

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

На правах рукописи

УДК 53.01



Литвиненко Елена Сергеевна

Экспериментальные и модельные исследования вклада эндотелий-опосредованного механизма авторегуляции сосудистого тонуса в динамику малых микроциркуляторных сетей

По специальности

03.01.02 — «Биофизика»

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук, профессор

Постнов Д.Э.

Оглавление

Введение	5
1 Методы исследования динамики микроциркуляции	31
1.1 Хориоаллантоисная оболочка куриного эмбриона как оптимальная биомодель. Технология <i>ex ovo</i> выращивания	31
1.1.1 Морфология развития хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона	31
1.1.2 Методы инкубации	33
1.2 Прижизненная визуализация лимфатических сосудов брыжейки крысы	35
1.3 Методика регистрации данных и лазерного воздействия на микроциркуляцию: описание экспериментальной установки	36
1.4 Вычислительные методики и разработанные программы	37
1.4.1 Программы стабилизации изображений	37
1.4.2 Метод разделения временных масштабов пульсаций скорости кровотока	38
1.5 Построение имитационных моделей больших фрагментов микроциркулятор- ных сетей	40
1.6 Выводы по главе	44
2 Сосудистые реакции интактной микроциркуляторной сети в ответ на ло- кализованную стимуляцию	45
2.1 Лазер-индуцированная вазореактивность одиночного сосуда ХАО куриного эм- бриона	46
2.1.1 Методика и протокол измерений	46
2.1.2 Индуцированные сосудодвигательные ответы в зависимости от длины волны лазера	47
2.1.3 Динамика индуцированного лазером сосудодвигательного ответа	50
2.1.4 Измерение скорости в условиях сильной пульсации кровотока	50
2.1.5 Влияние мощности облучения в зависимости от возраста куриных эм- брионов	53

2.1.6	Исключение гипотезы деформации тканей при разогреве	55
2.2	Паттерны перераспределения кровотока в микроциркуляторной сети ХАО куриного эмбриона	56
2.2.1	Перераспределение потоков на Y-бифуркации сосудов	56
2.2.2	Перераспределение потоков в малом фрагменте интактной микроциркуляторной сети	57
2.2.3	Обсуждение результатов	62
2.3	Лазер-индуцированная вазореактивность лимфатических сосудов брыжейки крысы	64
2.3.1	Протокол измерений	64
2.3.2	Результаты	64
2.4	Заключение по главе	66
3	Модельное исследование процессов авторегуляции сосудистого тонуса	68
3.1	Модель сегмента кровеносного сосуда с учетом авторегуляции его сечения	69
3.1.1	Пространственная структура клеточных слоев и обоснование выбора функционального сегмента	69
3.1.2	Основные пути авторегуляции потока в сегменте сосуда	70
3.1.3	Уравнения модели сегмента	72
3.1.4	Безразмерная форма модели	76
3.1.5	Модель как динамическая система	76
3.1.6	Параметризация модели	77
3.2	Реакция одиночного сегмента на тестовый сигнал	83
3.2.1	Динамика авторегуляции диаметра сосуда во времени: комбинированный отклик на давление и поток	86
3.2.2	Действие эндотелиального механизма при пульсациях кровотока	87
3.3	Эффекты перераспределения кровотока в Y – бифуркации сосуда	90
3.4	Особенности действия эндотелиального механизма в малой сети сосудов	91
3.4.1	Эволюция состояния выбранной реализации сети	95
3.4.2	Вариабельность паттерна реакции в зависимости от выбранной реализации сети	96
3.4.3	Эндотелиальная регуляция в однородной сети	101
3.5	Обсуждение результатов и выводы по главе	104

Заключение	106
Список литературы	110

Введение

Актуальность темы

К настоящему времени физиологам ясно, что сосудистая система человека и животных – это сложный орган с адаптивным поведением, централизованно управляемый системными механизмами и одновременно саморегулирующийся на локальном уровне [1]. Накоплено значительное количество экспериментальных данных о механизмах, регулирующих кровяное давление посредством сокращения либо расслабления клеток гладкой мускулатуры (КГМ) резистивных сосудов и задающих его изменение в ответ на локальные и системные факторы [2, 3].

Система регуляции сосудистого тонуса проста и сложна одновременно. Проста, потому что любые факторы, им управляющие, в конце концов приводят к универсальному ответу в виде изменения концентрации кальция внутри КГМ сосудов и их последующему сокращению либо расслаблению. Эта же система сложна, так как путей управления активностью КГМ – множество. Некоторые из этих путей изучены хорошо, особенно – локальные. Установлены основные типы ионных каналов, пути транспорта и превращений сигнальных молекул в клетках гладкой мускулатуры сосудистой стенки, которые отвечают за сократительную активность [2]. Исследованы основные типы (паттерны) реакции изолированного сосуда на изменение различных факторов [4].

Другие механизмы регуляции сосудистого тонуса изучены лишь на уровне отдельных клеток либо на уровне изолированного сегмента сосуда, но не *in situ*, не в составе цельной и функционирующей кровеносной сети. В частности, явно недостаточно исследован вопрос, как механизмы авторегуляции сосудистого тонуса работают в условиях взаимного влияния сосудов в пределах микроциркуляторной сети.

Сказанное выше имеет прямое отношение к эндотелию сосудов, внутреннему слою толщиной в одну клетку эндотелия (КЭ). Широко известно, что здоровье сосудов в целом напрямую связано с состоянием и функциональностью КЭ. Гораздо менее известно то, что помимо разнообразных защитных функций и реакции на приносимые кровью вещества, КЭ играют собственную важную роль в управлении сосудистым тонусом. В частности, они обес-

печивают реакцию сосуда на изменение скорости кровотока в нем, а также способствуют пространственно-когерентному сокращению либо расслаблению КГМ, тем самым обеспечивая изменение состояния сосуда как целого.

В англоязычной литературе применяется целый ряд терминов, обозначающих эндотелий-управляемую вазодилатацию, которая выглядит как расслабление сосуда при увеличении линейной скорости потока в нем. Эти термины включают: FMD (flow-mediated dilation), FIV (flow-induced vasodilatation), FID (flow-induced dilatation) и применяются в медицинской диагностике.

Установлено, что эндотелиальный слой играет определяющую роль в формировании пространственно - синхронизованных сосудистых реакций – так называемой распространяющейся вазореактивности [15, 16] или функциональной гиперемии, которая имеет место как при работе скелетной мускулатуры [17, 18], так и при нормальном функционировании органов, таких как почки или мозг [19, 20].

В свете вышесказанного, анализ кровотока в интактной сети требует учета как локальной, так и пространственной эндотелий-опосредованной регуляции сосудистого тонуса.

Следует отметить, что по своей сути такая задача относится более к области биофизики, нежели экспериментальной физиологии, так как предполагает разработку специальных методов воздействия на сосуды, анализ совместного действия разнородных процессов, математическое моделирование и исследование динамики сложных систем.

В области экспериментального исследования авторегуляции в интактной микроциркуляторной сети недостаточно разработаны методы тестового воздействия на состояние выбранного сосуда в составе сети, такого, которое не повреждало бы сеть и не нарушало существенно режимы функционирования соседних сосудов. Ощущается недостаточность существующих методов многоточечного мониторинга состояния сети.

В области теоретического анализа, в последние десятилетия обособленно сосуществуют две различные и слабопересекающиеся области математического моделирования, одна из которых базируется на гидродинамическом подходе [21, 22], где в целях “решаемости” уравнений степень упругости сосудистой стенки, как правило, считается постоянным параметром. В свою очередь, модели клеточных механизмов управления сосудистым тонусом не включают описание собственно регуляции потока крови [23, 24]. Автору известно относительно небольшое число работ по моделированию функций сосудистой системы [25, 26], в которых динамика микроциркуляции анализировалась бы в условиях активной ее саморегуляции, опосредованной клетками сосудистой стенки.

Все вышесказанное убеждает в актуальности комплексного как экспериментального, так и модельно-теоретического исследования, направленного на расширение существующих представлений о роли опосредованных эндотелием механизмов регуляции работы микроциркуляторной сети, как цельной взаимосвязанной структуры, управляемой как гидродинамическими (гемодинамическими) законами, так и клеточными механизмами, задающими текущую упругость сосудистой стенки. Такое исследование должно включать также разработку и совершенствование методов исследования, адекватных решаемым задачам.

Разработанность темы

Эндотелий-опосредованная регуляция сосудистого тонуса

Клетка эндотелия является одноядерной клеткой, имеет длину 30-140 мкм, ширину 10-20 мкм и толщину 3-5 мкм, утончаясь по краям. Клетки эндотелия (КЭ) выстилают внутренний слой кровеносных сосудов, ориентированы вдоль продольной оси сосуда в виде “паркета” и образуют непрерывный монослой в крупных сосудах и прерывистый, сетчатый слой в капиллярах, в соответствии с одной из своих основных функций: обеспечением свободного обмена кислородом и питательными веществами между сосудами и тканями. Эндотелий в сосудах выполняет и другие функции: (1) защитная, (2) участие в ангиогенезе, в том числе посредством выработки эндотелиального фактора роста (VEGF, от англ. Vascular endothelial growth factor), (3) противостояние адгезии тромбоцитов, (4) регуляция сосудистого тонуса и потока крови, в ходе которой КЭ вырабатывают: эндотелиальный фактор релаксации (EDRF, от англ. endothelium-derived relaxing factor(s), среди которых оксид азота (II) (NO) и простаглицлин; а также эндотелиальный фактор гиперполяризации (EDHF, от англ. endothelium-derived hyperpolarizing factor), к которым относят открытие K^+ ионных каналов, приводящих к гиперполяризации клетки, конечным результатом чего становится расширение сосудов; эндотелиальный фактор сокращения (EDCF, от англ. endothelium-derived contracting factor), главным из которых является эндотелин-1, в ответ на механические силы, гуморальные вещества и нейронную активность, регулируя тем самым тонус сосудов. Повышенное артериальное давление сужает одни кровеносные сосуды, изменяя тем самым скорость кровотока через другие, что в свою очередь вызывает изменение напряжения сдвига (НС), влияющего на монослой клеток эндотелия, выстилающий внутреннюю поверхность сосудов. Таким образом, можно выделить два вида механических сил, действующих на эндотелий и в целом влияющих на функционирование сосудов: окружное напряжение сосудов, вызванное колебанием артериального трансмурального давления, и напряжение сдвига, зависящее от скорости

кровотока [5]. В то время как реакция на окружное напряжение сосудов (т. н. миогенный ответ) в основном опосредована клетками гладкой мускулатуры, напряжение сдвига воспринимается клетками эндотелия. Справедливости ради, стоит заметить, что вклад в регуляцию сосудистого тонуса вносит и метаболический контроль, однако его изучение выходит за рамки данной диссертационной работы. Разные типы сосудов (артериальные, венозные, лимфатические) имеют различную чувствительность к НС [27]; НС варьируется от 1 Па в восходящей аорте до 4 Па в капиллярах, и до 5 Па в артериолах при нормальных физиологических условиях, а в венозной системе оно примерно в 10 раз меньше [5].

Клиническая оценка состояния эндотелиальной ткани диагностируется с помощью метода поток-опосредованной дилатации (FMD, от англ. flow-mediated dilation), впервые предложенного в 1992 году [28]. Измерение эндотелиальной функции плечевой артерии высокочастотным ультразвуковым датчиком показало, что эндотелиальная дисфункция, измеренная FMD, предсказывает возможность сердечно-сосудистого риска. Одной из причин эндотелиальной дисфункции является нарушение в выработке эндотелием сосудорасширяющего вещества – оксида азота (NO). В настоящее время этот метод все еще используют, усовершенствовав аппаратуру и добавив дополнительные каналы измерений, например, электрокардиограмму [29]. Полученные результаты для разных возрастных групп показали, что пик максимального расслабления сосуда достигается в среднем интервале от 50 до 80 сек после начала инициации напряжения сдвига [30].

Локальные механизмы регуляции

Основной механочувствительной единицей эндотелиальной клетки (как и других клеток) является ее плазматическая мембрана (ПМ), которая наряду с такими функциями, как барьерная, обменная, питательная, выполняет защитную функцию, направленную на сохранение своей целостности и возможность изменения формы клеток. Механические силы дестабилизируют клеточный гомеостаз, в ответ на это происходит реакция клеток с целью сохранения своей целостности, для чего они запускают соответствующий каскад реакций и в дальнейшем переходят в новое состояние. ПМ содержит механочувствительные структуры, чувствительные к механическому состоянию ПМ и к его изменению, которые преобразуют механический импульс, передаваемый на ПМ, в биохимическую ответную реакцию. Таким образом, плазматическая мембрана выступает в роли как механосенсора, так и механотрансдуктора [9]. К механочувствительным рецепторам, расположенным на ПМ относят:

(1) Различные мембранные белки и белковые комплексы, чувствительные к напряжению сдвига и регулирующие активность эндотелиальной синтазы оксида азота (*eNOS*), детально

описанные в обзоре [5]. Одними из разновидностей микродоменов – субструктуры, характеризующиеся динамическими комплексами белков и липидов (липидные рафты) – являются кавеолы [5, 13]. Кавеолы содержат в себе множество структур, в том числе структуру, состоящую из *eNOS* и белка кавеолин (*Cav-1*). Известно, что при нормальных условиях, *Cav-1* ингибирует активность *eNOS*, однако под действием НС происходит растяжение мембранной стенки и *eNOS* отделяется от *Cav-1* и диффундирует в КЭ, где активируется посредством связывания комплекса кальций-кальмодулин. В результате реакции окисления аминокислоты *L*-аргинин с участием фермента *eNOS* в клетках эндотелия образуется молекула оксида азота (*NO*).

(2) Гликокаликс – гелеобразный слой, расположенный на поверхности ПМ и непосредственно граничащий с элементами крови в сосудах [31] – изменяется под действием НС и взаимодействует с цитоскелетом и *G*-белком, результатом чего следует механотрансдукция и регуляция *eNOS* [5, 32].

(3) Катионные механоправляемые каналы. В конце 1980 годов были опубликованы две подряд работы, разных авторских коллективов [33, 34], основанные на методе локальной фиксации потенциала (пер. с англ. whole-cell patch-clamp recordings), которые показали наличие в клетке эндотелия двух ионных каналов (селективных для Ca^{2+} и K^+ , соответственно), ток через которые увеличивался с ростом напряжения сдвига. Было предположено, что данные каналы являются механочувствительными. Позже они получили названия:

(а) Калиевые каналы внутреннего выпрямления (*KIR* от англ. inward rectifying K^+ -channels) [10, 14, 32, 35, 36]. Семейство *KIR* каналов состоит из 18 субъединиц. Канал *KIR2.1* широко распространен в клетках эндотелия, активируется под действием напряжения сдвига и приводит к быстрой гиперполяризации клетки, к примеру, увеличивая потенциал плазматической мембраны на 2-6 мВт в отклике на НС от 1-5 дин/см² [36]. Однако независимо от *KIR* каналов на НС реагируют и хлорные каналы (outward-rectifying Cl^- channels), активация которых более медленная, нежели калиевых каналов, но активируясь, Cl^- каналы уводят клетку в состояние деполяризации [14, 36]. Калиевые каналы активируются как на ламинарный поток, так и на колебательный, тогда как хлорные каналы – только на ламинарный [14]. Известно, что с прекращением кровотока КЭ деполяризуются, что связывают с закрытием *KIR2.1* каналов [10]. Также эндотелиальные каналы *KIR2.1* [37–39] принимают непосредственное участие в передаче сигнала гиперполяризации по артериолам вверх по потоку при распространяющихся сосудистых реакциях, о которых более подробно будет рассказано в следующем подразделе.

(б) Относительно недавно были найдены Piezo каналы, пропускающие ионы Ca^{2+} внутрь клетки [11, 32, 40].

(в) рецептор-управляемые катионные каналы (*TRP* от англ. transient receptor potential) [9–12, 32]. Несмотря на их разнообразие, например, *TRPA1*, *TRPV3* и *TRPV4* каналы, как чувствительный к НС канал отмечают *TRPV4*. При активации каналов ионы Ca^{2+} поступают внутрь клетки, что приводит к ее деполяризации. Отметим, что мембранный потенциал покоя клетки эндотелия может принимать значения в довольно широком интервале в пределах бимодального распределения, при этом наиболее вероятными являются значения минус 40 и минус 70 мВ [41].

В обзорной работе [42] приведены данные, согласно которым приток ионов кальция в клетке эндотелия может вызвать два независимых эффекта, во-первых, втекающий Ca^{2+} воздействует на рецептор инозитолтрифосфат (*IP3*), вследствие чего происходит утечка ионов Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, которые активируют калиевые каналы средней и малой проводимости (*IK_{Ca}*, *SK_{Ca}*, существует и калиевый канал большой проводимости *BK_{Ca}*, однако он располагается на ПМ клеток гладкой мускулатуры), через которые происходит утечка ионов K^+ из клетки, и клетка гиперполяризуется. Сигнал гиперполяризации передается КГМ через миоэндотелиальные щелевые контакты, соединяющие КЭ и КГМ. Каждая эндотелиальная клетка может установить контакт с до 20 клеток гладкой мускулатуры [43, 44]. Гиперполяризация деактивирует потенциал-зависящие кальциевые каналы КГМ, что ведет к расслаблению КГМ (вазодилатации). Из этого следует, что активация *I/SK_{Ca}* играет важную роль в вазодилатации сосудов [10, 32, 42]. Во-вторых, втекающий кальций способствует активации *eNOS*, в результате, по вкратце описанному механизму выше, образуется *NO* и происходит вазодилатация.

I. Levitan с соавторами в экспериментальной работе [45] показали, что как *KIR*, так и *I/SK_{Ca}* каналы способствуют эндотелий зависимой дилатации, однако *KIR* каналы – по *NO*-зависимому пути, в то время как *I/SK_{Ca}* каналы – по *NO*-независимому пути. Также предполагается, что приток ионов Ca^{2+} в клетку посредством *TRP* каналов снижается *Cl⁻* каналами, описанными выше, что стабилизирует мембранный потенциал клетки [14].

Таким образом, все три вида рецепторов в той или иной степени способствуют активации синтазы оксида азота и являются *NO*-зависимыми механизмами, приводящими к расширению сосудов.

Результаты исследований, приведенные в работе [46], показали прямую и обратно пропорциональную зависимость вклада EDRF (*NO*) и EDHF, соответственно, в вазодилатацию с уменьшением радиуса сосудов. В ответ на воздействие ацетилхолином, вклад (*NO*) в вазо-

дилатацию был наиболее сильным в аорте, тогда как вклад EDHF был наиболее заметным в дистальных брыжеечных артериях.

Синтаза оксида азота – фермент, под действием которого происходит синтез молекулы оксида азота. Известно три вида синтазы оксида азота: эндотелиальная (*eNOS*), нейрональная (*nNOS*) и макрофагальная (*iNOS*). Место нахождения синтаз соответствует их названию. Первые две синтазы зависят от уровня ионов Ca^{2+} в клетке и их называют конституционными, последняя – индуцибельная, ее время реакции достигает 8 часов, а количество продуцируемого *NO* в сотни раз больше чем *eNOS*, тем самым она оказывает патологическое воздействие на клетки [6].

В 1977 году Ферид Мурад (Ferid Murad), исследуя нитроглицерин, обнаружил, что нитраты выделяют *NO*, который расслабляет гладкомышечные клетки и расширяет сосуды. В 1978 году американский ученый Роберт Ферчготт (1916-2009, Robert Furchgott) экспериментально обнаружил присутствие в клетках эндотелия сосудорасширяющего вещества – EDRF [47]. Несколькими годами позже, в 1986 Луи Игнаро (Louis Ignarro) идентифицировал это вещество как оксид азота. В 1992 году журнал “Science” признал молекулу *NO* молекулой года [48]. В 1998 году Р. Ферчготт, Л. Игнаро и Ф. Мурад стали лауреатами Нобелевской премии по физиологии или медицине “За открытие роли оксида азота как сигнальной молекулы в регуляции сердечно-сосудистой системы”.

NO – молекула бесцветного газа, обладает высокой диффузионной способностью [5], поэтому свободно проходит через клеточные мембраны и поступает как в кровоток, где связывается с гемоглобином и переносится эритроцитами, так и в клетку гладкой мускулатуры, где реагирует с растворимой гуанилатциклазой с образованием циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). Рост цГМФ вызывает снижение уровня цитозольного Ca^{2+} , что ведет к ослаблению актин-миозинового комплекса и вазодилатации [5–7]. Также, в клетках гладкой мускулатуры сосудистой стенки *NO* подвергается быстрым радикальным реакциям и реакциям окисления с образованием множества производных, которые также являются биологически активными, в том числе – и сосудосуживающими. Например, *NO* может быть окислен с образованием сильных нитрозирующих агентов (таких как N_2O_3 или NO_2), которые нацелены на тиолы, могут превращаться в метаболиты с различной стабильностью и биологической активностью (включая NO_2^- и NO_3^- , нитрозотиолы, нитрозамин) или вступать в реакцию с активными веществами с образованием пероксинитрита ($ONOO^-$) и нитрозоперсульфида ($SSNO^-$). Подобные преобразования увеличивают его биологические эффекты. Вместе эти химико-физические характеристики делают *NO* одной из самых универсальных сигнальных

молекул в биологии. Однако вследствие его высокой способности к реакциям и универсальности, передача сигналов NO должна быть под строгим контролем [5–7].

