониторинга этих параметров и реализующего ее устройства;
- 2) калибровка метода спекл-контрастной визуализации с помощью фантома, моделирующего микроциркуляцию крови в биологической ткани с оптическими свойствами, близкими к реальным тканям;
- 3) оценка влияния оптических просветляющих агентов на микроциркуляцию крови в тканях лабораторных животных;
- 4) исследование изменения микроциркуляции крови в условиях моделирования аллоксанового диабета у лабораторных животных;
- 5) исследование микроциркуляции крови в условиях развития стресс-индуцированного инсульта головного мозга у лабораторных животных;
- 6) оценка возможности использования методов лазерной спекл-визуализации для мониторинга микроциркуляции крови в условиях моделирования ишемии-реперфузии в тканях 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 (рентгеноконтрастное вещество Йогексол) и водного 70% раствора Омнипак-300 на микроциркуляцию крови в сосудах поджелудочной железы лабораторных животных в условиях развития аллоксанового 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, из них 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК, 7 в систему цитирования SCOPUS.

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

Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также совместно с соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследований на семинарах, конференциях и симпозиумах.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Оптические методы исследования динамики кровотока

В первой главе проводится краткий анализ существующих оптических методов диагностики параметров микроциркуляции крови. Даны описания различных методов, таких как лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ), лазерная спекл- и флуоресцентная визуализация, оптическая когерентная ангиография, доплеровская оптическая когерентная томография, интравитальная микроскопия, интравитальная флуоресцентная

цифровая микроскопия. Также более подробно описан метод спекл-контрастной визуализации и различные модификации данного метода.

Глава 2. Материалы и методы

Во второй главе описана экспериментальная установка и принцип ее работы, методика измерений и обработки экспериментальных данных, экспериментальные биологические модели (стресс-индуцированный инсульт головного мозга, диабет, панкреонекроз). 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). Также данная глава содержит пункт с описанием проведения калибровки экспериментальной установки с помощью фантома моделирующего микроциркуляцию крови в биоткани с оптическими свойствами, близкими к реальным тканям.

Спекл – контрастная визуализация является неинвазивным бесконтактным методом, что позволяет получать и анализировать изображения 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 составлял 5×5 или 7×7 пикселей [3]:

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

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

Для проведения измерений и расчета контраста спекл-изображения 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.

Для мониторинга микрогемодинамики был разработан лабораторный образец визуализирующего устройства, 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. Для спекл-визуализации применялся одномодовый гелий-неоновый лазер ГН-5П с длиной волны 632.8 нм. 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 микрообъективом ЛОМО с кратностью увеличения $10 \times$.

Перед проведением *in vivo* измерений микроциркуляции экспериментальная установка калибровалась с использованием специально разработанного фантома [16].

Представленный на рисунке 1 фантом имел следующую текстуру: базовое вещество - эпоксидная смола с рассеивающей композицией в виде наночастиц TiO_2 , через которое параллельно поверхности проходят каналы диаметром 180-200 мкм на глубине ~200 мкм, на глубине 2 мм находились дополнительные каналы. По каналам с контролируемой скоростью в пределах от 0 до 3 мм/сек пропускалась рассеивающая взвесь частиц красного красителя с размером частиц 7-10 мкм. Скорость потока регулировалась с использованием дозатора лекарственных веществ MLW Lineomat, Германия.

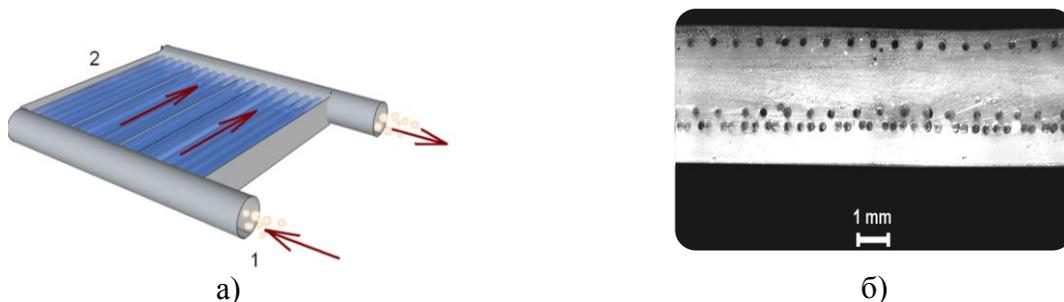


Рисунок 1. Фантом: а) схематичное изображение: 1- суспензия частиц ($d \sim 7-9 \mu\text{m}$); 2- фантом (общее число каналов ~ 300 , $d \sim 180-200 \mu\text{m}$); б) изображение фантома в срезе.

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

На рисунке 2 представлена калибровочная кривая зависимости контраста спекл-изображения от скорости частиц.