Все приведенные выше механосенсоры также обнаружены и на ПМ эритроцитов. К настоящему моменту не известно, чем именно активируются ионные каналы (растяжением и искривлением мембраны в ответ на НС или под действием давления [9, 10, 32]), и в целом не до конца понятен механизм, по которому, как эндотелиальные клетки, так и эритроциты чувствуют напряжение сдвига [5].

Пространственно-распространенная вазореактивность

Распространяющиеся сосудистые реакции (VCR, от англ. vascular conducted responses) играют важную роль в функционировании артериальной части микроциркуляторных сетей [4]. VCR инициируются локальной стимуляцией, вызывающей вазодилатацию или вазоконстрикцию, после чего быстро распространяются в обоих направлениях по небольшим кровеносным сосудам независимо от наличия и направления потока крови или активности околосоудистых нервов [15, 16].

В большинстве опубликованных исследований основное внимание уделялось VCR, вызванным локальным применением агонистов к артериолам, но известно, что местная стимуляция капилляров может также инициировать VCR, который распространяется вверх по течению в питающие артериолы [49, 50]. В недавно опубликованной экспериментальной работе [20] вследствие приложенной стимуляции было показано распространение вазодилатации по церебральным капиллярам вверх и вниз по потоку со скоростью 5–20 мкм/с посредством активного участия капиллярных перицитов. Авторы статьи [19] показали, что передача сигналов по эндотелию пиальных артерий может играть ключевую роль в распространении вазодилатации на большие расстояния во время функциональной гиперемии мозга.

Скорость распространения изменений в диаметре оценивается как от 1 до 3 мм/с при внутриклеточных измерениях концентрации Ca^{2+} или измерениях диаметра определенным разрешением по времени [51–54], однако электрофизиологические записи с более высоким временным разрешением [55, 56] дают величины от 20 до 45 мм/с. Для сравнения, скорость распространения межклеточных Ca^{2+} волн по артериолам оценивается до 0.1 мм/с [57, 58]. Таким образом, VCR распространяются со скоростью, которая в 10 – 1000 раз быстрее типичной скорости распространения кальциевых волн.

Способность локального вазоактивного стимула трансформироваться в распространяющийся отклик диаметра сосуда зависит от вида приложенного агониста, а также от вида сосудистых клеток. Было показано, что локальная деполяризация, приложенная к слою кле-

ток гладкой мускулатуры (КГМ) в крысиных почечных и брыжеечных артериолах, приводит к типичной длине распространения в несколько сотен микрометров [53, 59, 60]. В то же время, в питающих артериях и артериолах скелетных мышц местное применение ацетилхолина, который активирует мускариновые рецепторы на клетках эндотелия (КЭ), вызывает распространяющуюся гиперполяризацию с небольшим затуханием на протяжении двух миллиметров [56, 61].

К настоящему времени в научной литературе сформировалось общее мнение, согласно которому вазодилатация ассоциируется с гиперполяризацией, в то время как вазоконстрикция – с деполяризацией в клеточных слоях сосудистой стенки, то же справедливо и относительно распространяющихся процессов. Вероятные участники данных механизмов находятся еще в стадии обсуждения, выше была приведена часть из них.

Поскольку клетки эндотелия связаны между собой щелевыми контактами, локальная эндотелиальная гиперполяризация может распространяться от одной клетки эндотелия к другой вдоль длины сосуда [61–65].

В работах [66, 67] были показаны случаи локального применения таких вазоконстрикторов как норадреналин или фенилэфрин к артериолам с дальнейшим проявлением как монофазной распространяющейся вазоконстрикции, так и бифазной локальной вазоконстрикции, за которой следовала распространяющаяся вазодилатация.

В работе [68] высказывалась альтернативная гипотеза, основанная на том, что активность *KIR* каналов может вызвать прямое распространение гиперполяризации вдоль слоя эндотелиальных клеток, сопровождаемое прямой передачей скачка потенциала клеткам гладкой мускулатуры сосудов. Эта гипотеза была поддержана некоторыми недавними работами [69]. С другой стороны, в обзоре [70] отрицается необходимость в регенеративном процессе для объяснения основной массы экспериментальных данных и делается упор на проявлении нелинейных свойств клеточной динамики при передаче возбуждения и конвертации его в механическое сокращение стенки сосуда.

Физиология сокращения лимфатического сосуда

Лимфатические сосуды обнаружены почти во всех органах [71–73]. Участок сосуда между двумя клапанами называется лимфангион.

Лимфатические сосуды во многом подобны артериолам, им характерен базальный тонус, миогенное сокращение и расширение, посредством выработки эндотелием NO [74, 75]. Этот факт делает интересным сопоставление реакции кровеносных и лимфатических сосудов на облучение лазером.

Гладкомышечные клетки лимфатических сосудов (КЛМ) классифицируют как гладкую мышцу сосуда, но она обладает биохимическими и функциональными характеристиками как сосудистой, так и сердечной мышцы [76]. Механизмы сокращения КГМ и КЛМ схожи [77], а отличия обусловлены пейсмейкерным характером динамики стенок лимфососудов. Как в сердечной мышце, спонтанные сокращения КЛМ инициируются потенциалами действия (ПД), которые, вероятно, происходят из самих КЛМ, но также могут генерироваться сетью интерстициальных клеток [78–80]. КЛМ также имеют несколько видов ионных каналов, аналогичных тем, что контролируют пейсмейкеры в синоатриальном узле [81–85].

После того, как лимфатические сокращения вызываются потенциалом действия в одной из КЛМ, ПД быстро распространяется от клетки к клетке (со скоростью более 8 мм/с) и в любом направлении по длине лимфангиона [86,87]. Для таких почти синхронных сокращений необходима электрическая связь между лимфатическими мышечными клетками, предположительно посредством белков межклеточных щелевых контактов. Электрическое взаимодействие между КЛМ было зарегистрировано в [88]. В сегментах брыжеечного лимфатического сосуда, исследовавшихся как *ex vivo*, так и *in vivo*, применение блокаторов щелевых контактов приводит к расскоординированным сокращениям различных частей лимфатической цепи [86].

Важным различием между артериолами и лимфатическими сосудами является очень ограниченная степень электрической связи между лимфатическими эндотелиальными клетками (ЛЭК) и гладкомышечными клетками лимфатических сосудов [88]. Было подтверждено, что КЛМ лимфатических сосудов крыс имели мембранный потенциал покоя около минус 40 мВт и запускали спонтанные ПД, в то время как ЛЭК имеет стабильный потенциал покоя около минус 70 мВт [89], который не колебался во время сокращений вышележащего мышечного слоя.

Таким образом, доступные данные о механизмах сократительной активности лимфатических сосудов свидетельствуют в пользу параллельного исследования их реакций, в частности, на лазерное излучение (что будет рассмотрено далее), так как в данном случае заранее исключен вклад форменных элементов крови.

Сосудистая сеть куриного эмбриона как биомодель

Все большую популярность в качестве биологических моделей для исследований в настоящее время набирают как сам куриный эмбрион, так и его хориоаллантоисная оболочка (ХАО). Главными преимуществами которых являются: дешевизна и доступность материалов (имеется ввиду, что для получения куриных эмбрионов необходимы только оплодотворенные

яйца и инкубатор, который, в том числе, можно сделать самостоятельно), а также свободный доступ к обширной сети кровеносных сосудов и отсутствие иммунной системы до 18 дня развития [90,91]. Модель куриного эмбриона нашла широкое применение среди таких областей как: исследование эмбрионального развития, опухоли, ангиогенеза, гемодинамики; в областях иммунологии, генетики, нейрологии; как генетическая модель для заболеваний человека, как модель для прижизненной визуализации [92]. В 1986 году Рита Леви-Монтальчини (1909-2012) стала лауреатом Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытие фактора роста, при этом значительная часть ее экспериментов была выполнена на курином эмбрионе.

С 1930-х годов ХАО начали использовать для культивации вирусов и бактерий. При исследовании опухоли [92–96], сосуды ХАО положительно реагируют на подсадку опухолевых клеток, в результате чего опухолевые клетки прорастают в сосуды и попадают в кровь. ХАО куриного эмбриона широко применяется для исследования процессов ангиогенеза [92,97–100].

Как тестирование на ХАО (HET-CAM test, от англ. the Hen's egg test on chorioallantoic membrane) [101, 102], так и на самом курином эмбрионе [103] проводят в целях проверки лекарственных и косметических средств и рассматривают как потенциальную замену теста Дрейза (Draize test), разработанного в 1944 году и в большинстве случаев проводимого на глазах кроликов. ХАО куриного эмбриона как более доступная модель для начальных исследований острой токсичности противоопухолевых препаратов может быть альтернативной моделью исследований на грызунах [104]. Авторы работы [105] предлагают использовать модель ХАО куриного эмбриона для исследования лекарственных средств в области радиационной биологии и экспериментальной радиационной онкологии.

Сам куриный эмбрион служит объектом для исследований процесса формирования сердца и коронарных сосудов [106–108], в частности – для получения количественных 3D морфологических данных о развитии сердца на основе применения 3D магнитно-резонансной микроскопии с высоким разрешением в комбинации с двухконтрастной техникой [109]. В другой области исследований куриные эмбрионы выступают в качестве моделей для разработки специальных методов электрокардиографии [110].

В работах [111–113] было исследовано пагубное воздействие на развивающийся эмбрион: паров спирта, что приводило к кардиомиопатии; магнитно-резонансной томографии, что приводило к нарушениям нервной трубки и задержке роста эмбриона; и табачных изделий, что способствовало риску возникновения паралича. Однако, на этой же модели, в результате исследований, пагубное воздействие на живой организм радиочастотных электромагнитных полей, которые используются, например, в мобильных телефонах и wi-fi, авторами обнару-

жено не было [114]. Авторами работы [115] была показана возможность циркуляции в крови куриных эмбрионов углеродных наночастиц без каких-либо значительных побочных эффектов и предположено их потенциальное применение в качестве адресной доставки лекарств.

Таким образом, ХАО куриного эмбриона является востребованной биомоделью при различных исследованиях процесса формирования сердечно-сосудистой системы, в иммунологии и онкологии.

В исследованиях микроциркуляции ХАО как биологическая модель используется значительно реже. Авторами статьи [116] было проведено экспериментальное исследование скорости кровотока во внеэмбриональных кровеносных сосудах, т.е. в желточных сосудах, которые отходят от эмбриона и играют роль плаценты млекопитающих. В работах [117, 118] скорость кровотока в сосудах измеряли с помощью доплеровской оптической когерентной томографии (спектральной доплеровской анемометрии). Эксперименты в представленных случаях были проведены на сосудах трех-четырех дней инкубации. Скорость сердечного потока методом доплеровской эхокардиографии была измерена в работе [119]. Группа авторов [120] исследовала скорость плазмы крови в сердце куриного эмбриона [121]. Сигнальные механизмы, связанные с напряжением сдвига сосудистой стенки, исследованы в [122, 123].

Оптические методы анализа кровотока

Применение оптических методов для диагностики и терапии – сегодня обширная и бурно развивающаяся область исследований [124, 125]. Среди давно известных и используемых оптических методов анализа микроциркуляции можно выделить метод фотоплетизмографии (PPG), основанный на зависимости пропорции прошедшего или отраженного сигнала от степени общего кровенаполнения сосудов тканей. Из недавних модификаций и новых применений метода можно отметить [126], где на основе методов PPG и динамической термографии исследуют взаимосвязь между плечевой окклюзионной пробой, изменением температуры рук при этом и параметрами микроциркуляции, или же работу [127], где метод применен для оценки артериальной недостаточности нижних конечностей. В статье [128] обсуждаются аппаратные аспекты – преимущества новых самокалибрующихся фотоплетизмографов.

Заметим, метод PPG в существующей форме не дает прямой информации о таких параметрах как линейная или объемная скорость кровотока, в отличие от таких методов, как лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ) или лазерная доплеровская анемометрия (ЛДА).

Метод ЛДФ основан на эффекте доплеровского сдвига частоты при рассеянии лазерного излучения эритроцитами и получил распространение в России во многом благодаря активности разработчиков и производителей аппаратуры [3]. Объем зондируемой ткани в методе

ЛДФ определяется геометрией и оптическими параметрами светового зонда и составляет, как правило, 1 мм^3 для (красного) излучения. Указанный объем ткани может содержать сеть кровеносных сосудов с общим числом эритроцитов, достигающих нескольких тысяч. Поскольку сеть может включать разнокалиберные сосуды с разными скоростями движения эритроцитов, в методе ЛДФ применяется алгоритм усреднения, который позволяет получить сдвиг доплеровской частоты по всей совокупности сосудов, попадающих в зондируемую область.

Заметим, что метод ЛДФ не позволяет измерить абсолютное значение скорости и даже в инвазивном варианте не пригоден для измерений в плоскости наблюдения. Указанными возможностями обладает метод ЛДА, основанный на эффекте отражения интерференции скрещенных лазерных лучей [129]. К особенностям этого метода относятся сложность многоточечных измерений и применения в условиях пульсаций кровотока [130].

Измерение и количественное определение кровотока в малых сосудах по данным визуализации (на основе изображений) является целью нескольких разрабатываемых методов [131, 132]. Применительно к анализу кровотока представляются наиболее перспективными методы спекл-визуализации [133, 134], а также метод анемометрии по изображению частиц (PIV, от англ. “particle image velocimetry”). Оба этих метода выдают данные в виде последовательности изображений, а информация о параметрах кровотока извлекается из их временной и/или пространственной изменчивости, а не из значения (яркости) каждого пикселя. По этой причине, совершенствование аппаратной части методов [135, 136] идет параллельно с разработкой более совершенных алгоритмов и программ обработки данных [137, 138]. Метод PIV имеет ряд новых модификаций, в одной из недавних работ метод ультразвуковой PIV был успешно применен к исследованию брюшного отдела аорты [139].

Поскольку все три метода: ЛДА, спекл-визуализация и PIV предназначены для измерения скорости потоков, имеется публикация по их сравнительному анализу [140].

По мере начала использования описанных выше методов в реальных экспериментах, возникла проблема адекватной обработки реальных (не модельных) биомедицинских данных, для которых характерна нестационарность, наличие сосуществующих ритмов, переходные режимы и высокий уровень шума. По этой причине, наблюдается растущая популярность применения для этих целей аппарата непрерывного вейвлет-преобразования (CWT) [141–144]. Имеется тенденция к разработке форм и модификаций алгоритмов, приспособленных для определенного класса задач [134, 137].

Воздействие на микроциркуляторную сеть лазерного излучения

Применение лазеров в биомедицинских исследованиях – это большая и динамично развивающаяся область знаний [124]. В последние годы определенную известность получила т. н. низкоинтенсивная лазерная терапия (Low-Level Laser Therapy, LLLT), эффективность которой и механизмы действия продолжают активно обсуждаться [145].

Примером пионерской работы по лазерному воздействию на сосуды служит работа [146], где изучается действие аргонового лазера 514 нм на сосуды ушка мышки: капилляры, вены и артерии. Диаметр лазерного пучка составлял 100 мкм, выходная мощность лазера была 300 мВт. При увеличении выходной мощности лазера до 500 мВт образовывался тромб, который проносился с потоком через некоторое время. В результате проведенного эксперимента было показано, что более всего лазерному воздействию подвержены капилляры, затем вены и артерии.

Более 20 лет назад было отмечено, что воздействие лазера на кровеносные сосуды может вызвать их разнонаправленную реакцию [147]. Было, в частности, показано, что эритроциты способны переносить молекулы оксида азота, которые высвобождаются под действием лазерного излучения. В статье [148] сформулирована гипотеза, согласно которой эритроциты выделяют АТФ. АТФ, в свою очередь, активирует эндотелиальную синтазу азота, что и приводит к вазодилатации сосуда. В работах [149–151] было показано, что эритроциты являются хранилищем нитрита, а взаимодействие нитрита с оксигемоглобином уже продуцирует оксид азота (II) и метилгемоглобин. Также, нитрит взаимодействует и с деоксигемоглобином до образования оксида азота и метилгемоглобина, но эта реакция протекает в условиях гипоксии. Также было обнаружено, что тромбоциты человека содержат эндотелиальную синтазу оксида азота [152]. Авторы в статье [153] приводят доказательства того, что тромбоциты в условиях ранения груди и живота способны усиленно генерировать оксид азота (II), способствующий ингибированию образования агрегации тромбоцитов.

В работе [154] исследована реакция микрососудов размером 10-50 мкм различных органов крыс на воздействие He-Ne лазера с длиной волны 630 нм. В результате лазерного облучения наблюдались как вазодилатация исследуемых сосудов, так и увеличение скорости кровотока в них, в зависимости от места расположения сосуда.

В обзоре [155] отмечена группа работ, в которых показано, что лазерное воздействие на кровь внутри сосуда может стимулировать кратковременное высвобождение оксида азота (NO) эритроцитами, что, в свою очередь, оказывает вазодилатирующий эффект [148,156,157]. В отличие от типичной LLLT, основанной на использовании инфракрасного излучения, в указанных работах отмечается, что эффект тем более выражен, чем короче длина волны лазера.

В работе [158] воздействовали на аорту белых кроликов эксимерным лазером. При воздействии лазером без предварительной обработки исследуемых участков медикаментами наблюдалась неконтролируемая реакция сосудов. После предварительной обработки норепринефрином за лазерным воздействием следовала 100% дилатация сосуда. После нитроглицерина наблюдалась 100% констрикция сосудов.

В работе [159] было проведено воздействие лазерным излучением (445 нм, 300 мВт, 4 мм выходной пучок) на кольца аорты, в результате чего происходило их сокращение, несмотря на экспериментально зафиксированное выделение оксида азота (NO). Данный феномен авторы объяснили тем, что под действием лазерного излучения в эндотелиальных клетках происходит выделение NO из эндотелиальной синтазы оксида азота и одновременно происходит активация окислительного стресса, который превращает молекулу NO в вазоконстрикторную молекулу ONOO-. В результате экспериментального ингибирования эндотелиальной NO синтазы, происходило уменьшение сокращения. Также экспериментально было показано, что в клетках гладкой мускулатуры потенциал-зависимые кальциевые каналы подавляются лазерным излучением, что приводит к расслаблению колец аорты, и в этих же клетках, под действием лазера, увеличивалось фосфорилирование тирозина, что приводило к сокращению колец аорты.

Таким образом, на сегодняшний день показано, что:

- элементы крови способны генерировать отвечающий за сосудодвигательную реакцию оксид азота (II) и потому должны рассматриваться как часть системы “сосуд-кровь”, реагирующей на излучение;
- имеются различные клеточные механизмы, отклик которых на лазерное излучение может вызвать различные реакции, в зависимости от условий эксперимента.

По мере накопления знаний все более очевидным становится факт, что как сами эти реакции, так и вызванные ими изменения кровотока могут существенно различаться для случаев, когда сосуд изолирован либо находится в своем месте в микроциркуляторной сети (*in situ*). Эти различия обусловлены как гемодинамическими сетевыми эффектами (перераспределение потоков в сегментах и давлений в узлах сети), так и сигнальными механизмами самой сосудистой стенки, которые лежат в основе, например, функциональной гиперемии [4]. Экспериментальное исследование такой сложной, с внутренними взаимосвязями системы предполагает использование адекватных физиологических проб, которые обеспечили бы локальное и предсказуемое по результатам воздействие на выбранный фрагмент кровеносного сосуда. В настоящее время для этой цели применяются как фармакологическое воздействие [160, 161], так и электростимуляция [162, 163]. Для локализации доставленного к сосуду вазоактивного

агента применяются специальные микроконтейнеры [164]. Заметим, что перечисленные технологии либо не обеспечивают высокую степень локализации (вследствие, например, диффузии вазоактивного агента), либо технически сложны и нарушают исходную структуру сосудистой сети.

Все вышеописанное приводит к заключению, что на настоящий момент отсутствует единый и устоявшийся взгляд на взаимосвязь процессов активации и передачи сигнала по эндотелию сосудов, с одной стороны, и результирующими эффектами вазодилатации и (или) вазоконстрикции – с другой, и потому актуальны задачи как получения новых экспериментальных данных, так и моделирования процессов.

Математические модели микроциркуляции

Таким образом, бесспорен факт наличия определенных трудностей в экспериментальном изучении микроциркуляторных сетей (МЦС). Разработка и исследование математических моделей, основанных на экспериментальных данных и дополняющих их, дает недостающую информацию для более полного понимания авторегуляции МЦС. В особенности это касается исследования отношения поток-диаметр на примере сети микроциркуляции, а не на отдельно исследуемом сосуде.

Особую роль в решении данной задачи могут сыграть модели, которые объединяют в себе: (1) исследование потоков, (2) методику (способ) построения реалистичных васкулярных структур, (3) моделирование реакции клеточных механизмов, запускающих вазореактивность. Однако в большинстве работ по моделированию МЦС встречаются узконаправленные работы.

Важным вопросом является адекватный выбор типа математической модели. Кровеносная система, с точки зрения физических процессов в ней, может быть описана различными типами математических моделей, в зависимости от конкретных решаемых задач. Например, на уровне крупных сосудов кровь может рассматриваться как ньютоновская жидкость (чем она, строго говоря, не является), текущая в сосудах с жесткими или эластичными стенками [165–169]. В то время как такой подход дает впечатляющие результаты при моделировании, например, процессов в аорте, его затруднительно распространить на сосудистые сети по причине высокой требовательности к вычислительным ресурсам и серьезных проблем с заданием граничных условий.