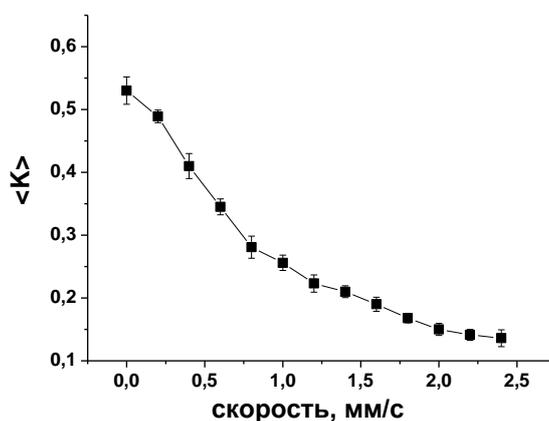


Рисунок 2. График зависимости контраста спекл-изображения от скорости рассеивающих частиц в фантоме.

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

Учитывая также, что соотношение между контрастом K и τ_c временем корреляции зависит от того, предполагается ли распределение скоростей рассеивателей гауссовым или лоренцевским, и при условии, что время корреляции $\tau_c < T$ времени экспозиции, обе модели распределения скоростей сводятся к соотношению между K и τ_c [3, 9], а именно:

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

Исходя из этого, самый простой подход приводит к характерной скорости, определяемой следующим образом [17-19]:

$$v = \lambda/2\pi\tau_c. \quad (3)$$

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

На рисунке 3 представлены калибровочные кривые, полученные экспериментально с помощью фантома и теоретически с помощью формул (2) и (3) для зависимости контраста спекл-изображения от скорости частиц.

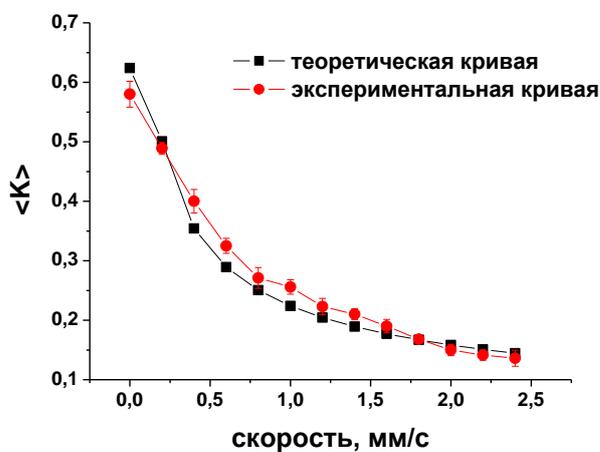


Рисунок 3. График зависимости контраста спекл-изображения от скорости рассеивающих частиц.

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

Запись спекл-изображений проводилась в течение 1-3 мин. После чего значения контраста спекл-изображения пересчитывались в приведенную скорость в соответствии с формулами (2) и (3). Далее с помощью статистической обработки подсчитывались средние значения и стандартные отклонения. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0. Для определения значимости различий между исследуемыми параметрами использовался критерий Стьюдента (исходные данные имели нормальное распределение). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

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

Третья глава посвящена исследованию церебральной микроциркуляции крови в условиях развития стресс-индуцированного инсульта головного мозга у лабораторных животных. В данной главе описаны методика и результаты исследования изменений церебрального кровотока лабораторных крыс в условиях развития инсульта, вызванного стрессом, и при введении сосудорасширяющих и сосудосуживающих агентов. Показана

эффективность разработанного устройства и алгоритма получения и обработки данных методом спекл-контрастной визуализации полного поля для мониторинга состояния церебральной микроциркуляции крови в коре головного мозга, обусловленного патологическими изменениями или воздействием различных препаратов. Для мониторинга состояния микроциркуляции в головном мозге лабораторных крыс при моделировании стресс-индуцированного 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 области.

В настоящей работе применялся метод моделирования инсульта, основанный на методе стрессирования Романовой [20]. Для выявления чувствительности метода спекл-контрастной визуализации к изменениям в церебральной микроциркуляции за счет активации механизмов регуляции тонуса сосудов проводили измерения скорости церебрального кровотока в сосуде при стрессе и при фармакологическом моделировании сокращения и расслабления сосудов мозга. В экспериментах по мониторингу кровотока в коре головного мозга было рассмотрено три группы лабораторных крыс по 5 особей обоих 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 (прединсультная группа), третья группа была контрольной и состояла из здоровых животных. Для всех животных внутривенно с помощью катетера вводились или вазодилаторные (ацетилхолин) агенты, или вазоконстрикторные (мезатон) агенты. На рисунке 4 представлены результаты спекл-контрастной визуализации микроциркуляции коры головного мозга.