По мере перехода к средним и малым сосудам, становится адекватным относительно простое и легко реализуемое вычислительное описание потока на основе закона Пуазейля. Здесь широкое распространение получил класс моделей, называемых "Windkessel" (воздушный ме-

шок), суть которых в замене участка непрерывной среды сочетанием идеализированных элементов (эластичный мешок и жесткая трубка), по отдельности описывающих наиболее важные свойства. Подход был предложен Стивенем Хэйлзом в 1733 г. [170], позднее развит в 1899 г. Отто Франком [171].

Было также подмечено, что Windkessel-модели по форме уравнений совпадают с моделями электрических цепей, если перепаду давлений поставить в соответствие напряжение, растяжимости сосуда – ёмкость конденсатора, а гидродинамическому сопротивлению – электрическое сопротивление. Такая электромеханическая аналогия нашла широкое применение как в виде самостоятельных моделей [172], так и в сочетании с гидродинамической моделью [173, 174].

Метод электромеханических аналогий использован в ряде работ для анализа кровотока в системных артериях [175], для оценки параметров реакции на ортостатическую пробу [176], для многомасштабного моделирования сети сосудов в целом [177].

Следует заметить, что при переходе к малым сосудам, неадекватным становится и предположение о сосудах как о "просто" эластичных трубках, так как на этом пространственном масштабе сосудистой системы проявляют себя механизмы активной регуляции сосудистого тонуса посредством сокращения либо расслабления гладкомышечных клеток сосудов. Классические Windkessel-модели не учитывают эти механизмы, но могут послужить удобной платформой для разработки класса моделей, в равной степени ориентированных и на расчет потока, и на описание процессов авторегуляции сосудистого тонуса. Именно такой подход был использован в данной диссертационной работе.

В области математического моделирования образа микроциркуляторных сетей, исследования в основном нацелены на выработку оптимального представления ветвящейся васкулярной структуры [178], процесса ее роста и динамики формирования свойств сосудов [179, 180]. В частности, отмечено, что способы построения ветвления дерева, например, на основе идеализированных моделей с симметричной итоговой структурой не соответствуют реальному строению сетей [181]. Более реалистично моделирование ассиметричных сетей [182, 183]. Основой для алгоритмов ветвления при этом как правило служит правило (закон), впервые предложенное Мюрреем [184], с дальнейшими доработками и усовершенствованиями [183, 185–187].

При моделировании клеточных реакций вкупе с динамикой МЦС, широко распространено моделирование миогенного ответа (т.е. реакции клеток гладкой мускулатуры на трансмуральное давление). Известен ряд модельных исследований миогенного ответа [26, 188, 189] в

том числе в сосудистых сетях [190]. Однако динамические паттерны таких сетей изучались крайне редко [25].

Имеется ряд работ [191–194], в которых моделируется поток через коронарные артерии разного диаметра и учитывается, как эндотелиальная регуляция, представленная в виде реакции сосудистой стенки на напряжение сдвига, так и гладкомышечная. В относительно недавних работах одного авторского коллектива [195, 196] представлены модели регуляции диаметра афферентных артериол, включающие в себя клеточную и гидродинамическую составляющие. Авторы работы 2018 года [197] представили модель малой сети, показывающей зависимость тонуса и диаметра сосудов от скорости производства NO.

Несмотря на то, что во всех перечисленных моделях во внимание берутся либо отдельные сосуды разного диаметра, либо целые сети микроциркуляции, в данных работах сложно оценить авторегуляцию тонуса сосудов в пределах одной сосудистой ветки, содержащей, по крайней мере, одну Y-бифуркацию сосудов.

Цели и задачи диссертационной работы

Целью данной работы является развитие представлений о вкладе эндотелий-опосредованных механизмов авторегуляции сосудистого тонуса в пространственно-временную динамику кровотока в интактной микроциркуляторной сети.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Выбор биологической модели для исследования, разработка методики эксперимента, включая способы регистрации и обработки данных;
2. Разработка адекватного метода активации сосудодвигательных реакций интактной микроциркуляторной сети;
3. Экспериментальное исследование *in situ* характеристик индуцированных сосудодвигательных реакций кровеносных и лимфатических сосудов;
4. Разработка математической модели функционального сегмента кровеносного сосуда, воспроизводящей динамику кровотока в условиях нелинейной и переменной во времени упругости сосудистой стенки при максимально упрощенном описании действия основных регуляторных механизмов, реализуемых клетками гладкой мускулатуры и эндотелия;

5. Разработка метода вычислительного исследования динамики кровотока и сосудодвигательных реакций в рандомизированных модельных сетях;
6. Вычислительное исследование паттернов перераспределения сетевого кровотока в результате действия эндотелий-опосредованных механизмов регуляции сосудистой стенки.

Научная новизна

Научная новизна результатов диссертационной работы определяется следующим:

1. Впервые предложено использовать сфокусированное лазерное воздействие на сосудистую стенку как неразрушающий бесконтактный способ локализованной активации сосудодвигательных реакций интактной микроциркуляторной сети.
2. Выявлена зависимость характера индуцированного сосудодвигательного ответа от длины волны лазерного излучения.
3. Предложен и реализован способ исследования сетевого кровотока путем имитационного рандомизированного моделирования структуры больших фрагментов васкулярной сети, отличающийся возможностью управлять статистическими характеристиками генерируемых структур посредством задания вероятностей событий при работе алгоритма.
4. Получены новые экспериментальные и теоретические (методом математического моделирования) результаты по вкладу эндотелий-опосредованных механизмов регуляции сосудистого тонуса в сетевые паттерны микроциркуляции *in situ*.

Теоретическая и практическая значимость работы

В целом, в **теоретическом плане** предложенный в диссертационном исследовании подход к вычислительному исследованию реакций микроциркуляторной сети предлагает конкретные рецепты построения больших структур, нацеленных на моделирование динамики авторегуляции кровотока в сосудистых сетях масштаба органа. Важной особенностью подхода является возможность использования экспериментальных данных для задания шаблона структуры, а также возможность управления статистическими характеристиками полученных в итоге структур.

Практическая значимость результатов обусловлена тем, что выполненные методические и программные разработки имеют самостоятельную ценность для экспериментальных и модельных исследований микроциркуляции. В частности: предложена методика экспериментального исследования функций интактной сети сосудов на основе бесконтактного неразрушающего воздействия сфокусированным лазерным пучком; получены экспериментальные данные по согласованному изменению параметров кровотока во фрагменте интактной микроциркуляторной сети в ответ на индуцированную констрикцию одного из участков сосудов; получены экспериментальные данные по стимулирующему действию лазерного излучения на сократительную активность лимфангиона лимфатического сосуда брыжейки крысы; разработан и официально зарегистрирован в качестве результата интеллектуальной деятельности программный продукт, реализующий генерацию больших васкулярных структур с заданной статистикой топологических характеристик, что дает возможность проведения вычислительного исследования приближенных к реальности модельных микроциркуляторных сетей.

Положения, выносимые на защиту

1. Активация сосудодвигательных реакций участка интактной микроциркуляторной сети может быть вызвана локальным воздействием лазерного излучения на один из ее сегментов. При этом направленность локального сосудодвигательного ответа (дилатация либо констрикция) зависит от рабочей длины волны лазера. Индуцированный лазерным излучением локальный сосудодвигательный ответ сопровождается распространяющейся вазоконстрикцией, которая может охватывать более одного сегмента микроциркуляторной сети.
2. Сократительная активность лимфангиона лимфатического сосуда может быть стимулирована посредством локализованного лазерного воздействия. При этом, основные характеристики (амплитуда, скорость сокращения и расслабления) спонтанного и стимулированного лазером событий сокращения не различаются.
3. Действие опосредованного эндотелием механизма расширения сосуда при росте линейной скорости кровотока в нем имеет следствием разбалансировку потоков в точках бифуркации сосудов. Применительно к выборке реализаций модельной микроциркуляторной сети данный эффект приводит к увеличению степени ее гетерогенности.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в следующем:

- Структура и задачи диссертационной работы формулировались автором совместно с научным руководителем.
- Основная часть экспериментальных результатов диссертации получена лично автором. Часть данных по сетевому кровотоку в ХАО куриного эмбриона получены совместно с Курочкиным М.А., данные по действию лазерного излучения на активность лимфососудов получены совместно с Львовым Н.И. (научная группа проф. Брилля Г.Е.).
- Разработка математических моделей и вычислительный эксперимент проводились совместно с научным руководителем.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность изложенных в работе экспериментальных результатов обеспечивается соответствием количественных оценок известным физиологическим данным, а также их воспроизводимостью в эксперименте. Достоверность данных вычислительного эксперимента обеспечивается использованием стандартных численных методов и алгоритмов, а также устойчивостью моделируемых режимов и эффектов по отношению к вариации управляющих параметров локальной модели.

Научные результаты Литвиненко (Стюхиной) Елены Сергеевны опубликованы в ведущих отечественных и зарубежных изданиях, были обсуждены в ходе 14 докладов автора работы на международных и всероссийских конференциях.

1. Е. С. Стюхина, А. Ю. Неганова, Д. Э. Постнов “Исследование механизма регенеративной передачи импульса клетками эндотелия сосудистой стенки”, Ежегодная всероссийская научная школа-семинар “Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2012”, Саратов, 19-21 Сентября, 2012 (устный).
2. E. S. Styukhina, A. Yu. Neganova, D. E. Postnov “Phenomenological mathematical model of regenerative pulse transmission by endothelial cells”, International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics and Biophysics “Saratov Fall Meeting - 2012”, Saratov, September 25-28, 2012 (poster).

3. Е. С. Стюхина, М. А. Курочкин, И. В. Федосов, В. В. Тучин, Д. Э. Постнов “Оценка динамических характеристик капиллярного кровотока методами окклюзионной фотоплетизмографии и капилляроскопии”, VII съезд Российского фотобиологического общества, пос. Шепси, Краснодарский край, 14-19 сентября, 2014 (постер).
4. E. S. Styukhina, M. A. Kurochkin, V. A. Klochkov, I. V. Fedosov, D. E. Postnov “Tissue perfusability assessment from capillary velocimetry data via the multicompartiment Windkessel model”, “Saratov Fall Meeting - 2014”, Saratov, September 23-26, 2014 (poster).
5. Е. С. Стюхина, М. О. Цой, М. А. Курочкин, В. А. Клочков, Д. Э. Постнов “Оценка динамики микроциркуляции при венозной окклюзии верхней конечности”, Ежегодная всероссийская научная школа-семинар “Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2014”, Саратов, 5-7 Ноября, 2014 (устный).
6. Е. С. Стюхина, А. Ю. Неганова, Д. Э. Постнов “Нелинейно-динамические аспекты механизмов распространяющейся вазодилатации”, Биология – наука XXI века: 19-я Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых, Пушино, 20-24 апреля, 2015 (постер).
7. E. S. Stiukhina, M. A. Kurochkin, I. V. Fedosov, D. E. Postnov “Highly localized laser-induced vascular responses”, “Saratov Fall Meeting - 2017”, Saratov, September 26-29, 2017 (poster).
8. E. S. Stiukhina, D. E. Postnov “Modeling study of terminal transients of blood flow”, “Saratov Fall Meeting - 2015”, Saratov, September 22-25, 2015 (poster).
9. Е. С. Стюхина, М. А. Курочкин, И. В. Федосов, Д. Э. Постнов “Лазер-индуцированная вазодилатация как метод тестового воздействия на микроциркуляторную сеть”, Биология – наука XXI века: 21-я Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых, Пушино, 17-21 апреля, 2017 (устный).
10. Е. С. Стюхина, Д. Э. Постнов “Исследование динамики кровотока в постмортальном периоде на ХАО куриного эмбриона”, V Съезд биофизиков России, Ростов-на-Дону, 2015 (стендовый).
11. Е. С. Стюхина, Д. Э. Постнов “Модельная оценка гравитационного вклада в терминальные переходные процессы кровотока”, Ежегодная всероссийская научная школа-семинар “Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2015”, Саратов, 2015 (устный).

12. E. S. Stiukhina, M. A. Kurochkin, I. V. Fedosov, D. E. Postnov “Laser-triggered vasodilation as a new technique for microcirculation studies”, “Saratov Fall Meeting - 2016”, Saratov, September 27-30, 2016 (poster).
13. Е. С. Стюхина, Д. Э. Постнов “Динамические паттерны вазореактивности”, Биология – наука XXI века: 22-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых, Пушкино, 23-27 апреля, 2018 (устный).
14. E. A. Kozlova, N. I. Lvov, E. S. Stiukhina, G. E. Brill, D. E. Postnov “Laser mediated lymphangeon activity in rat mesentery”, “Saratov Fall Meeting - 2018”, Saratov, September 25-28, 2018 (poster).

Публикации. По основным результатам диссертационного исследования опубликовано 2 статьи в российских научных журналах, входящих в список ВАК, а также 5 статей в зарубежных журналах, индексируемых библиографическими базами “Web of Science”, “Scopus”. Создан и прошел государственную регистрацию 1 результат интеллектуальной деятельности (программа для ЭВМ).

Всего по теме диссертации Литвиненко (Стюхиной) Еленой Сергеевной опубликовано 20 работ:

П1. Е. С. Стюхина, М. А. Курочкин, И. В. Федосов, Д. Э. Постнов Лазер-индуцированные сосудодвигательные реакции на хориоаллантаоисной мембране // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 1. С. 71–78.

П2. Е. С. Стюхина, Ю. Н. Автомонов, Д. Э. Постнов Математическая модель авторегуляции сосудистого тонуса // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2018. Т. 18, вып. 3 С. 202–214.

П3. E. V. Postnikov, E. S. Stiukhina, D. E. Postnov A fast memory-saving method for the Morlet wavelet-based transform and its application to in vivo assessment of microcirculation dynamics // Applied Mathematics and Computation, 2017. V 305. P. 251–261.

П4. E. S. Stiukhina, M. A. Kurochkin, I. V. Fedosov, D. E. Postnov Highly localized laser-induced vascular responses // Proc. SPIE 10717, Saratov Fall Meeting 2017: Laser Physics and Photonics XVIII; and Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data IV, 107171Z.

П5. E. S. Stiukhina, M. A. Kurochkin, V. A. Klochkov, I. V. Fedosov, D. E. Postnov Tissue perfusability assessment from capillary velocimetry data via the multicompartiment Windkessel model // proc. SPIE. – 2015. - № 9448. - 94481K.

П6. A. Y. Neganova, E. S. Stiukhina, D. E. Postnov Mathematical model of depolarization mechanism of conducted vasoreactivity // Proc. SPIE. – 2015. - № 9448. - 94481J.

П7. E. S. Stiukhina, D. E. Postnov Modeling study of terminal transients of blood flow // Proc. SPIE 9917, Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS), 99172.

П8. Е. С. Стюхина, М. А. Курочкин, И. В. Федосов, Д. Э. Постнов Лазер-индуцированная вазодилатация как метод тестового воздействия на микроциркуляторную сеть Биология – наука XXI века: 21-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. 17 - 21 апреля 2017 г., Пущино. Сборник тезисов, 2017 С. 77.

П9. Е. С. Стюхина, А. Ю. Неганова, Д. Э. Постнов Исследование механизма регенеративной передачи импульса клетками эндотелия сосудистой стенки, материалы Всероссийской молодежной конференции “Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2012”, Саратов, Издательство Саратовского Университета, 42-44, 2012.

П10. Е. С. Стюхина, М. А. Курочкин, И. В. Федосов, В. В. Тучин, Д. Э. Постнов Оценка динамических характеристик капиллярного кровотока методами окклюзионной фотоплетизмографии и капилляроскопии, материалы VII съезда Российского фотобиологического общества, Пущино, 92, 2014.

П11. Е. С. Стюхина, М. О. Цой, М. А. Курочкин, В. А. Клочков, Д. Э. Постнов Оценка динамики микроциркуляции при венозной окклюзии верхней конечности, материалы Всероссийской молодежной конференции “Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2014”, Саратов, Издательство Саратовского Университета, 252-253, 2014.

П12. Е. С. Стюхина, Д. Э. Постнов Динамические паттерны вазореактивности Биология – наука XXI века: 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых,

Сборник тезисов, Пущино, 2018. С. 436.

П13. Е. С. Стюхина, Неганова А.Ю., Постнов Д.Э. Нелинейно-динамические аспекты механизмов распространяющейся вазодилатации, Биология – наука XXI века: 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 20-24 апреля 2015 г.). Сборник тезисов. Пущино, 114, 2015.

П14. Е. С. Стюхина, Д. Э. Постнов Исследование динамики кровотока в постмортальном периоде на ХАО куриного эмбриона, V Съезд биофизиков России. Материалы докладов : в 2 т. - Ростов-на-Дону : Издательство Южного федерального университета, т. 2, 279, 2015.

П15. Е. С. Стюхина, Д. Э. Постнов Модельная оценка гравитационного вклада в терминальные переходные процессы кровотока, Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине – 2015 : материалы Всерос. молодеж. конф. / под ред. проф. Д.А. Усанова. - Саратов: Изд-во Саратовский источник, 44, 2015.

П16. М. А. Kurochkin, E. S. Stiukhina, I. V. Fedosov, D. E. Postnov, V. V. Tuchin Micro-PIV quantification of capillary blood flow redistribution caused by laser-assisted vascular occlusion // Proc. SPIE 9917, Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS), 99171T. 2016.

П17. М. А. Borozdova, E. S. Stiukhina, A. A. Sdobnov, I. V. Fedosov, D. E. Postnov, V. V. Tuchin Quantitative measurement of blood flow dynamics in chorioallantoic membrane of chicken embryo using laser Doppler anemometry // Proc. SPIE 9917, Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS), 99170W, 2016.

П18. М. А. Kurochkin, E. S. Stiukhina, I. V. Fedosov Adaptive micro-PIV for visualization of capillary network microcirculation using Niblack local binarization // Proc. SPIE 10336, Saratov Fall Meeting 2016: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII, 103360W, 2017.

П19. А. А. Namykin, E. S. Stiukhina, I. V. Fedosov, D. E. Postnov Fluorescent angiography of chicken embryo and photobleaching velocimetry // Proc. SPIE 10336, Saratov Fall Meeting

2016: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII, 103360V, 2017.

П20. М. А. Kurochkin, E. S. Stiukhina, I. V. Fedosov, V. V. Tuchin Blood flow velocity measurements in chicken embryo vascular network via PIV approach // Proc. SPIE 10716, Saratov Fall Meeting 2017: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX, 107160H, 2017.

П21. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ “VascuNet” № 2017661135 от 04.10.2017.

Результаты исследований по теме диссертации использованы в ходе выполнения четырех НИР:

1. Проектная часть госзадания в сфере научной деятельности №3.1340.2014/К при поддержке Минобрнауки РФ “Разработка методов диагностики функционального состояния клеточных структур микроциркуляторного русла по данным оптических методов исследования” (2014-2016)
2. Грант РНФ №16-15-10252 “Разработка технологии мониторинга проницаемости васкулярных барьеров на основе мульти-масштабного анализа переходных процессов по данным оптических методов визуализации” (2016-2018)
3. Проектная часть госзадания в сфере научной деятельности №3.1586.2017/ПЧ при поддержке Минобрнауки РФ “Квантификация физических закономерностей регуляции кровотока в микроциркуляторной сети методами оптического мониторинга и численного моделирования” (2017-2019).
4. Грант РНФ №19-15-00201 “Комплексное исследование механизмов транспорта веществ в паренхиме и жидкостях мозга в динамике цикла «сон-бодрствование» как новое направление в разработке фармакологических воздействий на мозг” (2019-2021).

Глава 1

Методы исследования динамики микроциркуляции

Данная глава содержит описание технических аспектов диссертационного исследования, куда входит как информация о конкретных использованных биомоделях и способах квантификации кровотока, так и описание разработанных в ходе работы методик исследования.

В качестве источников экспериментальных данных в рамках диссертационной работы использовались:

1. Хориоаллантаисная оболочка (ХАО) куриного эмбриона;
2. Микроциркуляторная сеть мезентерия лабораторной крысы;

Далее каждый из этих источников данных охарактеризован более детально.

Результаты данной главы опубликованы в [П1, П3, П8, П10, П11, П14, П16, П17, П18, П19, П21].

1.1 Хориоаллантаисная оболочка куриного эмбриона как оптимальная биомодель. Технология *ex ovo* выращивания

Согласно правовым и этическим нормам, эмбрионы птиц до вылупления не считаются полноценными живыми организмами, и работа с ними не противоречит правилам этики по работе с лабораторными животными и не требует ведения экспериментального протокола [198, 199]. Все эксперименты на куриных эмбрионах, представленные в данной диссертационной работе, были проведены до 13 дня инкубации.