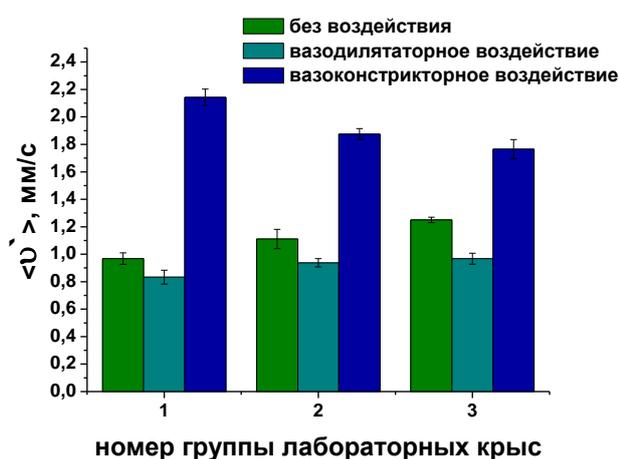


Рисунок 4. Изменение приведенной скорости кровотока трех групп лабораторных животных: 1 – 24 ч после стрессирования, 2 – сразу после стрессирования, 3 – контрольная группа.

Результаты исследований показали, что приведенная скорость кровотока у здоровых животных (3-я группа) на 23 % выше 1 группы животных (через сутки после стрессового воздействия) и на 12 % второй группы (прединсультная группа). С помощью микроскопической визуализации 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 церебральную микроциркуляцию, показали увеличение приведенной скорости кровотока, это

соответствует ожидаемому физиологическому отклику, т.к. использование данного препарата, вызывает повышение артериального давления, что ведет к увеличению градиента давления и, следовательно, к увеличению кровотока в исследуемых сосудах. Соответственно, использование вазодилататорного агента (ацетилхолин) вызывает снижение артериального давления, приводящее к снижению скорости кровотока, что совпадает с полученными результатами (рис.4).

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

В четвертой главе описаны методика и результаты исследования микроциркуляции крови в сосудах поджелудочной железы в условиях моделирования ишемии – реперфузии в тканях поджелудочной железы лабораторных животных.

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. 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.

Для мониторинга микроциркуляции крови в поджелудочной железе была использована экспериментальная установка, 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 реперфузии в сосудах поджелудочной железы сытых, голодных и алкоголизованных крыс.

Оба этапа были выполнены на 82 белых крысах линии Wistar. 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 мин 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 мин исследования, а также через 5 дней после начала опыта;
- третья группа (8 особей) - животные у которых исследования кровотока проводились до ишемии, в момент 5 мин ишемии, а также через сутки после начала опыта;
- четвертая группа (8 особей) - животные у которых исследования кровотока проводились до ишемии, в момент 5 мин ишемии, а также через 5 дней после начала опыта;
- пятая группа (8 особей) - животные у которых исследования кровотока проводились до ишемии, в момент 20 мин ишемии, а также через сутки после начала опыта;
- шестая группа (8 особей) животные у которых исследования кровотока проводились до ишемии, в момент 20 мин ишемии, а также через 5 дней после начала опыта.

Дополнительно были проведены гистологические исследования. Материал для гистологических исследований фиксировали в 10%-ном растворе формалина, обезживали 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 в каждой группе.

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

Результаты по контрольной группе животных, где исследования кровотока проводились в первую минуту, через 5 и 20 мин исследования, а также через сутки после начала эксперимента, и на 5 сутки после начала эксперимента, не показали каких-либо статистически значимых изменений скорости кровотока.

На рисунке 5 представлены результаты оценки микроциркуляции крови у групп, где исследования кровотока проводились до ишемии, в момент 5 мин ишемии, а также через сутки после начала эксперимента (а) и на 5 сутки после начала эксперимента (б); до ишемии, в момент 20 мин ишемии, через сутки после начала эксперимента (в); до ишемии, в момент 20 мин ишемии, на 5 сутки после начала эксперимента (г).

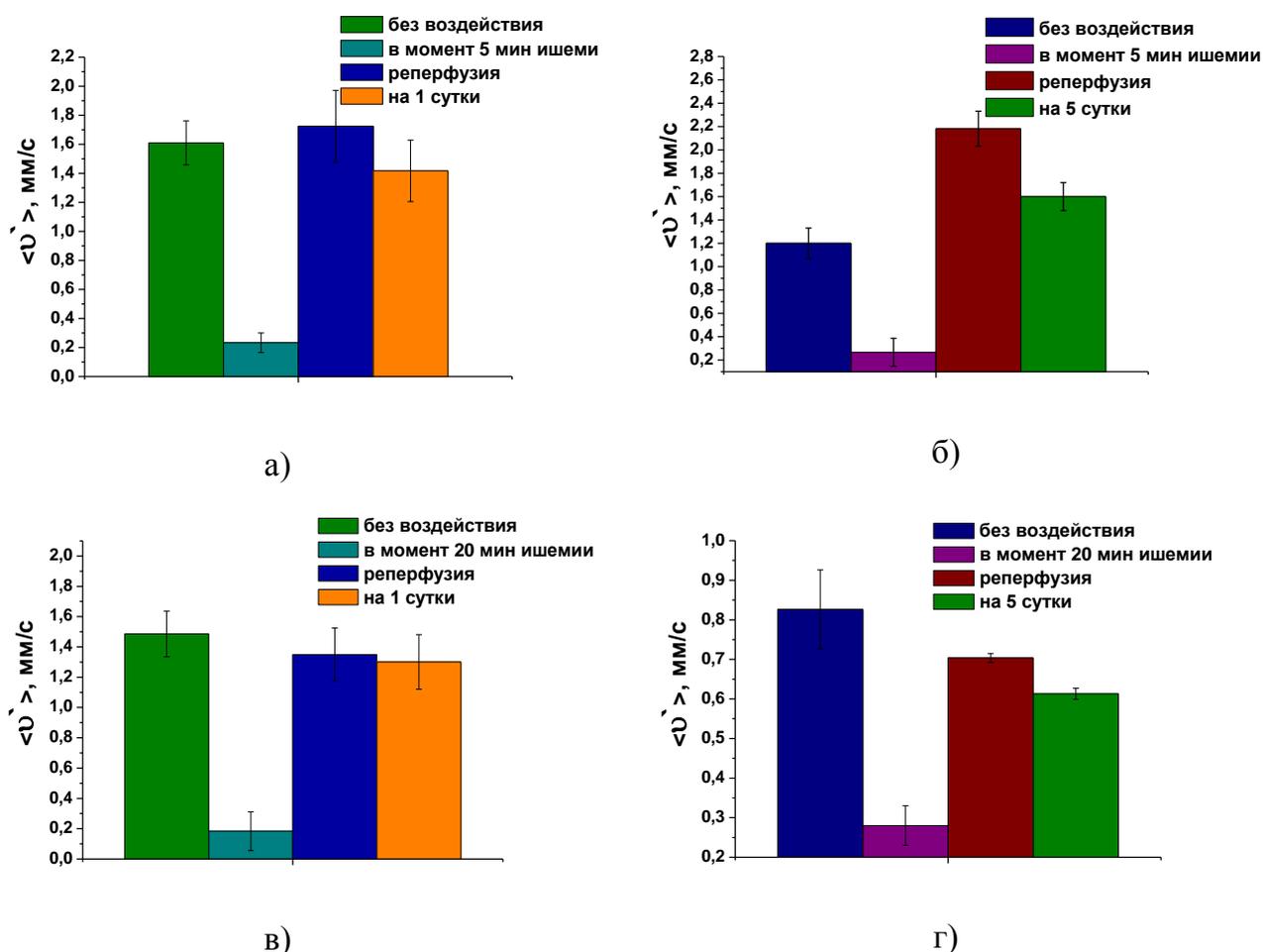


Рисунок 5. Динамика микроциркуляции крови в зависимости от функционального состояния поджелудочной железы крысы: (а) до ишемии, в момент 5 мин ишемии, через сутки после начала эксперимента; (б) до ишемии, в момент 5 мин ишемии, на 5 сутки после начала эксперимента; (в) до ишемии, в момент 20 мин ишемии,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

В результате возобновления кровотока после 5 мин локальной ишемии происходило резкое увеличение скорости кровотока. Результаты гистологического анализа показали, что в группе с 5 мин ишемией в ткани поджелудочной железы появлялись отек стромы, неравномерное кровенаполнение сосудов, единичные

кровоизлияния, феномен сепарации, мелкие очаги некроза. А в группе с 20 мин 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.

На рисунке 6 представлены результаты оценки микроциркуляции крови у групп, где исследования кровотока проводились на алкоголизованных, сытых, голодных крысах до ишемии, в момент 5 мин ишемии, и на 5 сутки после начала эксперимента (а), в момент 20 мин ишемии, и на 5 сутки после начала эксперимента (б).