1.1.1 Морфология развития хориоаллантаисной оболочки куриного эмбриона

Эмбриональное развитие куриного эмбриона продолжается 21 день. Куриный эмбрион окружен 4 внезародышевыми оболочками: желточным мешком, амнионом, серозой и аллантаисом. Аллантаис куриного эмбриона появляется примерно на 3.5 день инкубации в виде

выроста из вентральной стенки энтодермальной задней кишки зародыша. В продолжение четвертого дня инкубации аллантоис выступает из тела эмбриона во внезародышевый целом. Аллантоисный пузырь увеличивается достаточно быстро в интервале от 4 до 10 дня инкубации. В это время, мезодермальный слой аллантоиса сливается с соседним мезодермальным слоем хориона, образуя хориоаллантоисную оболочку (ХАО). Двойной слой мезодермы состоит из хорионической компоненты (соматическая мезодерма) и аллантоисной компоненты (висцеральная мезодерма). В этом двойном слое образуется сильно развитая сосудистая сеть, которая соединена с эмбрионом посредством пупочной артерии и вены.

На 4 день инкубации, все сосуды ХАО образуются из единообразных капилляров. Их стенки состоят из одного слоя эндотелиальных клеток, лишенных базального слоя [200]. Неразвитые кровеносные сосуды, лишенные базального слоя и клеток гладкой мускулатуры, распространенные по мезодерме, растут достаточно быстро до 8 дня инкубации и дают рост капиллярным сетям, которые, распространяясь, тесно связываются с вышележащими хориальными эпителиальными клетками и способствуют газообмену с внешней окружающей средой.

На 8 день, на оболочке видны тонкостенные капилляры с диаметром просвета 15 мкм ниже хориального эпителия и другие сосуды диаметром 10-115 мкм в мезодермальном слое, чьи стенки состоят из слоя мезенхимальных клеток, окружающих эндотелий, и полностью обернутые базальной пластинкой совместно с эндотелиальными клетками [200]. Быстрое разрастание капилляров продолжается до 11 дня инкубации; затем, митотический индекс деления клеток эндотелия быстро замедляется. На 11-12 день, капиллярная стенка остается простоустроенной, содержит эндотелиальные клетки и несколько мезенхимальных клеток (предположительно перицитов), которые находятся в сплюсненном состоянии и тесно приложены к эндотелиальным клеткам.

В данный момент мезодермальные сосуды представляют собой четко выраженные артериолы и вены. Кроме эндотелия, стенка артериол (диаметром 10-85 мкм) состоит из одного или двух слоев мезенхимальных клеток и увеличивающегося количества соединительной ткани вокруг них. Вены (диаметром 10-115 мкм) окружены недоразвитыми мезенхимальными клетками и соединительной тканью, которая также накапливается в стенках. Микрофиламенты образуются в мезенхимальных клетках и численно увеличиваются со временем. Предположительно, данные клетки являются развивающимися гладкомышечными клетками, и стенки ХАО артериол также развиваются посредством отдельных адвентициальных оболочек, содержащих фибробластоподобные клетки [200]. На 14 день, капиллярная сеть

распространяется по поверхности эктодермы, расположенной рядом со скорлупной мембраной.

Сосудистая система достигает ее конечного развития на 18 день инкубации, незадолго до вылупления цыпленка [200].

ХАО участвует как в дыхательном обмене кислородом и углекислым газом, так и служит хранилищем для отходов, которые выделяет эмбрион, а также участвует в мобилизации кальция из скорлупы к начальной стадии костной минерализации [201]. Полностью развитая лимфатическая система ХАО имеет функциональные и молекулярные сходства с лимфатической системой млекопитающих [202].

1.1.2 Методы инкубации

Экспериментальные образцы подготавливались двумя способами:

- (1) инкубирование яиц проводилось в чашках Петри *ex ovo*, рисунок 1.1;
- (2) инкубирование яиц проводилось в скорлупе *in ovo*, рисунок 1.2.

Для работы использовались яйца кур породы “Кросс “Супер Ник”. Перед закладкой в бытовой инкубатор “Золушка” яйца промывались холодной проточной водой и обеззараживались спиртом. Температура воздуха в инкубаторе составляла $37.9 \pm 0.5^\circ C$, влажность воздуха 50-55 %. Яйца в инкубаторе переворачивались не менее двух раз в сутки.

Инкубирование яиц в чашках Петри *ex ovo* проводилось по уже зарекомендовавшей себя методике, описанной, например, в [202]. Через 72 часа после закладки яиц в инкубатор, часть образцов перемещали в чистые стеклянные чашки Петри. После этой процедуры эмбрионы, уже в чашках Петри, были возвращены обратно в инкубатор и продолжали развиваться в безскорлупном виде. С образцами, выращенными по данной технологии, значительно удобнее работать, поскольку, как видно из рисунка 1.1, вся интересующая нас кровеносная сеть расположена на поверхности. В качестве недостатка метода можно отметить большой расход эмбрионов вследствие их пониженной выживаемости. В момент выливания содержимого яйца в чашку Петри может случиться разрыв желтка, что сразу же делает образец непригодным для дальнейших исследований. Благополучное перемещение содержимого также не гарантирует успех. За 7-10 дней жизни в стеклянных чашках часть образцов погибает вследствие неизбежного инфицирования. По указанным причинам, выращивание эмбрионов *ex ovo* до 11-12 дней инкубации является сложным и кропотливым процессом, требующим стерильности чашек Петри и инкубатора, а также достаточного опыта и аккуратности экспериментатора.



Рисунок 1.1: *Ex ovo* инкубация куриного эмбриона

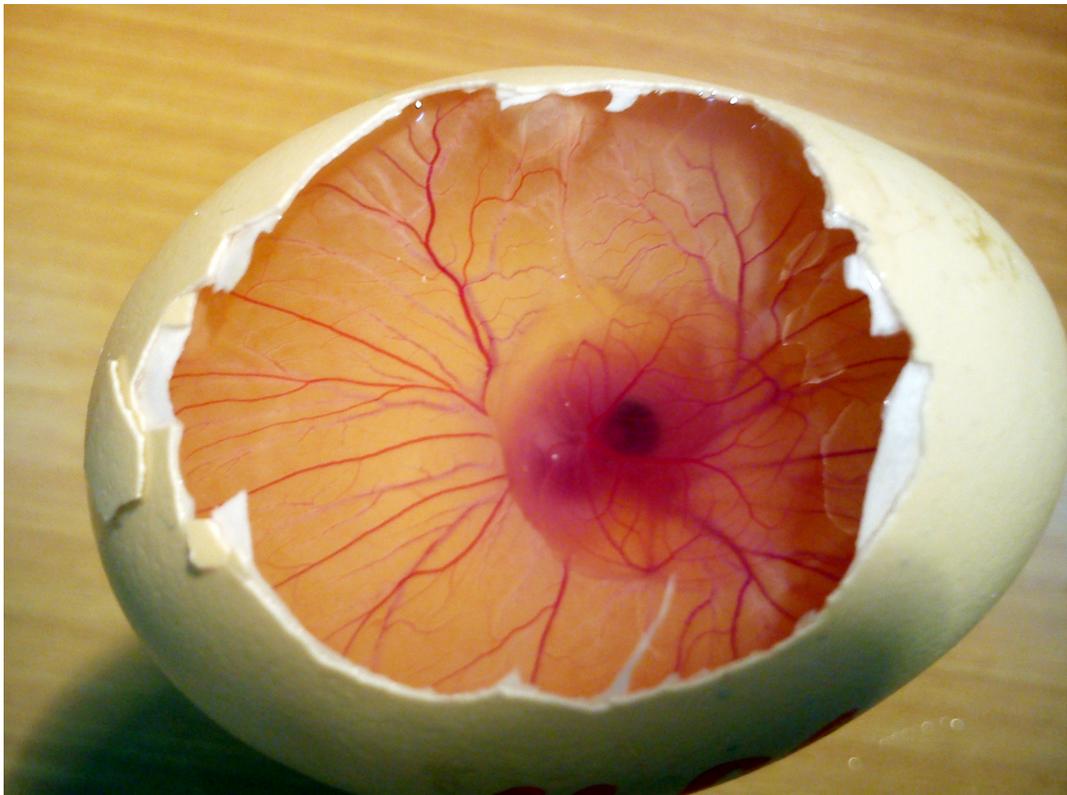


Рисунок 1.2: *In ovo* инкубация куриного эмбриона

В случае *in ovo* инкубации эмбрионы продолжают инкубироваться в скорлупе вплоть до начала экспериментов.

Методика подготовки яиц для исследований

За некоторое время, порядка 10-15 минут до вскрытия, яйца достаются из инкубатора, с целью температурной адаптации, чтобы не возник тепловой шок при переходе из среды с температурой 38°C в среду с температурой около 25°C.

Вскрытие яйца

При проведении экспериментов *in ovo* яйцо вскрывалось с тупого конца в месте, где образуется воздушная камера. Далее снималась скорлупа до границы с подскорлупной оболочкой яйца, после чего подскорлупная оболочка аккуратно удалялась, не повреждая расположенные под ней сосуды ХАО.

1.2 Прижизненная визуализация лимфатических сосудов брыжейки крысы

Эксперименты были проведены на лимфатических сосудах брыжейки белых лабораторных крыс, согласно “Общим принципам экспериментов на животных”, которые соответствуют положениям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Для эксперимента были выбраны самки белых лабораторных крыс, возраст которых составлял 2-4 месяца, вес 200-350 гр. Протокол подготовки крыс к эксперименту включал следующие этапы:

1. Наркотизирование, вследствие укола препаратом “Золетил”. Действие наркоза наблюдалось через 10-15 минут.
2. На втором этапе вспарывали нижнюю область брюха крысы, с последующим извлечением мезентерия. В таком состоянии крысу оставляли на 40 минут, с целью адаптации.
3. На заключительной стадии подготовительного к эксперименту этапа, мезентерий извлекали из крысы и далее поочередно через микроскоп рассматривали петли мезентерия в поисках лимфатических сосудов.

С момента вспарывания и до окончания эксперимента крыса находилась на подогреваемом столике температурой 38°C. Во избежание высыхания материала, сосуды периодически смачивались физиологическим раствором.

1.3 Методика регистрации данных и лазерного воздействия на микроциркуляцию: описание экспериментальной установки

Экспериментальная установка была собрана на основе деталей микроскопов производителя “ЛОМО”, изображение установки представлено на рисунке 1.3. Вместо тубуса и окуляра был разработан “куб-делитель”, обеспечивающий одновременную работу двух необходимых каналов: канала измерения и канала воздействия. “Куб-делитель” представлял собой оригинальную 3D модель куба, распечатанную на 3D принтере. В трех стенках куба были отверстия для каналов. На сплошной стенке крепилась подвижная опора для дихроичного зеркальца таким образом, что при попадании лазерного пучка на зеркальце, часть пучка преломлялась к направлению объектива, часть проходила сквозь зеркальце и “гасилась” зубчатой поверхностью подвижной опоры, а часть пучка отражалась вверх к направлению канала регистрации. Для регистрации использовалась CCD камера (Basler aca 90um). Для защиты матрицы камеры от лазерного излучения на выходе из отверстия куба в сторону камеры помещался светофильтр.

Лазерный пучок попадал на зеркальце через канал воздействия, который включал в себя: лазер, расширитель лазерного пучка и поляризатор. С помощью скрещенных поляризационных фильтров можно было управлять мощностью излучения лазера на выходе из объектива.

В установке использовался объектив Plan Apo с увеличением 10x/0.3 и рабочим расстоянием 30 мм. На объектив крепилось напечатанное на 3D принтере осветительное кольцо со светодиодами, излучающими на длине волны 565 нм.

Собранная таким образом установка позволила сфокусировать лазерный пучок до 10-15 мкм в диаметре, что по размерам соотносится с размерами эритроцитов куриных эмбрионов и с размерами клеток сосудистой стенки.

Для целей эксперимента были использованы диодные лазеры с длиной волны излучения 532 нм и 405 нм, мощность лазерного излучения на выходе оптической системы составляла 7-10 мВт и 12-15 мВт, соответственно. Количественно охарактеризовать действующую на клетки мощность излучения оказалось непросто. Прямой расчет мощностей лазеров на единицу площади пятна диаметром 10 микрон дает довольно большие значения плотности мощности: 4-6 кВт/см² для лазера на длине волны 405 нм и 12-14 кВт/см² для лазера на длине волны 532 нм. Однако, измерения прошедшей доли излучения говорят о том, что во всей толще образца (вместе со стеклом подложки) поглощается менее 10%. Приблизительно оценивая толщину образца в 5 мм, на сосуд диаметром 100 микрон придется по толщине 2%

от этих десяти процентов. Такая мощность представляется недостаточной для того, чтобы вызвать существенный нагрев образца.



Рисунок 1.3: Экспериментальная установка.

1.4 Вычислительные методики и разработанные программы

1.4.1 Программы стабилизации изображений

Как было упомянуто во Введении, для получения более точных значений скорости методом PIV используемые серии изображений требуют эффективной пост-обработки. В нашей работе мы использовали два метода стабилизации изображений.

(1) Стабилизация с использованием “PIVlab”. PIVlab – это бесплатное программное обеспечение, написанное в среде MATLAB. Данная программа позволяла обрабатывать и получать значения скорости как по целому кадру, так и по выбранной области исследования. Примененный метод стабилизации был основан на выборе и обработке “пустой” области интереса и ее полной обработки с целью получить покадровое смещение образца. Полученные значения вектора скорости сдвига-помехи в конце обработки вычитались из вектора смещения каждой точки исследуемой области.

(2) Стабилизация с использованием бесплатной программы “VirtualDub” для монтажа и редактирования видео файлов.

Далее вычисление скоростей потока проводилось методом PIV с использованием программы, написанной на LabView, и подробно описанной в работе П20. Данная программа была специально разработана и адаптирована для получения линейных скоростей капиллярного кровотока ХАО куриного эмбриона и позволяла производить расчет карты скоростей всех сосудов сети, находящихся в поле зрения.

Два указанных метода в общем дают различные результаты, так как основаны на различных алгоритмах. По этой причине, в отдельных случаях оба метода применялись последовательно, сначала (2), а затем – (1).

1.4.2 Метод разделения временных масштабов пульсаций скорости кровотока

Скорость кровотока (а точнее – скорость движения форменных тел крови), которая измеряется методом PIV, является переменной величиной и отражает совокупное действие целого ряда процессов, которые, к тому же, не являются стационарными в течение времени записи данных. По этой причине, важно иметь возможность эффективного спектрально-временного анализа относительно коротких (порядка 1000-4000 точек) серий временных реализаций, которые обычно получаются при записи кровотока биомодели в различных состояниях. За последнее десятилетие, широкое развитие получили методы на основе вейвлет-анализа. В ходе данного диссертационного исследования была выполнена разработка специальной модификации этого метода, которая оптимизирована для указанной длины временных реализаций, путем замены классического представления вейвлет-функции на ее сплайн-аппроксимацию и выполнения своего рода цифровой фильтрации – выделения значимых колебательных мод в сигнале с последующей оценкой их динамики, то есть, изменения амплитуды колебаний в данном диапазоне частот во времени.

Рисунок 1.4 иллюстрирует результаты анализа пульсаций кровотока в сосуде ХАО куриного эмбриона по описанной выше схеме. По результатам упрощенного (и потому – ускоренного) вейвлет-анализа построена диаграмма в центре рисунка, где интенсивность закраски кодирует относительную выраженность ритма с данным периодом T в данный момент времени t . В данном случае выделены два ритма, которые представлены в форме модулированных квазигармонических колебаний, рисунок 1.4, верхняя панель. Заметим, что период модуляции основной гармонической составляющей и период субгармоники приблизительно связаны как $T_m = 2T_1 + T_2$. Таким образом, можно сделать предположение о наличии взаимодействия

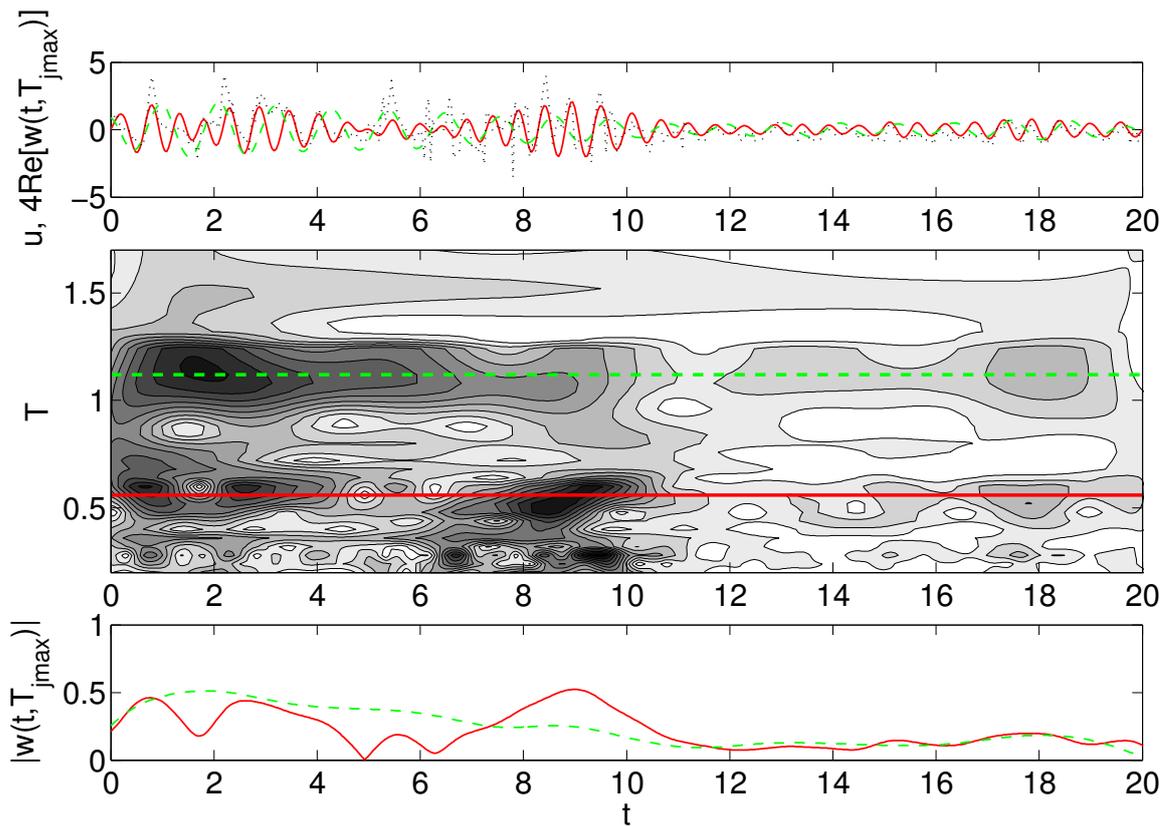


Рисунок 1.4: Применение алгоритма сплайна к сигналу, показанному как пунктирная линия на верхней панели, которая также содержит отдельные режимы вейвлета (сплошные и пунктирные линии), масштабированные для визуализации. Средняя панель показывает модуль CWT (темные области соответствуют более высоким значениям максимумов модуля), где местоположение указанных мод отмечено горизонтальными линиями. Нижняя панель позволяет отслеживать амплитуды обсуждаемых мод. Время и периоды измеряются в секундах.

типа комбинационного резонанса между двумя нелинейными колебательными процессами. Дополнительным аргументом в пользу этой точки зрения является рассмотрение амплитуд обеих вейвлет-компонент на нижней панели рисунка: большие значения обнаруживаются в пределах временных интервалов $t \in [0, 5]$ с и $t \in [7, 11]$ с. С другой стороны, в поддиапазоне малых амплитуд $t \in [11, 16]$ с содержатся оба колебания сравнительно малых сосуществующих устойчивых амплитуд. Их можно интерпретировать как сосуществующие амплитуды, которые удовлетворяют условиям линеаризации, т.е. без каких-либо взаимодействий между ними. Когда амплитуда гармоник с периодом T_1 пересекает некоторую границу амплитудного значения около $t \approx 17$ с, возникает одновременная вспышка субгармоник.

1.5 Построение имитационных моделей больших фрагментов микроциркуляторных сетей

В ходе модельно-теоретического исследования динамики микроциркуляторных сетей, результаты которого описаны в Главе 3, был разработан способ генерации структуры больших (сотни и тысячи сегментов сосудов) модельных сетей микроциркуляции. Подход к этой задаче основывался на том предположении, что сеть представлена в виде совокупности сегментов, каждый из которых имеет два “материнских” сегмента, к которым он подключен со стороны втекающего потока, и два “дочерних” сегмента, куда направлен вытекающий поток. Возможны ситуации, когда направление потока инвертировано, но материнскими сегментами всегда считается та пара, где расположен наиболее крупный сосуд.

Особенностью и преимуществом разработанной программы является то, что она реализует автоматизированное создание такой структуры сосудов, которая бы не обладала свойствами симметрии, которые обычны при использовании детерминированных алгоритмов ветвления (например, бинарное дерево), так как при этом неизбежно возникают особенности динамики, обусловленные именно симметрией, не характерные для живых систем. При этом, нужно было обеспечить правдоподобную геометрическую конфигурацию в трехмерном пространстве, что в перспективе позволит сопоставлять модельные режимы с наблюдаемым в экспериментах пространственным распределением интенсивности кровотока.

Для решения указанных задач использовался стохастический, содержащий элементы случайности, алгоритм, основные шаги которого проиллюстрированы на рисунке 1.5. Как можно видеть, разрастание текущего участка сосуда происходит путем добавления элементарных сегментов, длина каждого из которых принималась равной диаметру сосуда, а направление роста флуктуировало с некоторой (задаваемой) интенсивностью. Событие ветвления сосуда

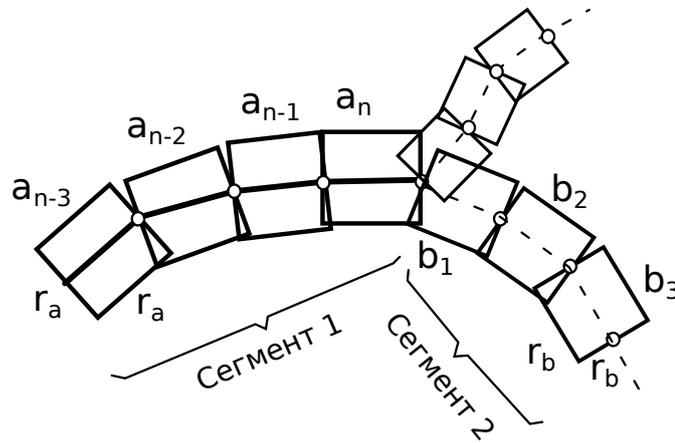


Рисунок 1.5: К алгоритму посегментного построения модельного васкулярного дерева.

определялось по превышению значением случайного сигнала определенного порога, который, в свою очередь, менялся в зависимости от текущей длины сосуда.

При обработке события бифуркации сосуда, параметры двух дочерних сегментов определялись в соответствие с т.н. законом Мюррея [184], (сумма кубов радиусов дочерних сегментов равна кубу диаметра материнского сегмента), но также с элементом случайности, так что указанное соотношение выполнялось приблизительно и каждый раз по-разному.

На рисунке 1.6 приведены примеры сгенерированных васкулярных структур, включающих как артериальную, так и венозную ветви. Данный факт важен, так как иначе задание адекватных начальных условий для нескольких тысяч терминальных сегментов-капилляров окажется нерешаемой задачей.

В первом ряду, а) и б), показаны результаты двух последовательных запусков программы при одних и тех же параметрах: отношение максимальной длины сегмента к его радиусу $L/R_0 = 50$, максимальный угол отклонения от прямой линии на каждом шаге $\Delta\phi = 0.2\pi$. Во втором ряду показаны два варианта структуры, полученные при втрое большем $\Delta\phi$, а в третьем ряду – при том же $\Delta\phi$, но вдвое увеличенном значении L/R_0 . Во всех случаях рост артериальной части структуры был ограничен количеством ветвлений сосудов, равным 10.

На рисунке 1.7, а показаны детали работы алгоритма, а именно, характер замыкания артериальной и венозной части, выполненное посредством аффинной деформации структуры дерева целиком, с сохранением топологии связей и количества сегментов. Такой подход оказался оптимальным, так как допущение идентичности топологии артериального и васкулярного деревьев слабо влияет на распределение давлений и потоков, но при этом не вносит в модельную систему нежелательную симметрию, не имеющую места в природе. На рисунке 1.7, б показан типичный график разброса пар величин радиус-длина для одной из сгенери-

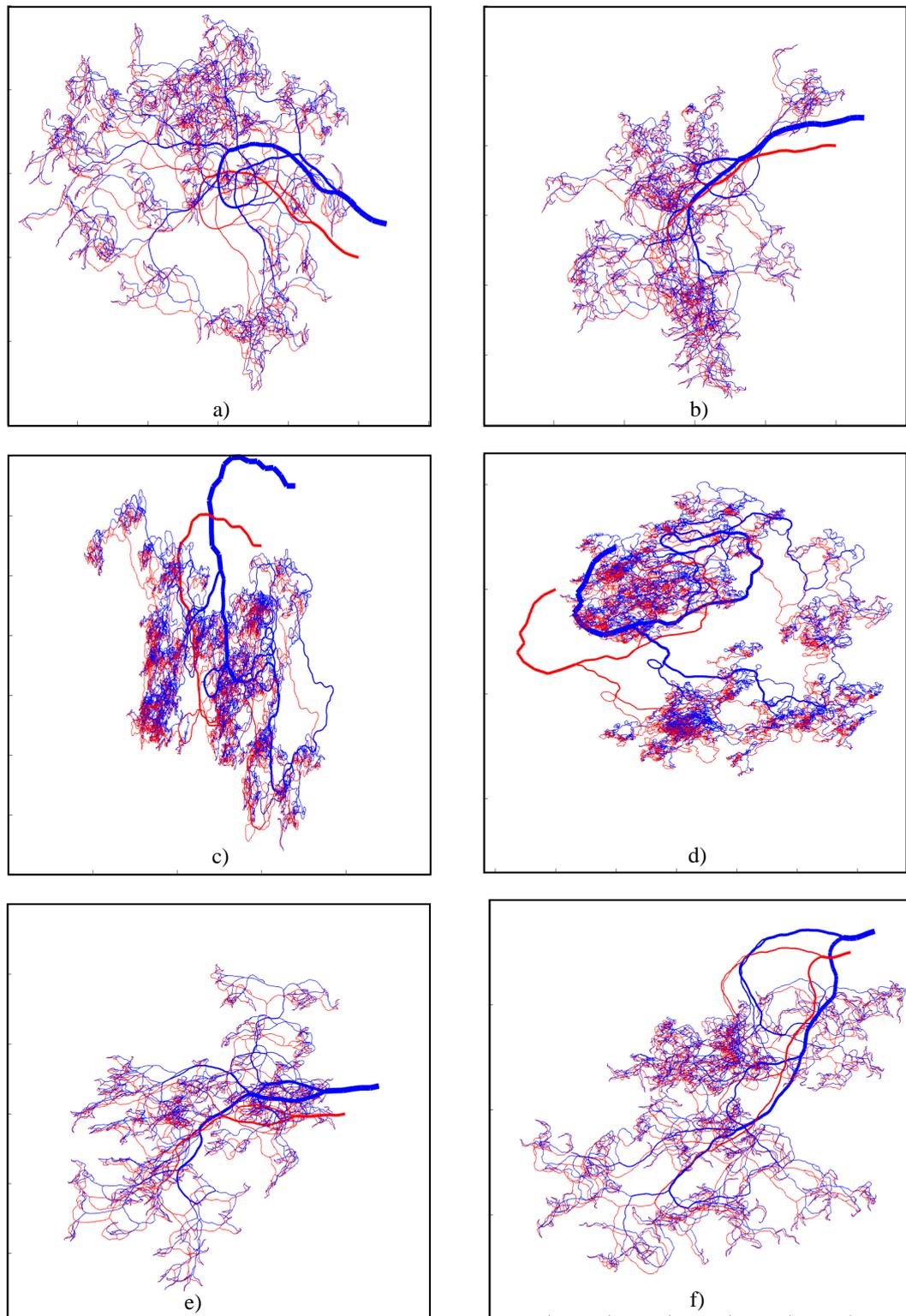


Рисунок 1.6: Пример модельных структур васкулярного дерева, автоматически сгенерированных разработанным программным обеспечением

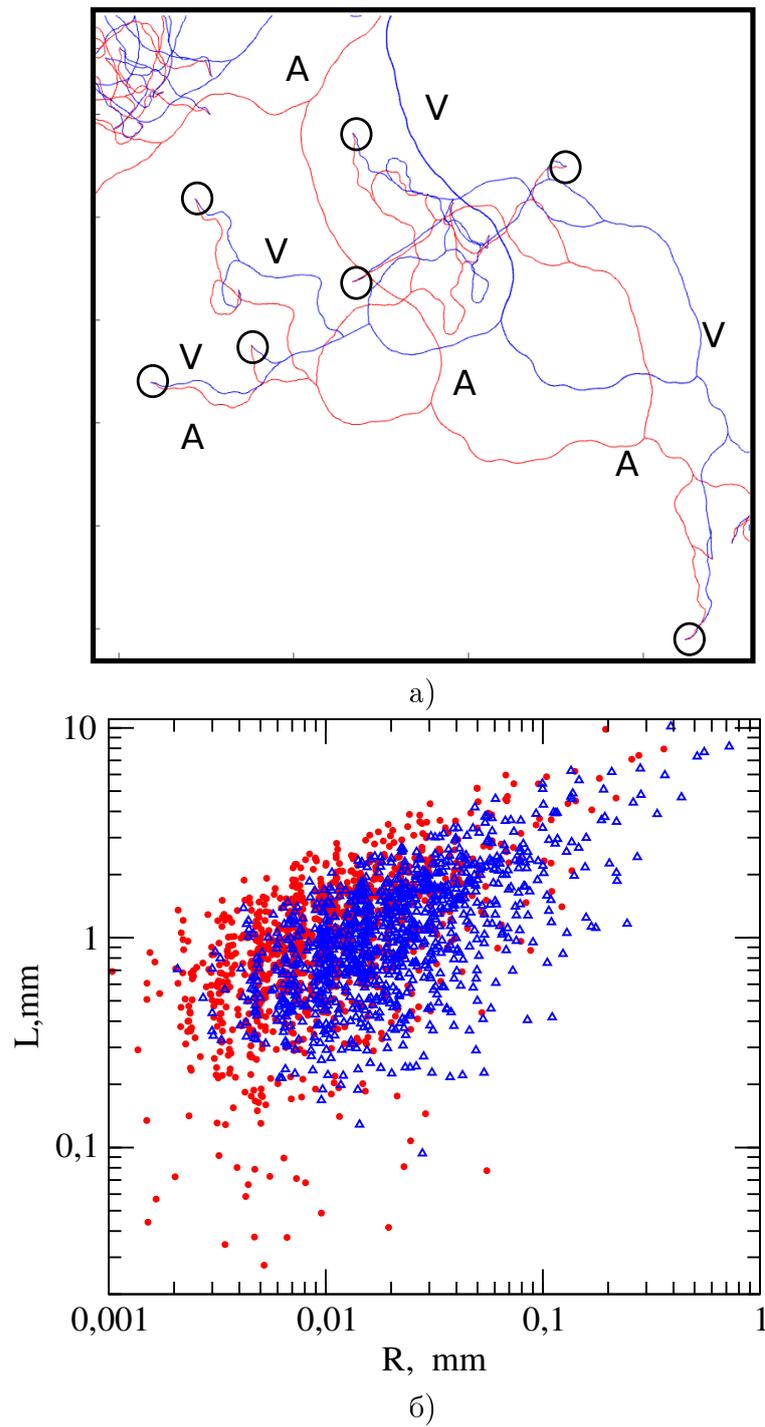


Рисунок 1.7: Детализация структуры а) предыдущего рисунка. а): Увеличенный фрагмент, кружками отмечены точки перехода артериальной части в венозную. б): Распределение радиусов и соответствующих им длин сосудов по всей структуре.

рованных структур, где красным цветом (кружки) показана артериальная часть, а синим (треугольники) – венозная.

В целом, разработанный алгоритм позволяет создавать правдоподобные модели васкулярных структур, включая их конфигурацию в пространстве. На разработанную программу получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ “VascuNet” № 2017661135 от 04.10.2017.

1.6 Выводы по главе

В рамках данной главы детально охарактеризованы использованные в ходе диссертационного исследования биологические модели (как источники данных).

Оригинальными разработками в рамках диссертационного исследования являются:

1. Способ фильтрации артефактов при PIV-анализе посредством вычитания векторного поля сдвига окружающих сосудов тканей;
2. Экспериментальная установка по исследованию высоколокализованного лазерного воздействия на кровотоки и стенки сосудов;
3. Способ вычислительно-эффективного поиска и анализа нестационарных ритмических составляющих графика скорости кровотока;
4. Алгоритм и программа генерации рандомизированной имитационной структуры васкулярного дерева.

Глава 2

Сосудистые реакции интактной микроциркуляторной сети в ответ на локализованную стимуляцию

Значительная часть способов тестового воздействия на микроциркуляцию связана с сильным и в отдельных случаях нефизиологичным изменением состояния сети (отдельных сосудов в составе сети). Данная глава нацелена на регистрацию и квантификацию изменений микроциркуляции (как кровотока, так и состояния сосудов) в ответ на неразрушающее (обратимое) локализованное воздействие.

Для интактной сети изменения в параметрах кровотока определяются как реакцией сосуда, на которое оказывается воздействие, так и другими сосудами. По этой причине не представляется возможным количественно связать изменения кровотока в сосуде с воздействием на него. В связи с этим, мы фокусируемся на изменениях диаметра, который характеризует реакцию на лазерное воздействие.

Для одиночного сосуда исследуется характер вазореактивности на лазерное воздействие. В разделе уточняется особенность используемого нами метода. В частности: (1) обнаружена зависимость характера реакции от длины волны лазерного облучения, (2) показана пространственно неоднородная реакция (более локализованная дилатация и пространственно распространенная констрикция).

Отметим, что для лимфатических сосудов наблюдаемые изменения вызваны воздействием не на лимфоток, а на текущее состояние клеточных структур стенки сосуда.

Результаты данной главы опубликованы в [П1, П4, П8, П12, П16, П18, П20].

2.1 Лазер-индуцированная вазореактивность одиночного сосуда ХАО куриного эмбриона

Раздел посвящен исследованию характерных реакций сосудодвигательного отклика отдельных сосудов хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона на высоколокализованное (размер пятна сопоставим с размером клетки сосудистой стенки) лазерное воздействие такой интенсивности, которое не вызывало бы видимых необратимых нарушений в структуре и функционировании сосуда.

2.1.1 Методика и протокол измерений

На рисунке 2.1 показан участок сосудистой сети ХАО куриного эмбриона (слева) и схема экспериментальной установки (справа), где цифрами отмечены исследуемый объект (1), оптическая система микроскопа с осветителем (2), объединяющая каналы воздействия и регистрации; дихроичное зеркало (3), обеспечивающее необходимое разделение световых потоков; лазер (4) с расширителем пучка; поляризационный фильтр (5) для плавной регулировки суммарной мощности излучения, попадающей на исследуемый сосуд; светофильтр (6), отсекающий длину волны лазера, но пропускающий длину волны осветителя; КМОП-камера (7) для регистрации изображения; компьютер (8). Данная оптическая система позволяла сфокусировать лазерный луч в пятно диаметром 10-13 мкм и, таким образом, воздействовать на 1-2 клетки сосудистой стенки, инициируя их ответ в виде сокращения либо расслабления.

Использовался следующий экспериментальный протокол:

1. До воздействия лазерным излучением, выбирался подходящий сегмент сосудистой сети и выполнялась его видеозапись в контрольном состоянии с частотой не менее 50 кадров в секунду.

2. В течение некоторого времени производилось либо одиночное непрерывное лазерное воздействие, либо серия повторных воздействий, после чего вновь проводилась запись последовательности кадров. Время воздействия и количество повторений выбиралось согласно условиям конкретного эксперимента (см. ниже).

3. После окончания серий воздействия записывались дополнительные серии кадров для оценки степени восстановления исходных характеристик сосуда.

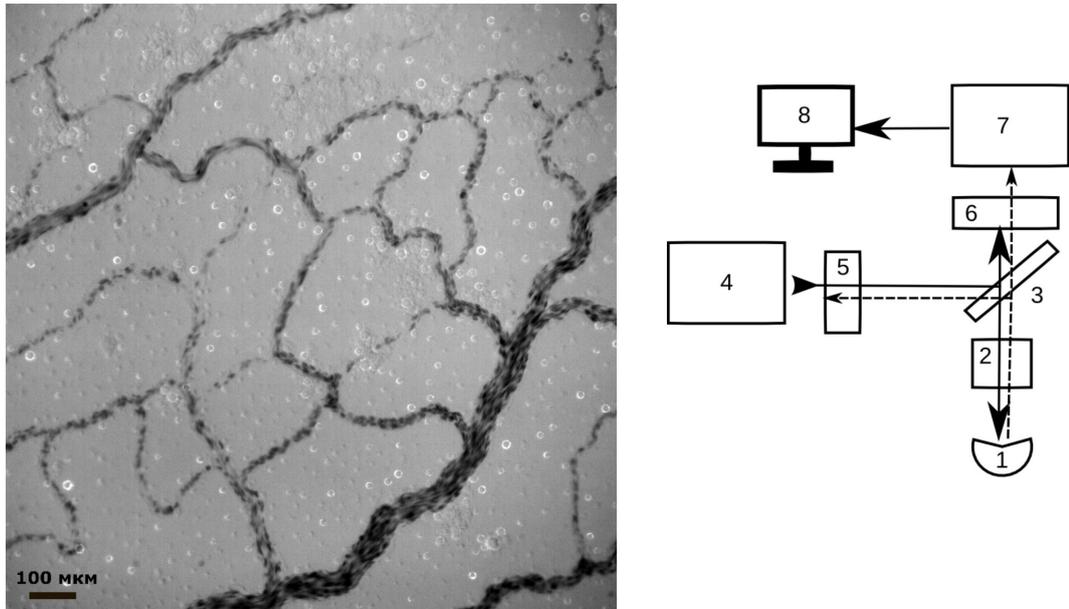


Рисунок 2.1: Участок сосудистой сети ХАО куриного эмбриона (слева) и схема экспериментальной установки (справа). 1 – исследуемый объект; 2 – оптическая система микроскопа; 3 – дихроичное зеркало; 4 – лазер; 5 – поляризационный фильтр; 6 – светофильтр; 7 – система регистрации изображения; 8 – компьютер.

2.1.2 Индуцированные сосудодвигательные ответы в зависимости от длины волны лазера

В ходе двух серий экспериментов лазерное воздействие оказывалось на 38 сосудов ХАО куриных эмбрионов с 7 по 13 дни развития. Из них, сосуды 24 эмбрионов облучались лазером на длине волны 532 нм (1 серия) и 14 эмбрионов – на длине волны 405 нм (2 серия). Лазерное воздействие продолжалось в течение 3 секунд. Воздействия повторялись 3–5 раз с перерывом не более 10 секунд.

Обнаруженные при этом характерные пространственные паттерны реакций сосудов проиллюстрированы на рисунках 2.2 и 2.3.

На рисунке 2.2 можно видеть, как лазерное воздействие на длине волны 532 нм вызывает сложную, пространственно-неоднородную реакцию: в непосредственной близости к точке воздействия сосуд значительно расширен, тогда как выше и ниже по потоку имеет место видимое уменьшение его диаметра (ср. панели I и II рисунка). После прекращения воздействия (панель III) участки констрикции исчезают быстрее, чем дилатационный “пузырек”.

Рисунок 2.3 показывает, как излучение на длине волны 405 нм вызывает выраженную констрикцию сосуда, причем, преимущественно, в более тонком сегменте, расположенном ниже по потоку, за точкой бифуркации. В этом случае снятие воздействия приводит к полному восстановлению исходного состояния сегмента сосудистой сети.

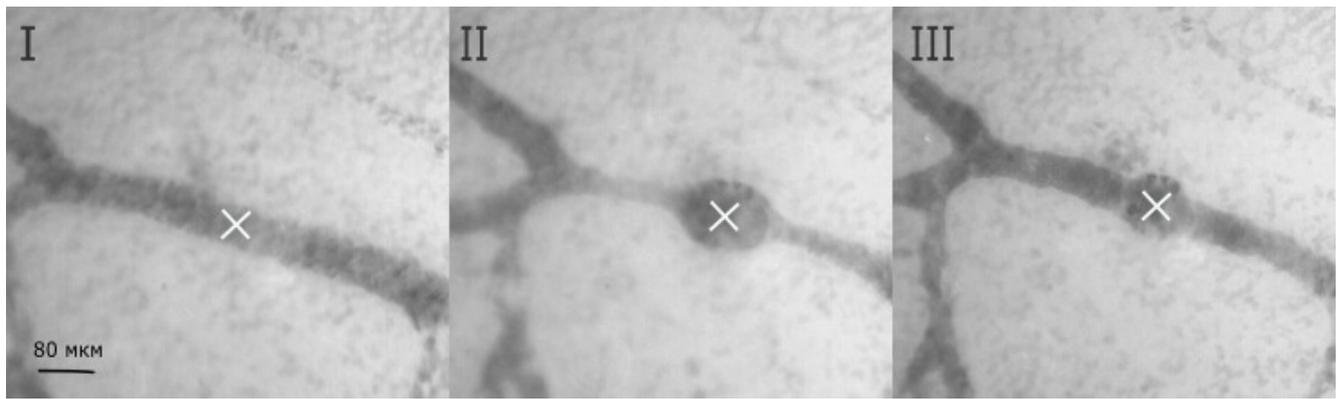


Рисунок 2.2: Изменение артериолы ХАО куриного эмбриона 12-ти дневной инкубации под действием лазера на длине волны 532 нм. I – до воздействия, II – наиболее выраженная фаза реакции на воздействие, III – фаза восстановления.