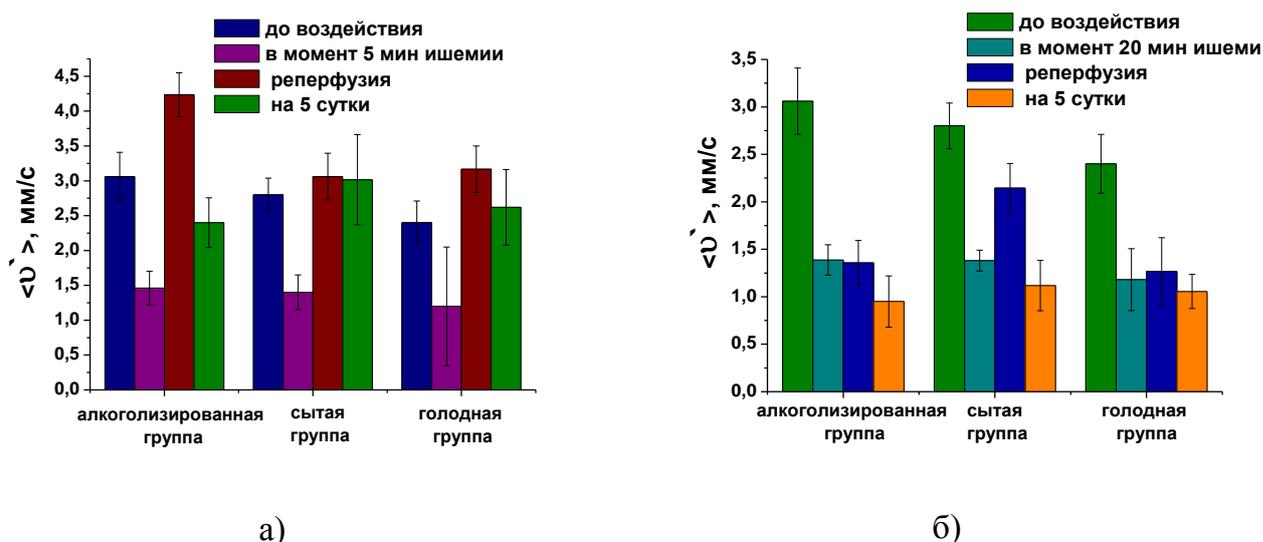


Рисунок 6. Изменение микроциркуляции крови у алкоголизованных, сытых, голодных крыс в зависимости от функционального состояния поджелудочной железы.

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 мин приведенная скорость кровотока статистически значимо больше исходной. Это свидетельствует о развитии реактивной гиперемии в органе при реперфузии, клинические и морфологические изменения носят обратимый характер. 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 эксперимента. Большая часть (80%) погибших животных представлена группой крыс, подвергшихся алкоголизации.

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

Пятая глава посвящена оценке влияния оптических просветляющих агентов (ОПА) на микроциркуляцию крови в тканях внутренних органов лабораторных животных, где описаны методика измерения и полученные результаты исследования.

Данные исследования по оценке влияния различных ОПА на микроциркуляцию крови в поверхностных тканях внутренних органов проводились с использованием установки, описанной в главе 2. В качестве исследуемых ОПА были взяты растворы:

- 40% водный раствор глюкозы ($n=1.391$). 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 0.5 мл.
- Раствор фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%) ($n=1.408$). Методика проведения эксперимента проводилась аналогично с экспериментом по оценке влияния водного раствора 40% глюкозы.

Характер морфологических изменений и изменений микроциркуляции крови под влиянием иммерсионной жидкости (40% водный раствор глюкозы, $n=1.391$) представлен на рисунке 7.

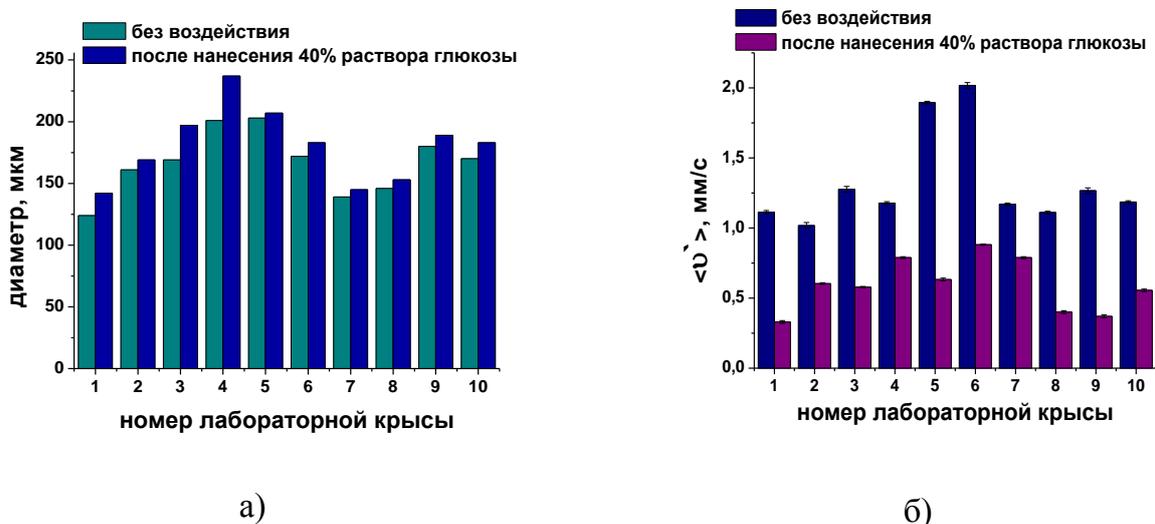


Рисунок 7. Изменение диаметра кровеносных сосудов (а) и приведенной скорости кровотока (б) абдоминальной жировой ткани

Результаты показывают увеличение диаметра исследуемого сосуда (а) после нанесения раствора, снижение приведенной скорости кровотока (б). В течение последующего времени было замечено, что контраст спекл-изображения не достиг начальных значений, это говорит о том, что кровоток не восстановился за время наблюдения. Характер данных изменений соответствует ожидаемому отклику на воздействие 40% водного раствора глюкозы на микроциркуляцию крови. Скорость кровотока также снижалась. Сравнение полученных результатов с известными

публикациями свидетельствует об их корреляции и подтверждает возможность использования данной техники для оценки влияния ОПА на микроциркуляцию крови.