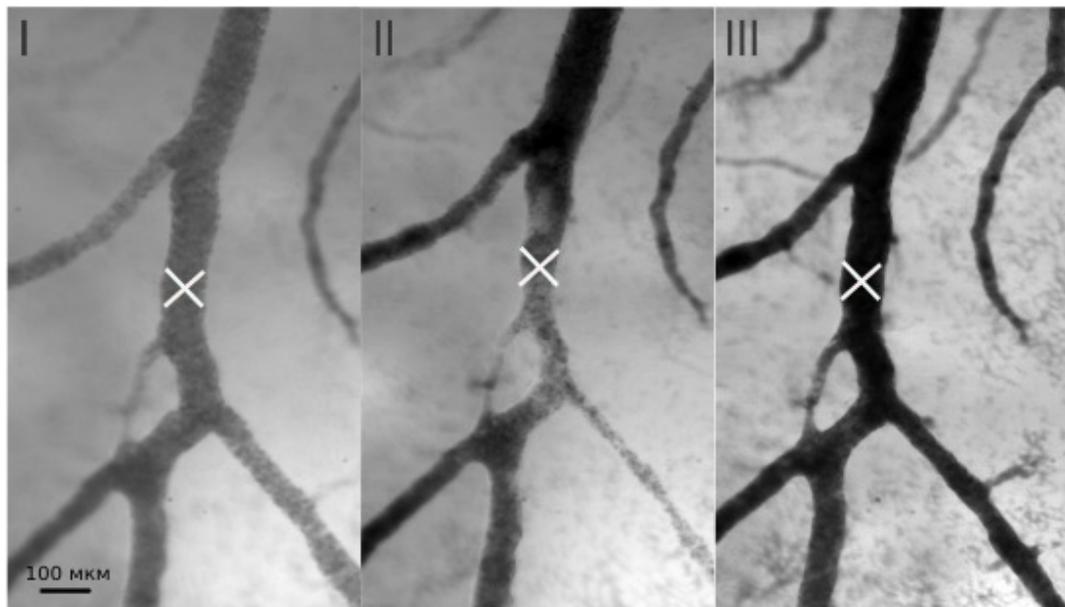


Рисунок 2.3: Изменение артериолы ХАО куриного эмбриона 9-ти дневной инкубации под действием лазера на длине волны 405 нм. I – до воздействия, II – выраженная фаза реакции на воздействия, III – фаза полного восстановления после воздействия.

Гистограмма на рисунке 2.4 позволяет сопоставить результаты обеих серий экспериментов. Изменение диаметра сосуда оценивалось после первого 3-секундного лазерного воздействия. Как можно видеть, воздействие лазером (532 нм), как правило, приводило к локальному расширению сосудов. При этом, у наибольшего количества сосудов (14) диаметр вырос в пределах 20% от исходного значения. Еще у 7 сосудов увеличение диаметра составило от 20% до 60%. Наконец, наблюдался один случай аномально сильного расширения (80–100%) и два случая реакции противоположной направленности – уменьшения диаметра. Воздействие лазером (405 нм) выявило практически обратную картину. А именно, 11 сосудов отреагировали сужением в пределах 20% от начального диаметра, в 2 случаях констрикция была выражена сильнее и в одном случае наблюдалась вазодилатация до 20%.

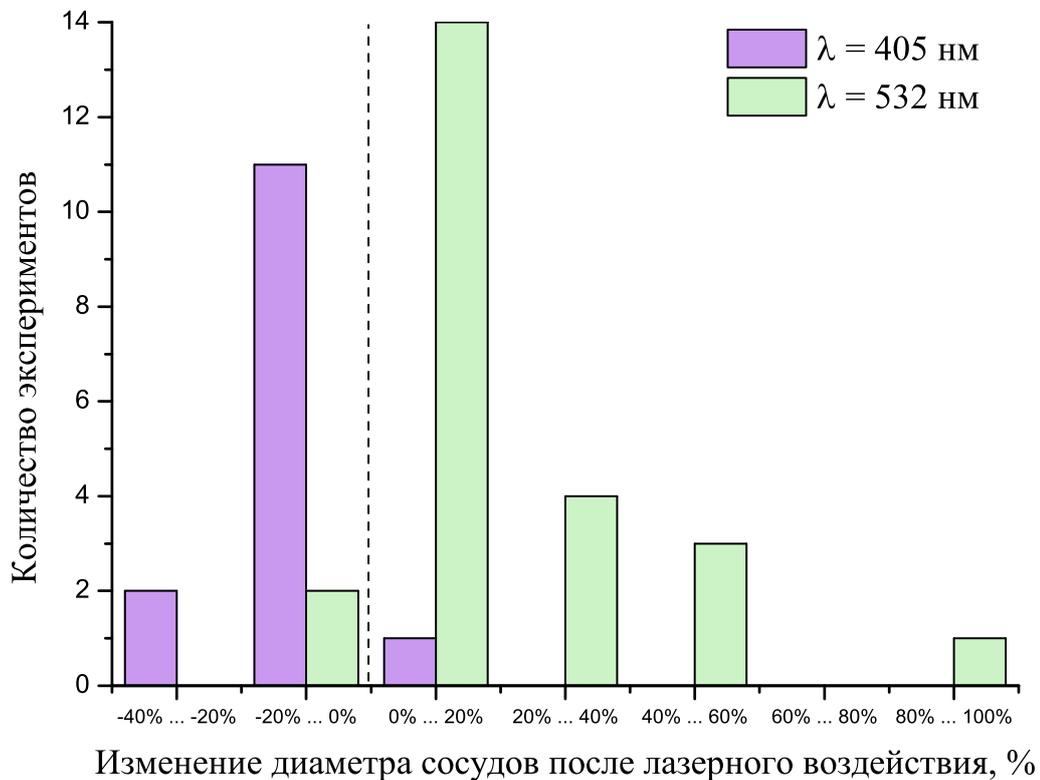


Рисунок 2.4: Изменение размеров сосудов после воздействия лазерами на длинах волн 405 и 532 нм. Пунктирная линия соответствует отсутствию реакции.

2.1.3 Динамика индуцированного лазером сосудодвигательного ответа

Как уже отмечалось выше, после первого воздействия лазером (532 нм) 22 из 24 исследованных артериол локально расширились. Однако дальнейшая реакция на серию воздействий в этой группе была различна.

На рисунке 2.5 приведены графики, характеризующие динамику изменения диаметра трех артериол сопоставимого диаметра (55, 74 и 81 мкм – кривые I, II и III, соответственно). Воздействие оказывалось 5 раз с 10 по 50 секунду. Дальнейшие точки соответствуют сериям в период восстановления. Как можно видеть, после первого воздействия диаметры увеличились на 50, 22 и 18 %, однако дальнейшее поведение кривых различно.

Для кривой I наблюдался выраженный кумулятивный эффект (происходило накопление лазерного воздействия), и сосуд достиг максимальной дилатации на уровне диаметра почти вдвое (180%) больше начального.

Кривые II и III показывают немонотонный характер реакции сосуда на серию облучений. А именно, примерно через 30 секунд после начала эксперимента диаметр сосуда III стал уменьшаться и в итоге опустился ниже начального значения – дилатация сменилась констрикцией. Кривая II показывает аналогичную, но менее выраженную реакцию – максимум дилатации достигается позднее, примерно через 1 минуту после начала эксперимента, и уменьшение диаметра менее резкое.

В итоге, максимальное изменение диаметра в случаях I, II и III составило 80, 45 и 54 % и наблюдалось в различные моменты времени. Финальные же изменения диаметра через 30 секунд после прекращения серии воздействий составляли 80, 16 и минус 8 %, соответственно. Таким образом, согласно нашим наблюдениям, более мелкие сосуды при облучении лазером (532 нм) устойчиво расширяются, а по мере увеличения их диаметра возникает тенденция к констрикции сосудов после облучения.

2.1.4 Измерение скорости в условиях сильной пульсации кровотока

Для хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона характерна пульсирующая природа кровотока. Целью специального эксперимента было оценить, как характер пульсаций может влиять на измерение скорости потока крови.

Для эксперимента использовались сосуды ХАО 10 дня инкубации. Было выбрано два вида сосудов, отличающихся характером пульсаций, а затем были записаны две последовательности серий изображений в контрольном состоянии. Скорость в каждом из сосудов определяли PIV методом. На рисунке 2.6 проиллюстрировано измерение скорости кровотока

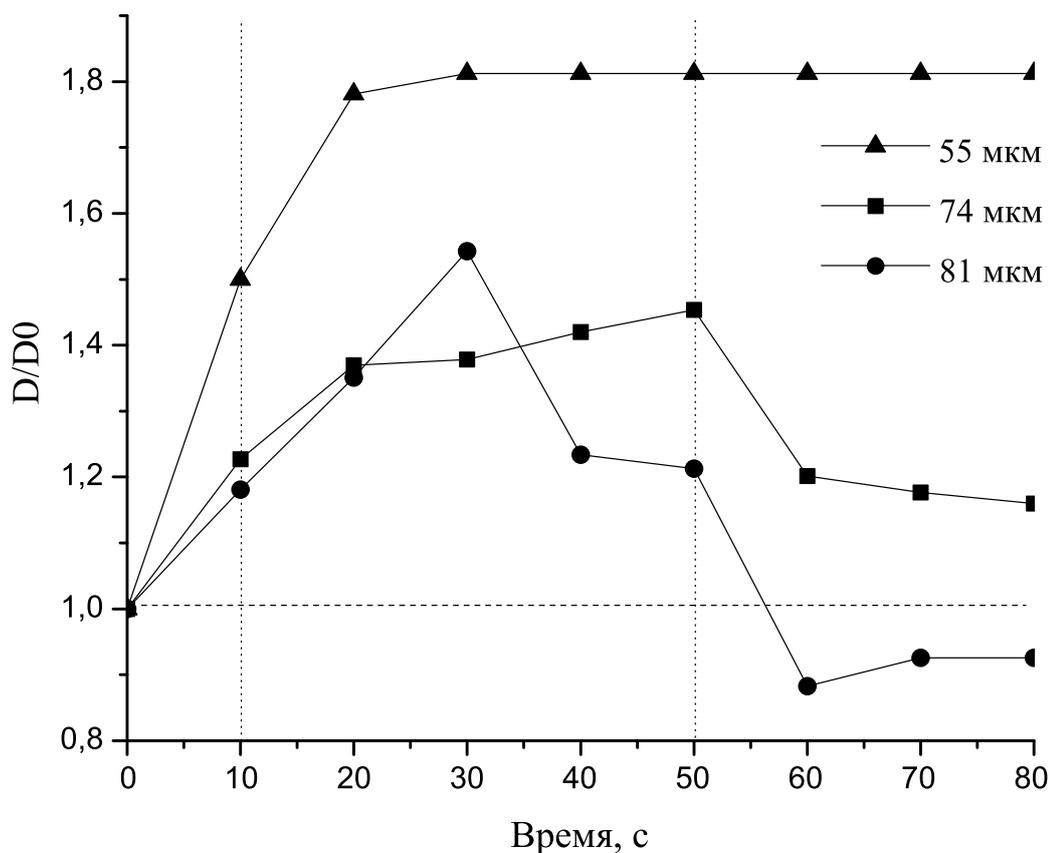
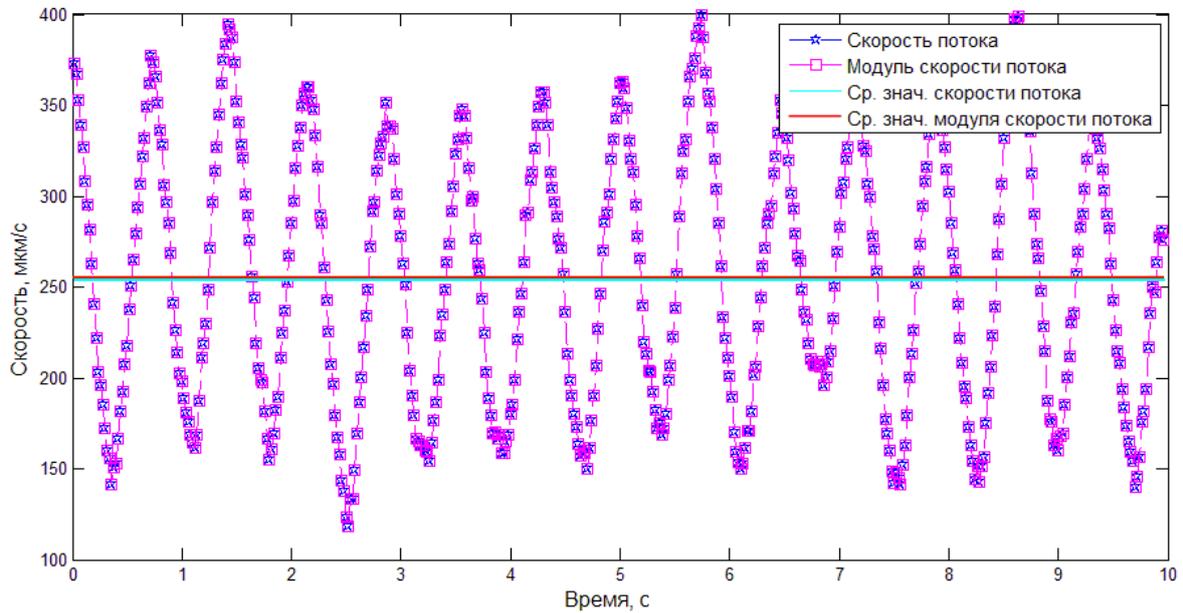


Рисунок 2.5: Динамика изменения диаметра сосуда в ходе эксперимента для трех образцов. Интервал времени между записями – 10 секунд.

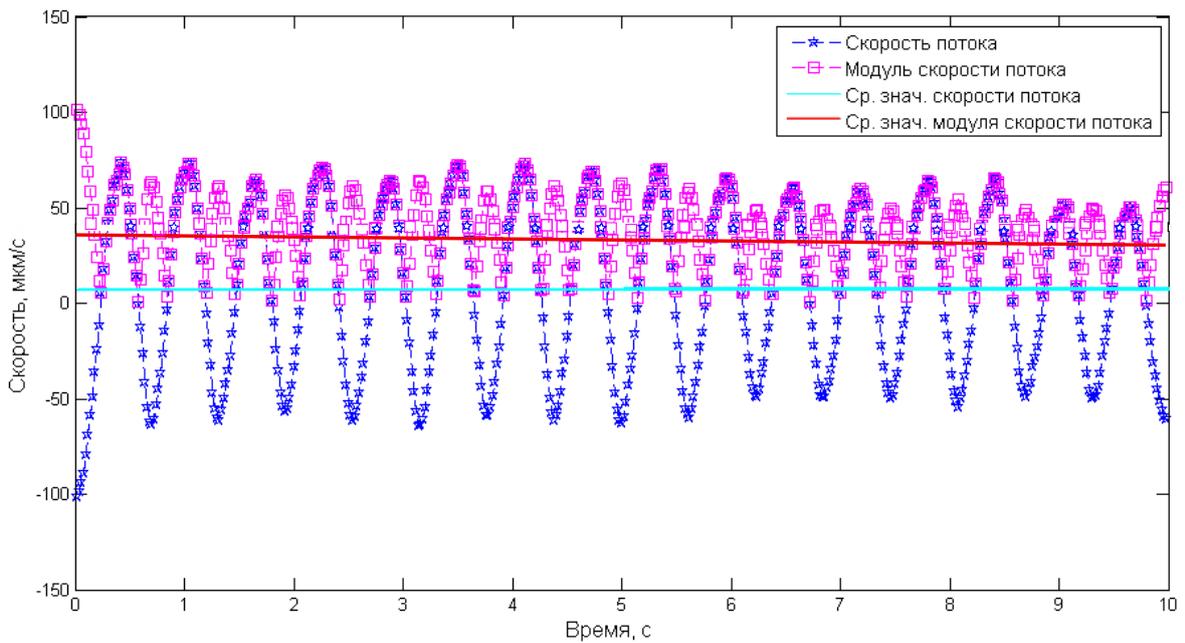
для двух типичных случаев. Панель (а) соответствует случаю, когда поток пульсирует, но всегда течет в одном направлении. Как видно, усредненные значения скорости и ее модуля совпадают. Панель (б) показывает другой случай, когда наличие импульсов потока в обратном направлении приводит к существенной разнице в средней скорости и средней по модулю скорости. Эту вполне очевидную, с математической точки зрения, разницу важно учитывать на практике, поскольку применение метода PIV неизбежно включает стадию усреднения, и если не делать предварительные оценки характера потока – могут быть сделаны ложные выводы.

С точки зрения физиологии от характера пульсаций зависит такая величина как напряжение сдвига (shear stress). Напряжение сдвига определяется не дрейфом частиц, а (вероятно, средним) модулем скорости, и в зависимости от разного характера потока может быть разным соотношение в напряжении сдвига и реальной скорости продвижения эритроцитов. К

примеру, в случае наличия сильных пульсаций и отсутствия продвижения кровотока может развиваться гипоксия (так как свежие эритроциты не приходят) на фоне большого значения величины напряжения сдвига.



а)



б)

Рисунок 2.6: Пульсирующий кровоток. (а) Пульсации, распространяющиеся по течению кровотока (б) Пульсации, распространяющиеся как по, так и против течения кровотока.

2.1.5 Влияние мощности облучения в зависимости от возраста куриных эмбрионов

В данной экспериментальной серии исследовалось, каков будет характер ответной реакции сосудов на различное по мощности воздействие лазером (405 нм) в зависимости от степени сформированности сосудистой системы.

В ходе эксперимента были исследованы 13 образцов сосудов ХАО 9-ти дневных эмбрионов и 19 образцов сосудов ХАО 11-ти дневных эмбрионов. Размер сосудов варьировался от 50 до 200 мкм. На выбранный участок сосуда однократно подавалось лазерное воздействие следующих мощностей: 8, 11, 14 или 16 мВт. Время воздействия было продолжительностью от 5-10 секунд и до начала реакции в отдельных случаях.

Как показывают результаты, у 9-ти дневных эмбрионов разнокалиберные сосуды практически с одинаковой степенью вероятности реагируют на лазерное излучение. У 46% сосудов произошла вазодилатация, у 54% – вазоконстрикция, рисунок 2.7,а. Однако дилатация произошла лишь у одного сосуда размером меньше 100 мкм, рисунок 2.8. Сужением как крупные, так и мелкие сосуды реагировали практически одинаково. На рисунке 2.8 буквами “к” и “д” обозначено количество случаев констрикции и дилатации, соответственно.

У 11-ти дневных эмбрионов отношение дилатации к констрикции составило примерно 1:2, соответственно, рисунок 2.7,б. Причем, как и в предыдущем случае, расширился лишь один мелкий сосуд, и сократились сосуды разных размеров в равных долях, рисунок 2.8.

Особый интерес вызывает реакция сосудов 11-ти дневного эмбриона на воздействие в 16 мВт. В первых сериях эксперимента на непродолжительное воздействие (до 10 секунд), сосуды отреагировали сокращением. Однако более продолжительное воздействие привело к вазодилатации.

Таким образом, согласно рисунку 2.8, сосуды в большинстве случаев отвечают сокращением на излучение малой мощности (8-14 мВт). Реакция крупных сосудов на более мощное излучение (16 мВт) у 9-ти и 11-ти дневных эмбрионов была разнонаправленной. Возможная причина в том, что у 11-ти дневного эмбриона со временем утолщилась пленка над сосудом (или уплотнились стенки) и для расширения требуется более продолжительное воздействие, чем для расширения крупного 9 дневного сосуда, у которого еще не такая плотная оболочка.

Следует отметить, что сосуды выше и ниже по потоку сокращались вне зависимости от реакции в месте воздействия.

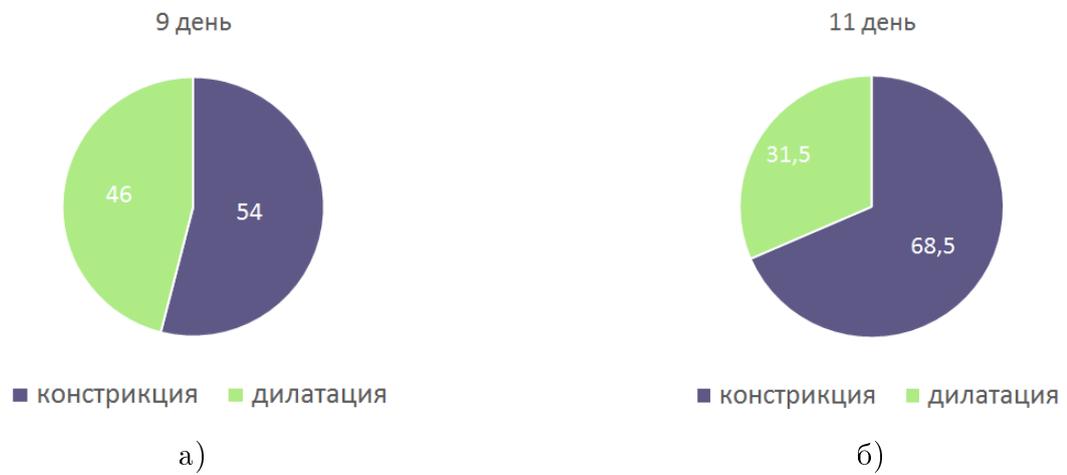


Рисунок 2.7: Статистические данные эксперимента в %, а) для сосудов ХАО 9-ти дневных эмбрионов. б) для сосудов ХАО 11-ти дневных эмбрионов.

Возраст эмбриона, день / количество образцов сосудов, шт	Диаметр, мкм							
	0 – 100				100 – 200			
	Мощность излучения лазера, мВт							
	8	11	14	16	8	11	14	16
9 / 13	2 к	1 к	1 к	1 д	1 д 1 к	1 д 1 к	1 к	3 д
11 / 19	2 к	1 к	1 д 1 к	2 к	-	2 к	1 д 1 к	4 д 4 к

Рисунок 2.8: Сводные данные по эксперименту с 9-ти и 11-ти дневными эмбрионами.