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

Был исследован характер морфологических изменений и изменений микроциркуляции крови под влиянием иммерсионной жидкости (раствор фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%), $n=1.408$). Было замечено уширение диаметра сосуда в первые секунды после нанесения раствора, на 25-ой сек диаметр увеличился на 15 % и больше не изменялся. На рисунке 8 представлена диаграмма изменения приведенной скорости кровотока под воздействием раствора фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%) в разные моменты времени (до воздействия, 5 сек и 25 сек спустя после нанесения раствора, спустя 20 мин). 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.

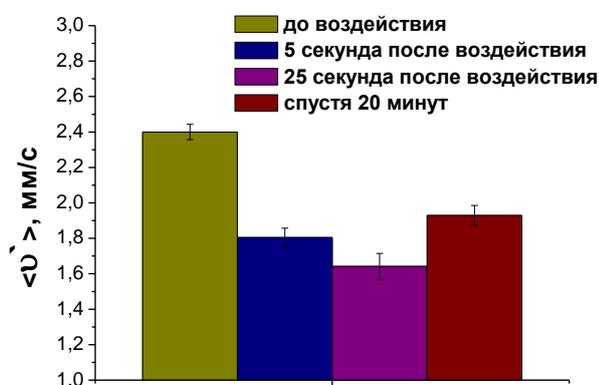


Рисунок 8. Изменение приведенной скорости кровотока под воздействием раствора фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%) в разные моменты времени

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

В данной главе представлены методика проведения и результаты оценки изменений микроциркуляции крови в поджелудочной железе в условиях развития аллоксанового диабета методом спекл-контрастной визуализации и дополнительной оценки проницаемости сосудов под воздействием 100% раствора «Омнипак-300» и 70% водного раствора «Омнипак-300».

Визуализация микроциркуляции крови в поверхностных слоях внутренних органов лабораторных крыс была проведена на беспородных белых крысах в количестве 32 штук массой 300 – 450 г. В качестве исследуемой области был исследован участок поджелудочной железы. 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. 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 Accu-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 ± 16 , 403 ± 105 мг/дл, соответственно. Под общим обезболиванием (внутримышечное введение анестетика) выполнялась лапоротомия. Значение диаметра исследуемых сосудов составляло 180 ± 50 мкм.

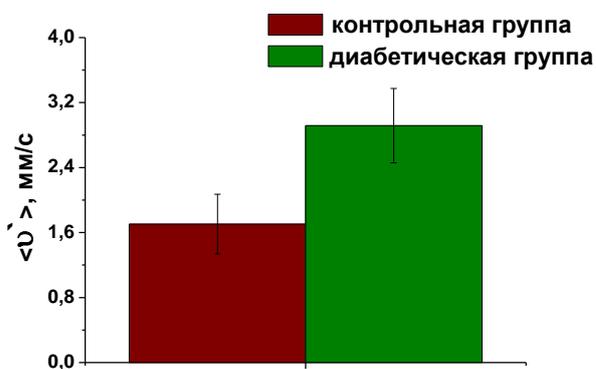


Рисунок 9. Изменение кровотока в сосудах поджелудочной железы: 1-контрольная группа, 2-диабетическая группа

Результаты измерений приведенной скорости кровотока в сосудах поджелудочной железы контрольной и диабетической групп лабораторных крыс показаны на рисунке 9.

Развитие диабета повлияло на изменение микроциркуляции крови относительно контрольной группы животных. Из рисунка 9 видно, что скорость кровотока выше уровня контрольной группы на 40%.

На рисунке 10 представлено рассчитанное распределение контраста спекл-изображения сосудов поджелудочной железы в различных состояниях кровотока при воздействии на него водного 70%-раствора «Омнипак-300». Использование данного просветляющего агента улучшило визуализацию исследуемых сосудов.

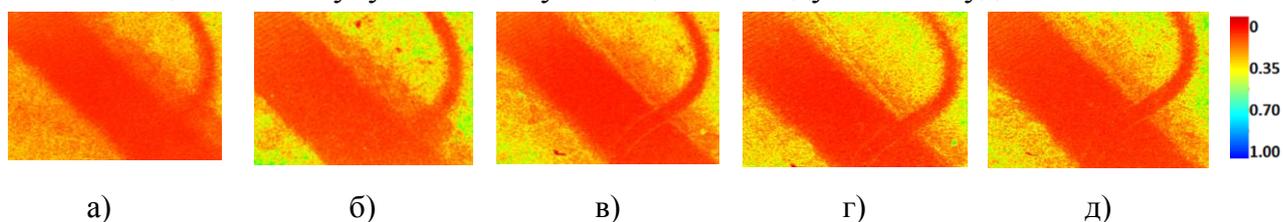
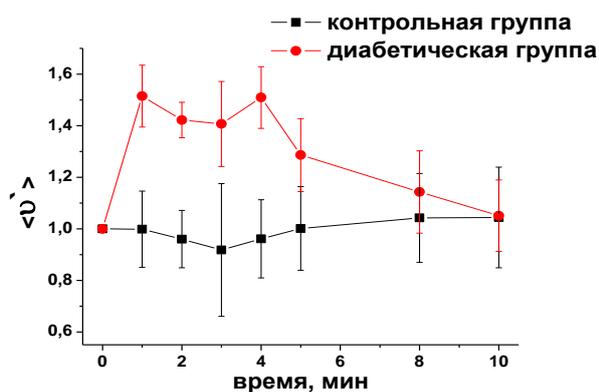
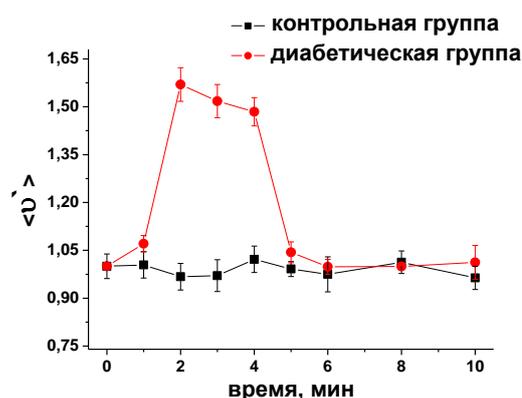


Рисунок 10. Рассчитанное распределение контраста спекл-изображений сосудов поджелудочной железы в различных состояниях кровотока при воздействии на него водного 70%-раствора «Омнипак-300»: а) до воздействия, б) через 1, в) 5, г) 7, д) 20 минут после нанесения агента.

Далее на рисунке 11 представлены нормированные кривые изменений микроциркуляции крови в сосудах поджелудочной железы лабораторных крыс контрольных и диабетических групп под воздействием водного 70% раствора «Омнипак-300» (а) и 100% раствора «Омнипак-300» (б). Данные усреднялись по 8 лабораторным животным для каждой группы и для каждого раствора соответственно.



а)



б)

Рисунок 11. Изменения микроциркуляции крови поджелудочной железы лабораторных крыс обеих групп под воздействием водного 70% раствора «Омнипак-300» (а) и 100% раствора «Омнипак-300» (б).

Из графика видно, что статистически значимых изменений кровотока под воздействием водного 70% раствора «Омнипак-300» и 100% раствора «Омнипак-300» в контрольной группе животных не наблюдается, при этом в обеих диабетических группах отчетливо видно увеличение кровотока в течение 4 мин с последующим восстановлением параметров кровотока. К 10 мин 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.

Результаты и выводы

Основные результаты диссертационной работы могут быть сформулированы следующим образом:

- 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 полного поля при мониторинге состояния микроциркуляции, обусловленного патологическими изменениями или воздействием препаратов. 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, исследованной непосредственно после стресса.
- При полном временном пережатии кровотока с длительной ишемией (20 мин) половина животных погибает на 3–4-е сутки эксперимента. Среди выживших животных, наряду с нарушениями кровообращения, гистологически отмечался лейкостаз с лейко-диapedезом в строму, развитие распространенных очагов некроза, что говорит о развитии панкреонекроза.

- Метод спекл-контрастной визуализации позволяет контролировать степень сокращения кровотока в сосудах поджелудочной железы при создании локальной ишемии путем компрессии магистральных сосудов. После 5-мин сокращения кровотока в тканях поджелудочной железы на 50%, возникает реактивная гиперемия, клинические и морфологические изменения носят обратимый характер. После 20-мин неполного сокращения кровотока на половину, реактивной гиперемии нет, клинически и морфологически развивается панкреатит, не достигающий степени панкреонекроза.
- Результаты применения осмотического раствора глюкозы показывают, что 40%-раствор глюкозы обеспечивает немедленное расширение кровеносных сосудов на 9% и уменьшение скорости кровотока примерно на 40%.
- Результаты применения многокомпонентного раствора фруктозы показывают, что диаметр сосудов увеличивается примерно на 15%, а скорость кровотока снижается на 25% и в течение 20 мин параметры не восстанавливаются.
- При мониторинге микроциркуляции крови в сосудах поджелудочной железы в условиях развития аллоксанового диабета методом спекл-контрастной визуализации было выявлено, что развитие аллоксанового диабета влияет на изменение микроциркуляции крови по сравнению со здоровой группой животных, скорость кровотока у диабетической группы животных увеличивается на 40%.
- 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 диабета, а именно нанесение водного 70%-раствора «Омнипак-300» и 100% раствора «Омнипак-300». Продемонстрировано увеличение скорости кровотока почти на 50% в диабетической группе животных при воздействии водного 70%-раствора «Омнипак-300» и на 65% при воздействии 100% раствора «Омнипак-300», но к 10-ой мин скорость кровотока полностью восстанавливается, в контрольной группе кровотоков не изменился.
- 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.