2.1.6 Исключение гипотезы деформации тканей при разогреве

При анализе описанных выше результатов неизбежно возникает вопрос о механизме, посредством которого лазерное излучение запускает сосудодвигательный ответ. В том числе, не являются ли наблюдаемые эффекты следствием простого нагревания прилежащих тканей, которое вызывает их общее разбухание либо сжатие, и заодно – деформирует сосуд. С целью исключения такой возможности было исследовано, будет ли облучение близлежащих тканей вызывать реакцию сосудов.

Для исследования использовалась ХАО 11-ти дневного куриного эмбриона. Воздействие оказывалось лазером на длине волны 405 нм с выходной мощностью 16 мВт. Результат эксперимента приведен на рисунке 2.9. На ткань, находящуюся на расстоянии 200 мкм от исследуемого сосуда, было оказано лазерное воздействие продолжительностью 20 секунд, от воздействия на ткани осталось черное пятно, однако изменений в размере диаметра близлежащего сосуда не произошло. Далее по направлению к сосуду было оказано еще 2 воздействия, которые также не отразились на характеристике сосуда. И лишь после непосредственного воздействия на стенку кровеносного сосуда, было зафиксировано изменение его диаметра.

Таким образом, получено экспериментальное подтверждение того, что тепловой эффект при лазерном воздействии на близлежащие ткани не вызывает различимую реакцию находящегося рядом кровеносного сосуда и, следовательно, не играет определяющую роль в описанных выше эффектах.

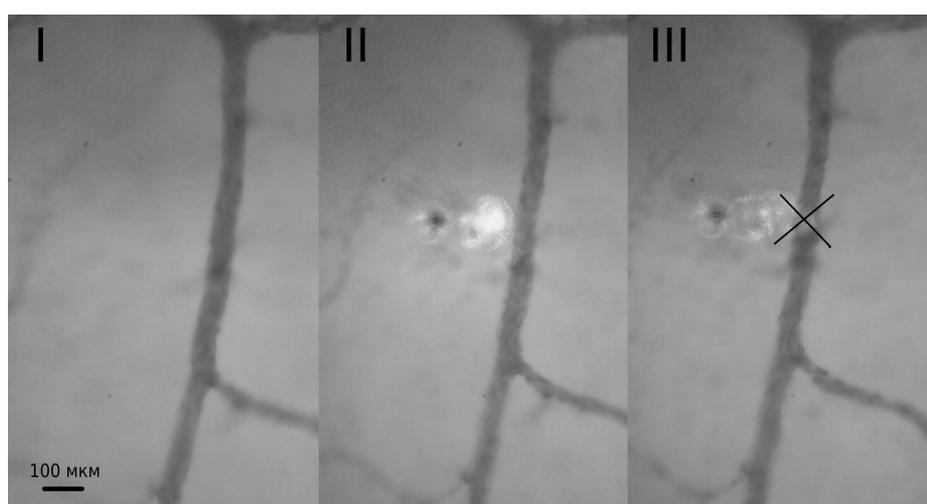


Рисунок 2.9: Последовательное лазерное воздействие на ткань и кровеносный сосуд ХАО. I - без воздействия, II - последовательное воздействие на ткань, III - воздействие на кровеносный сосуд.

2.2 Паттерны перераспределения кровотока в микроциркуляторной сети ХАО куриного эмбриона

Поскольку любой исследуемый кровеносный сосуд ХАО куриного эмбриона не работает обособленно, а входит в состав кровеносной сети, в ходе работы была проведена серия экспериментов, показывающая, что ответная реакция одного сосуда может и даже должна влиять на состояние соседних сосудов. Исследование перераспределения кровотока в малых сетях были начаты с простейшей ситуации: разветвления сосудов или Y-бифуркации.

2.2.1 Перераспределение потоков на Y-бифуркации сосудов

Для экспериментов были выбраны развилки артериальных сосудов, состоящие из “материнской” и двух “дочерних ветвей”.

В первом эксперименте изменение динамики кровотока имело форму полного прекращения потока крови через одну из дочерних ветвей, что достигалось продолжительным лазерным воздействием на выбранный участок кровеносного сосуда, до образования тромба в месте воздействия.

Воздействие продолжалось в течение 10 секунд лазером на длине волны 532 нм. Лазер имел мощность 65 мВт. В точке воздействия размер лазерного пучка составлял 10 мкм с выходной мощностью 10 мВт.

Результат эксперимента представлен на рисунке 2.10.

На панелях а), в) представлены характеристики кровотока до и на панелях б), г) - после воздействия. Как можно видеть, окклюзия дочернего сосуда оказала влияние на диаметр, скорость кровотока и объемный поток кровотока как материнского, так и другого дочернего сосудов. Объемный поток кровотока, проходящий через наблюдаемые сосуды уменьшился пропорционально потоку в заблокированном сосуде. Скорость кровотока через материнский сегмент снизилась более чем в два раза, с 430 мкм/с до 200 мкм/с.

Исследуемая микроциркуляторная сеть второго эксперимента представлена на рисунке 2.11,а. В ходе эксперимента на сосуд 1 оказывалось два воздействия лазером на длине волны 532 нм продолжительностью 3 с с разницей в 60 с. Запись серии изображений проводили в контрольном режиме, после каждого воздействия, а также спустя 5 мин. после последнего воздействия.

В результате диаметр сосуда 1 в месте воздействий расширился, что наглядно можно видеть в сравнении с вставленным изображением контрольного состояния. Однако скорость потока была рассчитана у соседнего сосуда 2, находящегося выше по потоку. Из графика на

рисунке 2.11,б, на котором представлены нормированные на начальные значения изменения диаметра сосуда 1 и скорости потока сосуда 2, видно, что изменение динамических характеристик одного из сосудов сети влияет на динамические характеристики соседнего сосуда. Из чего следует наличие как взаимосвязи между соседними сосудами МЦС, так и автоподстройки МЦС, сохраняющей ее баланс, поскольку можно предположить, что с увеличением диаметра сосуда 1 через него пойдет больший поток, а автоподстройка МЦС, сохраняя баланс, тем самым уменьшает скорость потока через сосуд 2.

2.2.2 Перераспределение потоков в малом фрагменте интактной микроциркуляторной сети

На следующем этапе исследовался отклик всех сосудов выбранного фрагмента микроциркуляторной сети, попадающих в поле зрения камеры.

Опыт 1

В первом случае была выбрана достаточно малая сеть 9-ти дневного эмбриона, состоящая из четырех сосудов. Однократное воздействие лазером (405 нм, мощность составляла 16 мВт, время воздействия – 5 с) оказывали на сосуд под номером 1 на рисунке 2.12.

Регистрацию серий изображений проводили в контрольном состоянии, после воздействия и спустя 1 минуту, чему на рисунке 2.13 соответствует линия на уровне 1.0, левая колонка и правая колонка, соответственно.

Из диаграмм, показывающих изменение потока и диаметра сосудов сети в ответ на воздействие, видно, что сильнее остальных отреагировал сосуд, на который непосредственно светили лазером. Остальные отреагировали либо менее интенсивно, либо совсем не отреагировали, как например, крупный сосуд под номером 2. Данное явление можно объяснить тем, что стенки сосудов обладают саморегуляцией на внешние раздражители.

Опыт 2

Второй фрагмент сети, который мы исследовали, состоял из 7 сосудов, рисунок 2.14,а. В результате воздействия на сегмент 2 была выявлена сложная и разнонаправленная реакция остальных сегментов сети, которая охарактеризована на рисунке 2.14,б-е.

Так, сам сегмент 2 после воздействия в целом показывает увеличение потока, что особенно заметно на рисунке 2.14,г.

Расположенные ниже по потоку сегменты 3 и 7 демонстрируют сначала уменьшение потока, а затем увеличение. Наиболее заметное увеличение потока через сосуд 7 наблюдается в ответ на увеличение потока через сосуды 1 и 2, рисунок 2.14,г.

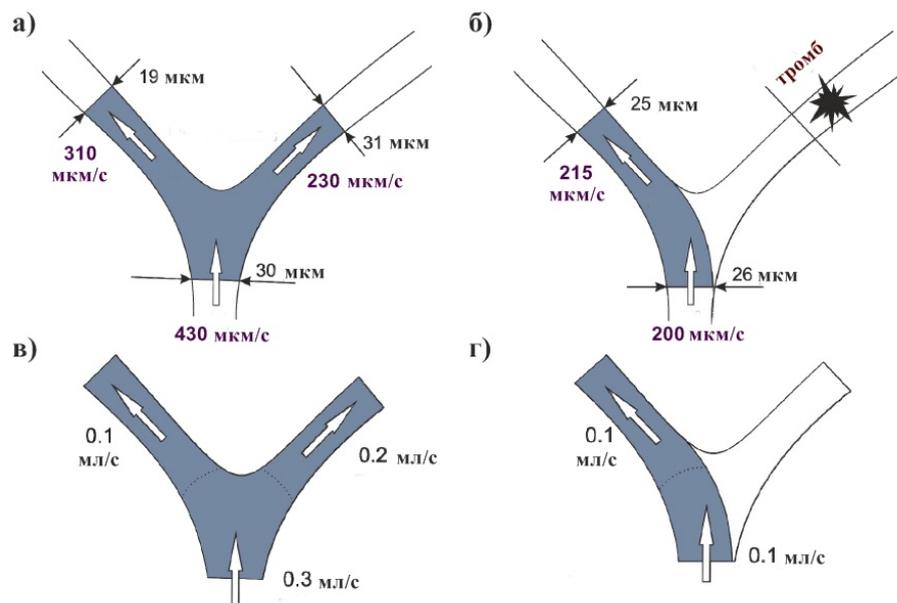


Рисунок 2.10: Схематичное изображение артериальной ветви и лазер-индуцированной окклюзии на Y-бифуркации. На панелях а) и в) показана Y-бифуркация до воздействия и приведены значения диаметра, скорости кровотока и скорости объемного потока; на панелях б) и г) показана Y-бифуркация после воздействия и приведены значения диаметра, скорости кровотока и скорости объемного потока в исследуемых сосудах.

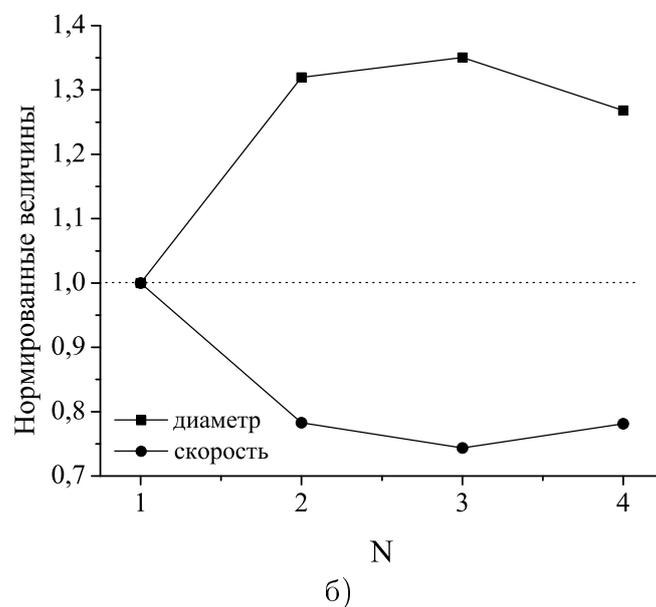
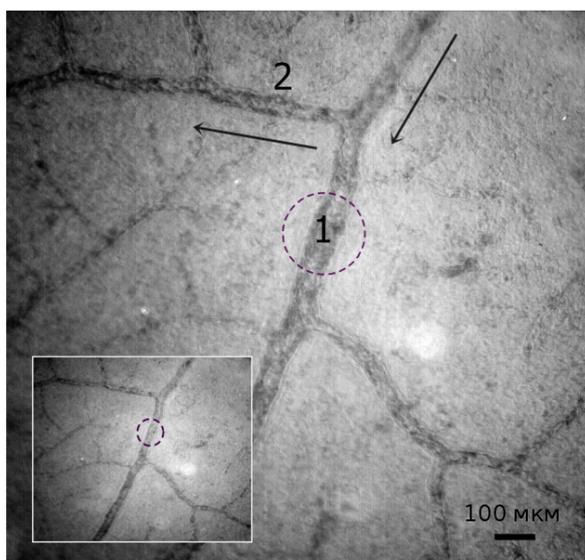


Рисунок 2.11: Взаимосвязанный отклик сосудов кровеносной сети. а) Исследуемая МЦС. Лазерное воздействие оказывалось на сосуд 1. Вставка показывает контрольное состояние сети. Стрелками обозначено направление потока. б) График изменения диаметра и скорости кровотока, измеренные по сосудам 1 и 2, соответственно. N=1 данные при контрольном состоянии, N=2,3 – после двух последовательных воздействий, N=4 – спустя 5 мин после последнего воздействия.

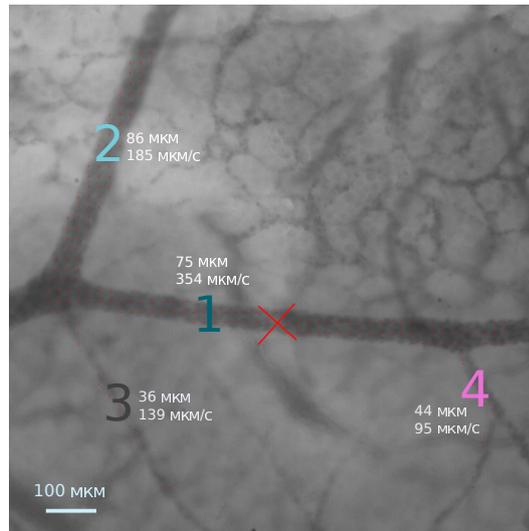
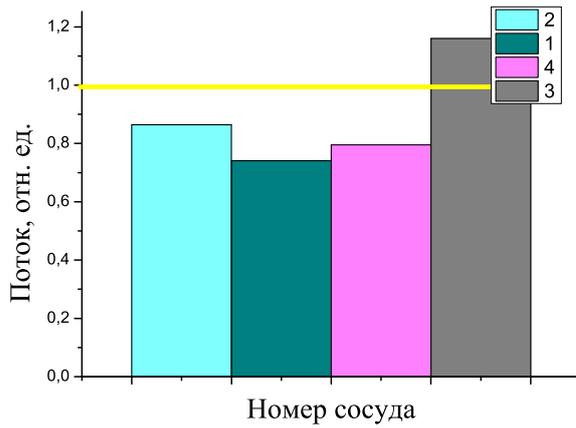


Рисунок 2.12: Исследуемый фрагмент микроциркуляторной сети ХАО. Крестом отмечено место воздействия. Цифры указывают на исследуемые сегменты.

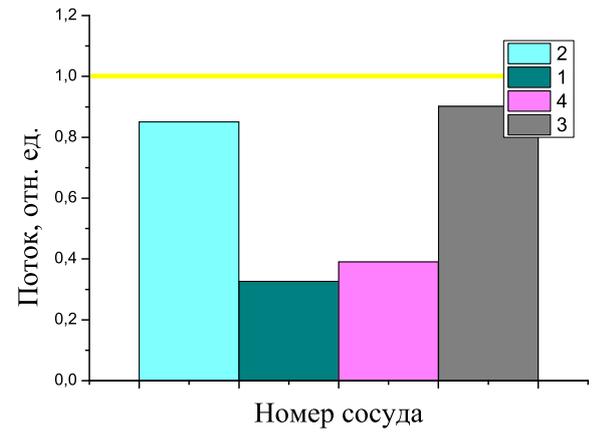
Интересным образом, сегмент 1, через который проходит весь поток фрагмента сети, показывает увеличение относительно контрольного значения, см. рисунок 2.14,б,г,д. Вслед за изменением входящего потока можно видеть разнонаправленное изменение потока в сосуды 2 и 4. Например, рисунок 2.14 от г, к д, резкое увеличение потока в 1 сегменте вызвало сильное увеличение потока во 2 сегменте и сильное уменьшение потока в 4 сегменте, а затем, на небольшое уменьшение потока через 1 сегмент, 2 сегмент отреагировал уменьшением, а 4 увеличением потока. Таким образом, уменьшение потока в одной части сети может вызывать гиперкомпенсацию – рост потока в другие ветви, перекрывающий это уменьшение, и наоборот.

Наконец, интересно перераспределение потока между сегментами 4, 5 и 6. Сразу после воздействия поток через сосуд 5 уменьшается и к концу наблюдения снижается практически в 2 раза от начального уровня. На всех панелях рисунка 2.14 очевидно прослеживается взаимосвязь между сосудами 4 и 6.

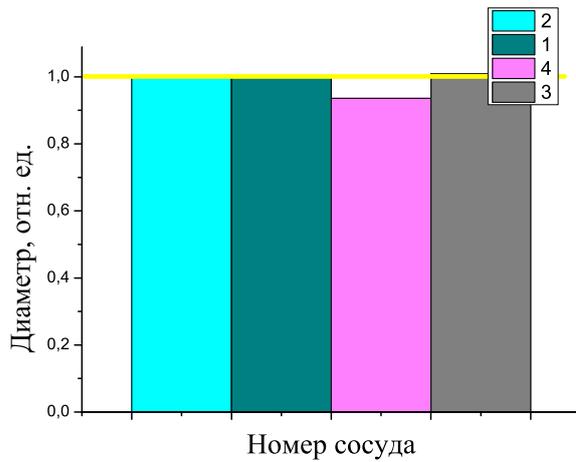
Характеризуя описанную выше картину в целом, можно отметить, что она определенно не соответствует представлениям о распределении потоков согласно законам гидродинамики. Основных причин здесь две. Во-первых, нам неизвестны ни значения, ни степень постоянства давлений на окончаниях сегментов за пределами анализируемого поля. Во-вторых, немонотонный характер изменений явно указывает на существенный вклад механизмов авторегуляции сосудистого тонуса, постоянно подстраивающих упругость сосудистой стенки и, соответственно, радиус сосуда, сообразно изменениям скорости и давления.



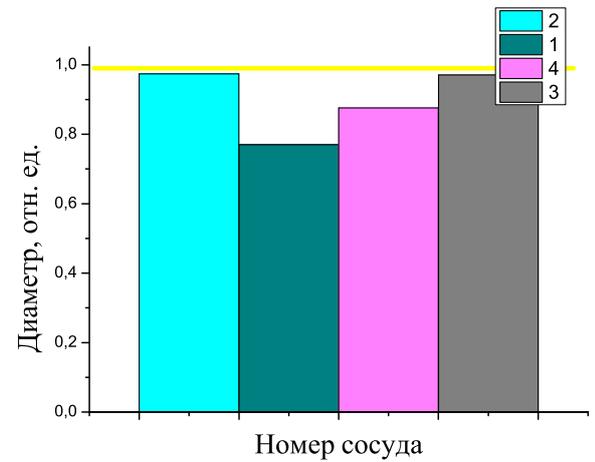
а)



б)

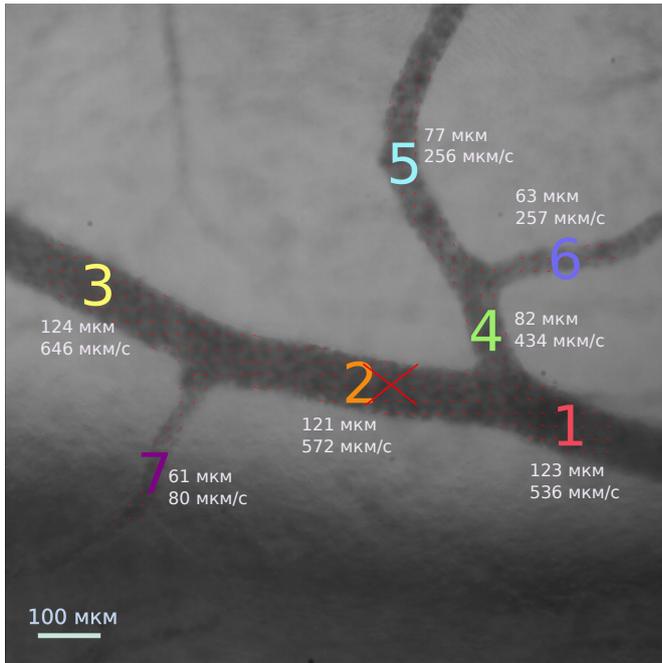


в)

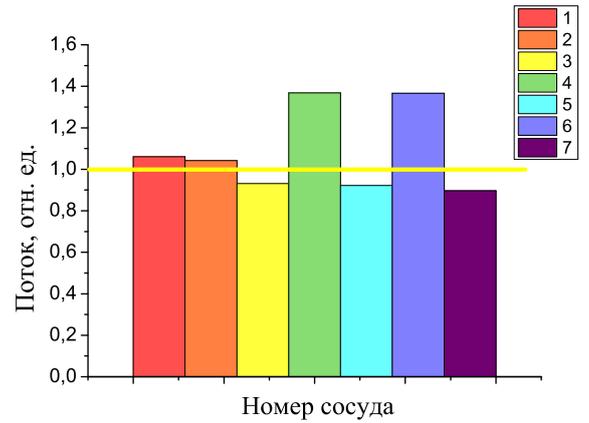


г)

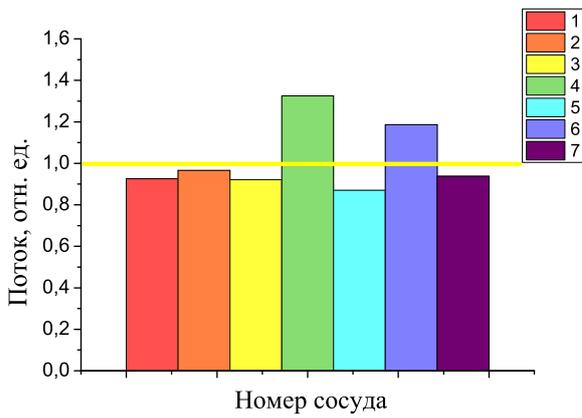
Рисунок 2.13: Изменение характеристик кровеносных сосудов сети после локального лазерного воздействия. Номера сосудов соответствуют нумерации на изображении сети. а) и б) отображают изменение потока с течением времени; в) и г) отображают изменение диаметра с течением времени.