Список публикаций по теме диссертации:

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. - V. 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 microhemodynamic in an aggressive clinical behavior of cerebral hemorrhage using dynamic light scattering techniques // SPIE Proceedings. – 2012. - V. 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. - V. 8951.
5. Kurochkin M.A., Timoshina P.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V., «Advanced digital methods for blood flow flux analysis using μ IV approach // SPIE Proceedings. – 2015. - V. 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. - V. 9448.

Статьи в журналах из Перечня 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. - V. 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 - 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-Глушкова, 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 алкоголизованных крыс // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2016. – Т.12, №2. – С.106–109.

Благодарности

В заключение автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.ф.-м.н. Валерию Викторовичу Тучину. Автор благодарит к.ф.-м.н. Виленского Максима Алексеевича, Агафонова Дмитрия Николаевича, к.ф.-м.н. Лычагова Владислава Валерьевича за помощь в разработке экспериментальной установки, проведении калибровки с использованием фантома моделирующего микроциркуляцию. Кроме того, автор благодарит д.м.н. Александрова Дениса Анатольевича, д.б.н. Семячкину-Глушковскую Оксану Валерьевну, к.б.н. Бучарскую Аллу Борисовну за совместное проведение исследований по мониторингу микроциркуляции крови в условиях развития модельных патологий на животных методом спекл-контрастной визуализации.

Список литературы:

1. Bonner R., Nossal R. Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue // Appl. Opt. – 1981. – V.20. – P. 2097–2107.
2. 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.
3. Briers J. D. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging // Physiol. Meas. – 2001. – V.22. – P. 35–66.
4. 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.

5. 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. – V. 6436, №64360D-P.1–15.
6. Kedrin D., Gligorijevic B., Wyckoff J., Verkhusha V. V., Condeelis J., Segall J. E., Rheenen J. Intravital imaging of metastatic behavior through a mammary imaging window // Nature Methods. – 2008. – V.5. - P.141-175.
7. Cheng H., Luo Q., Zeng S. Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution // J. Biomed. Opt. – 2003. – V. 8, № 3. – P. 559- 564.
8. Zimnyakov D. A., Ushakova O. V., Briers D. J., Tuchin V. V., Speckle Technologies for Monitoring and Imaging of Tissues and Tissue-Like Phantoms /2nd ed. V.V. Tuchin, *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics. Methods*, SPIE Press, PM263, Bellingham, WA, USA, 2016. – V.2. - P. 429-495.
9. 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.
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. Li P., Ni S., Zhang L. Imaging cerebral blood flow through the intact rat skull with temporal laser speckle imaging // Opt. Lett. – 2006. – V.31, № 12. – P. 1824-1826.
12. 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.
13. Doblhoff-Dier V., Schmetterer L., Vilser W., Garhöfer G., Gröschl M., Leitgeb R., Werkmeister R. Measurement of the total retinal blood flow using dual beam Fourier-Domain Doppler Optical Coherence Tomography with orthogonal detection planes // Biomed. Opt. Express. – 2014. – V.5, №2. - P. 630.
14. 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 // J. Biomed. Opt. – 2013. – V.18, №11. – 111404.
15. 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.
16. 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
17. Briers J. D., Richards G., He X. W. Capillary Blood Flow Monitoring Using Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA) // J. Biomed. Opt. – 1999. – V.4, №1. – P. 164-175.
18. Basak K., Manjunatha M., Dutta P.K. Review of laser speckle-based analysis in medical imaging // Med. Biol. Eng. Comput. – 2012. – V.50, №6. – P. 547-558.
19. Shi R., Chen M., Tuchin V.V., Zhu D. Accessing to arteriovenous blood flow dynamics response using combined laser speckle contrast imaging and skin optical clearing // Biomed. Opt. Express.- 2015.- V.6, № 6.- P.1977-1989
20. Романова Т.П. Способ моделирования внутримозговых гематом при артериальной гипертензии / Т.П. Романова // Патол. физиол. эксперим. тер. – 1989. – №3. – С. 80–81.

Подписано в печать 13.10.2016.
Формат 60x90 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Объем 1.5 печ. л. Тираж 100 экз. Заказ № 161-Т

Типография СГУ
г. Саратов, ул. Б. Казачья 112а
тел.: (845-2) 27-33-85