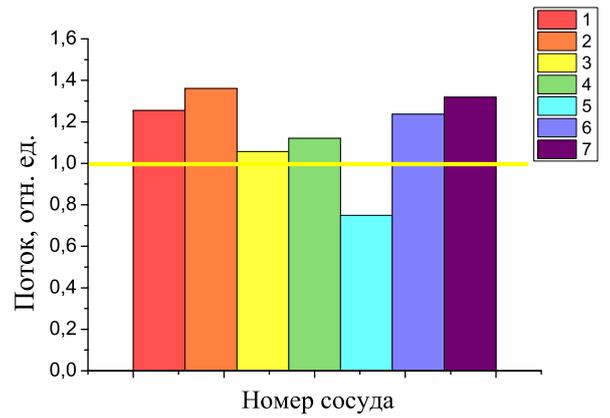
а)



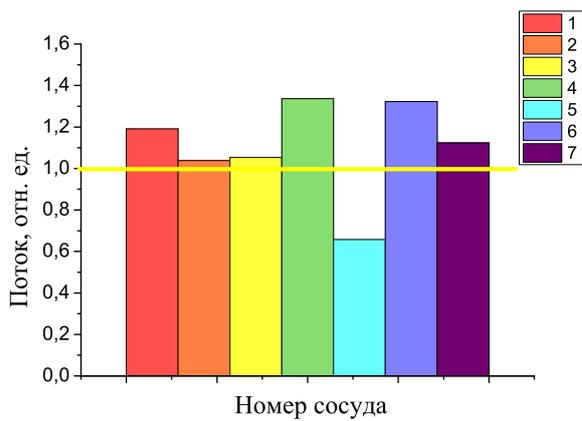
б)



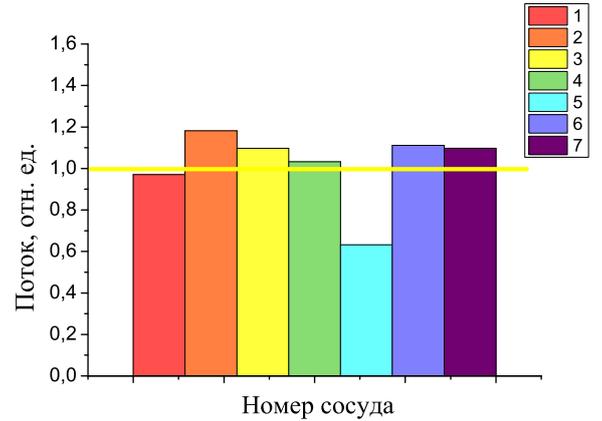
в)



г)



д)



е)

Рисунок 2.14: Изменение характеристик кровеносных сосудов сети после локального лазерного воздействия. Номера сосудов соответствуют нумерации на изображении сети. а) сеть ХАО, крестом отмечено место воздействия; б) - е) отображают изменение потока с течением времени.

2.2.3 Обсуждение результатов

Описанные выше результаты позволяют заключить, что ответная сосудистая реакция на лазерное излучение наблюдалась во всех проделанных нами экспериментах. Еще раз подчеркнем, что сочетание мощности, фокусировки и продолжительности лазерного излучения было таково, что не вызывало ни видимых повреждений сосудистой стенки, ни образования тромбов в просвете сосуда (за исключением одного эксперимента на Y-бифуркации, где образование тромба индуцировалось преднамеренно).

По этой причине, данный метод может рассматриваться как относительно несложная и недорогая (стоимость соответствующих элементов установки существенно меньше стоимости одного микроманипулятора) методика, позволяющая прицельно и контролируемо воздействовать на выбранный участок сосуда, вызывать изменение его диаметра и, таким образом, заставлять реагировать соседние фрагменты микроциркуляторной сети.

Больше вопросов вызывает анализ механизмов наблюдаемых реакций. Следует отметить, что данное исследование не имело целью предложить их доказательную физиологическую интерпретацию, так как в ходе наших экспериментов не контролировался ряд условий и параметров, что необходимо, в частности, для сопоставления данных, полученных для различной длины волны лазера. Тем не менее, анализ результатов позволяет сделать ряд предположений касательно механизмов, которые активируются при облучении фрагмента сосуда.

В результате проведенного эксперимента мы увидели локальный дилатационный ответ на лазерное воздействие. Какая часть системы “сосуд+кровь” обеспечивает реакцию? Так как сосуды хориоаллантоисной оболочки не имеют нервной регуляции, и можно исключить любые другие системные механизмы (в этом случае наблюдалась бы реакция всей сети), то речь идет о локальном механизме дилатации, который с наибольшей вероятностью опосредован оксидом азота NO, запускающим цепочку превращений и действий циклического гуанозинмонофосфата cGMP. Вероятных источников NO в данном случае два: это либо клетки эндотелия сосудистой стенки, либо сама кровь, и в первую очередь – эритроциты в ее составе [203].

В работах [148, 156, 157] было показано, что облучение эритроцитов крови лазером заставляет их отдавать присоединенный NO, диффузия которого в клетки гладкой мускулатуры способна индуцировать расширение сосуда. Время реабсорбции (и/или диффузии) NO составляет около 2 секунд, что в предположении средней скорости монотонного потока в артериоле порядка 200–300 мкм/с дает оценку локализации эффекта около 400–600 мкм вниз по потоку от места воздействия. В наших экспериментах участок дилатации меньше, 120–200

микрон, и расположен как вниз, так и вверх по потоку. Однако поток крови в артериолах ХАО, как правило, сильно пульсирует вплоть до изменения направления. При этом эритроциты могут смещаться в обе стороны от места облучения, а их средняя скорость может быть значительно меньше максимальной. Таким образом, обсуждаемый механизм как минимум может иметь место.

Другой важной особенностью полученных результатов является наличие зон констрикции, окружающих область воздействия и дилатации или же распространяющихся на значительное удаление от точки воздействия. Согласно современным представлениям [4, 204], эти наблюдения могут соответствовать т. н. распространяющейся вазоконстрикции (conducted vasoconstriction), эффекту, который наблюдался и исследовался для различных органов лабораторных животных. Насколько известно автору диссертации, данный эффект в сосудах ХАО куриного эмбриона ранее не наблюдался. Предположительно, данная реакция обусловлена передачей электрического импульса деполяризации по щелевым контактам между клетками эндотелия. Однако ответ на то, какая именно цепочка событий запускает этот механизм в месте воздействия, требует отдельного исследования.

Также требует дальнейшего исследования первичный механизм передачи энергии лазерного излучения крови и клеткам кровеносных сосудов. В качестве наиболее вероятного механизма следует принять фототермическое воздействие, обусловленное поглощением лазерного излучения кровью. В пользу этого механизма свидетельствует зависимость характера наблюдаемого эффекта от длины волны лазерного излучения и диаметра сосуда. Как известно, поглощение света кровью для длины волны лазерного излучения 405 нм в несколько раз выше, чем для 532 нм [205]. Таким образом, нагревание крови в результате поглощения света будет более значительным при облучении лазером на длине волны 405 нм, по сравнению с 532 нм.

Можно предположить, что более интенсивный нагрев вызывает констрикцию сосудов, в то время как умеренный нагрев – дилатацию. Данное предположение объясняет также тенденцию к констрикции сосудов большего диаметра при облучении их лазером 532 нм. Поглощенная мощность лазерного излучения возрастает по мере увеличения диаметра сосуда, это обуславливает более интенсивный нагрев крови в нем и, соответственно, констрикцию сосуда.

2.3 Лазер-индуцированная вазореактивность лимфатических сосудов брыжейки крысы

Так как рабочая гипотеза о механизмах лазер-индуцированной вазореактивности кровеносных сосудов включает возможность высвобождения оксида азота эритроцитами, дополнительно к исследованию кровотока в сосудистой системе куриного эмбриона, была выполнена отдельная серия экспериментов на лимфатических сосудах брыжейки крысы, так как в этом случае вклад эритроцитов исключен.

2.3.1 Протокол измерений

Протокол подготовки крысы к эксперименту описан в Главе 1 настоящей работы. В эксперименте было задействовано 12 особей, проведено 52 воздействия. Использовали имеющуюся установку с лазером на длине волны 405 нм и выходной мощностью 14 мВт. Лазерное воздействие оказывалось двумя способами:

- (1) лазерное воздействие прекращалось с наступлением ответной реакции
- (2) лазерное воздействие продолжалось в течении 10-20 секунд после наступления реакции.

2.3.2 Результаты

Как было установлено, лазерное облучение вызывало ответную реакцию практически у всех исследованных сосудов, а именно, в 92% случаев. Как известно, нормальным физиологическим состоянием малых лимфатических сосудов является режим спонтанных сокращений гладких мышц его стенки. Такие сокращения наблюдаются примерно 1 раз в 30 секунд, реже – 2 раза в 30 секунд, как показано на рисунок 2.15,а. Согласно нашим данным, основной эффект лазерного облучения выражался во “внеочередной” активации одного или нескольких таких сокращений.

В ходе экспериментов нами фиксировались серии от 1 до 6 ритмичных сокращений подряд, рисунок 2.15,в, г. При этом средняя скорость сокращения стенок сосуда примерно в 2 раза выше средней скорости расслабления, 22.1 ± 12.3 мкм/с и 12.1 ± 6.9 мкм/с, соответственно.

Результаты экспериментов показывают, что степень изменения размера диаметра одного и того же сосуда не зависит от наличия воздействия, см. рисунок 2.15,а, б, т. е. лазерное воздействие не приводит к увеличению сжимания сосуда, но запускает клеточные механизмы,

которые способствуют учащенным периодичным сокращениям. А также, поскольку известно, что по лимфатическим мышечным клеткам передается потенциал действия (ПД) в обе стороны от полученного импульса, предположительно, лазерное воздействие запускало волну ПД, приводящую к сокращению сосуда как в месте воздействия, так выше и ниже по потоку.

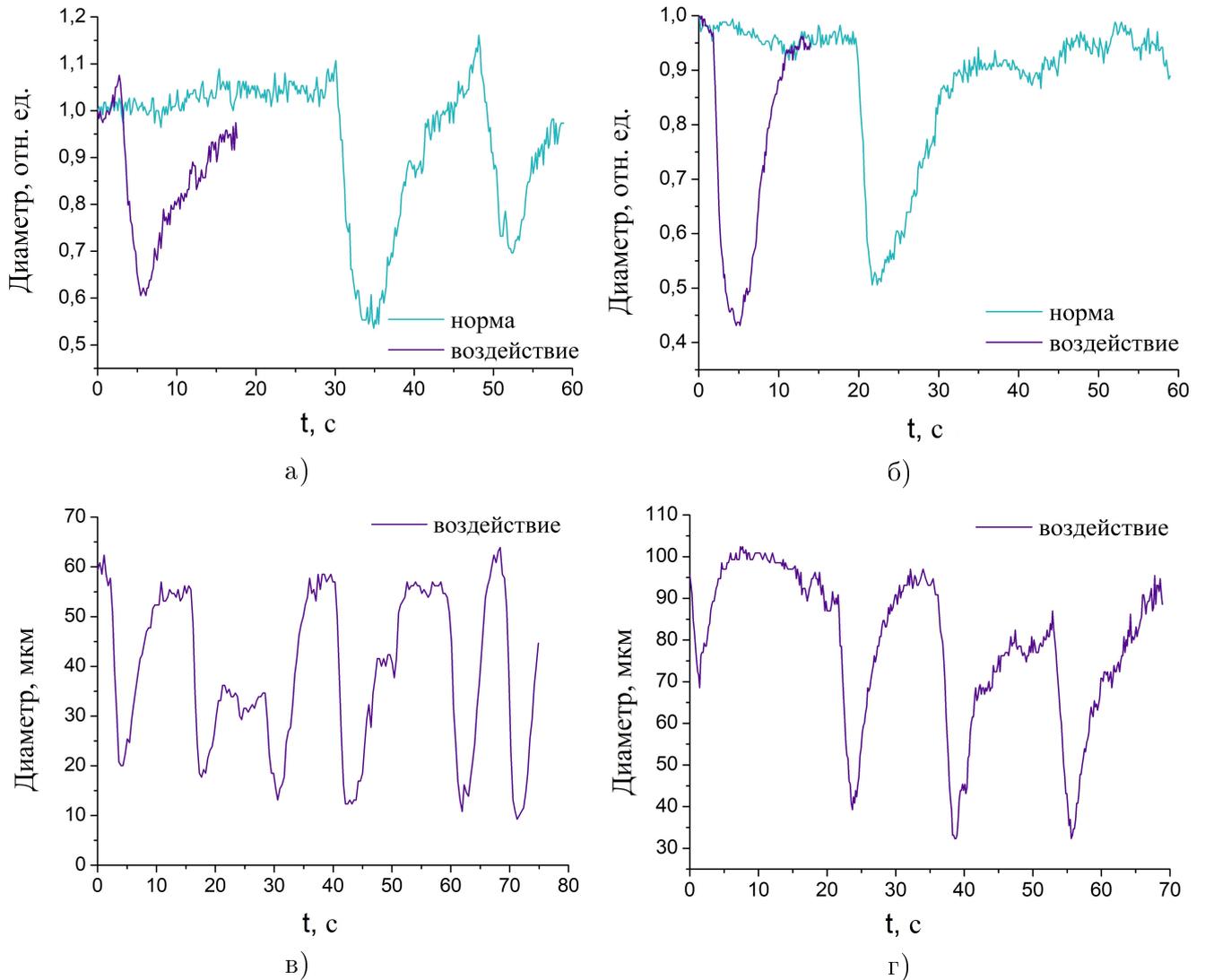


Рисунок 2.15: Ответная реакция лимфатических сосудов на лазерное воздействие. На панелях (а) и (б) показано относительное изменение диаметра сосуда в норме и в результате воздействия. На панелях (в) и (г) – ритмичное сокращение сосуда.

2.4 Заключение по главе

Основные результаты главы могут быть суммированы следующим образом:

1. Хориоаллантоисная оболочка куриного эмбриона является адекватной биомоделью для изучения паттернов вазореактивности. При надлежащей подготовке объекта (выращивание *ex ovo*) исследованию легко доступна развитая микроциркуляторная сеть с бифуркациями сосудов в поле зрения диаметром 1.2 мм.

2. Были исследованы индуцированные лазерным облучением сосудодвигательные реакции одиночного артериального сосуда хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона *in situ*. По итогам исследования, разработанная методика представляется авторам перспективной для использования в качестве неразрушающей бесконтактной физиологической пробы при исследованиях реакций микроциркуляторной сети.

3. Характерной особенностью микроциркуляторной сети ХАО можно считать высокий уровень пульсаций кровотока, в результате чего во многих случаях средняя скорость (дрейф форменных элементов крови) существенно ниже, чем средняя абсолютная ее величина, которая определяет напряжение сдвига клеток эндотелиального слоя и, следовательно, их сосудодвигательную реакцию.

4. Исследование лазер-индуцированной вазореактивности одиночного сосуда ХАО куриного эмбриона показало, что:

- реакция сосуда наблюдается в 100% случаев,
- в проведенных сериях экспериментов, выявлено различие в действии лазера на длинах волн 405 нм и 532 нм. При воздействии лазером (532 нм) в месте воздействия преобладает дилатация, при воздействии лазером (405 нм) – констрикция
- наряду с вызванной воздействием вазодилатацией, имеет место распространяющаяся вазоконстрикция
- простой нагрев близлежащих тканей лазером не дает сходных результатов

5. Исследование лазер-индуцированной вазореактивности интактного фрагмента микроциркуляторной сети ХАО куриного эмбриона показало, что паттерны изменения состояния (диаметров и линейной скорости кровотока) в сосудах, прилежащих к месту воздействия лазером, имеют сложный характер и существенно отличаются от тех, которые можно было бы ожидать при “гидродинамической” интерпретации реакций такой системы. Данные результаты подтверждают тезис о важном вкладе процессов авторегуляции сосудистого тонуса в формирование отклика микроциркуляторной сети на локальные воздействия или повреждения.

6. Проведенная серия экспериментов на лимфатических сосудах брыжейки крысы была основана на аналогии в строении сосудистой стенки кровеносных и лимфатических сосудов и имела своей целью установить, индуцирует ли лазерное воздействие сосудодвигательные реакции в отсутствие эритроцитов. Получен положительный результат – во всех случаях удавалось добиться временного усиления сократительной активности лимфатического сосуда с его возвращением к нормальному функционированию при прекращении воздействия.

В целом, результаты проведенных экспериментальных исследований призваны дополнить представление о динамике сосудистых реакций в микроциркуляторных сетях, однако их полноценная интерпретация и анализ физиологических механизмов предполагают соответствующее модельно-теоретическое исследование, которому и посвящена следующая глава диссертационной работы.

Глава 3

Модельное исследование процессов авторегуляции сосудистого тонуса

В данной главе описана математическая модель и результаты вычислительных экспериментов в рамках задач по теоретическому исследованию процессов авторегуляции кровотока в сетях микроциркуляции.

Особенностью и элементом новизны предлагаемой модели является то, что она включает как биомеханические аспекты реакции сосуда (описание потоков, изменение его радиуса в зависимости от трансмурального давления), так и основные клеточные механизмы, управляющие изменением упругости сосудистой стенки: миогенный (реакция клеток гладкой мускулатуры на трансмуральное давление) и эндотелиальный (реакция клеток эндотелия на увеличивающийся поток), в англоязычной литературе известный как FMD, FIV, FID (flow-mediated dilation, -induced vasodilatation, -induced dilation).

Так как по своему назначению модель должна давать правдоподобное предсказание динамики в сетях, математическое описание обоих аспектов ее работы (биомеханический и клеточный) предельно минимизировано. В итоге модель сегмента сосуда содержит 4 обыкновенных дифференциальных уравнения и 16 управляющих параметров.

Первый раздел главы содержит описание упомянутой выше математической модели сегмента сосуда вкупе с используемым в рамках данной работы способом моделирования динамики кровотока в васкулярных сетях любого размера.

Уравнения сегмента сосуда изначально описаны в безразмерном виде, без привязки к конкретному размеру сосуда и параметрам кровотока. Отдельно дана информация по параметризации модели, то есть, по заданию согласованного набора размерных параметров, специфичных для определенного типа и размера сосуда.

В последующих разделах главы приведены результаты вычислительных экспериментов при учете механизмов регуляции тонуса при последовательном усложнении исследуемой конфигурации сосудов. В частности, исследованы:

- Реакция одиночного сегмента на тестовый сигнал;
- Реакция одиночного сегмента на увеличение степени пульсаций кровотока;
- Перераспределение кровотока на Y-бифуркации сосудов при окклюзии одного из сегментов;
- Перестройка состояния малой (14 сегментов) микроциркуляторной сети при установлении стационарного режима и при окклюзии одного из сегментов;
- Перераспределение кровотока в сети в ответ на силу эндотелиальной регуляции.

Результаты данной главы опубликованы в работах [П2, П5, П6, П7, П9, П13, П15, П21].

3.1 Модель сегмента кровеносного сосуда с учетом авторегуляции его сечения

3.1.1 Пространственная структура клеточных слоев и обоснование выбора функционального сегмента

При решении задач гемодинамики стандартным подходом является рассмотрение стенок сосудов как непрерывной и относительно однородной среды. Однако этот подход менее применим в случае малых сосудов, и, особенно, при учете механизмов регуляции сосудистого тонуса, так как по своему строению сосудистая стенка – это дискретная многослойная структура, и указанная дискретность проявляется в полной мере для малых сосудов. Типичная топология “укладки” двух клеточных слоев – эндотелиального и клеток гладкой мускулатуры – схематически изображена на рисунке 3.1 а). Как можно видеть, клетки эндотелия (КЭ) выстроены вдоль сосуда, а клетки гладкой мускулатуры (КГМ) охватывают сосуд по окружности. Такое расположение отвечает основным сигнальным и механическим функциям этих типов клеток. Простые подсчеты показывают, что при длине эндотелиальной клетки порядка 0.1 мм на один миллиметр длины небольшой артерии или артериолы приходится всего 10 клеток. Аналогично, окружность небольших сосудов охватывает 3-7 КГМ. Заметим, что слой КЭ, хотя и не изменяет непосредственно диаметр сосуда, служит каналом электрической связи, способствующим синхронизации активности КГМ, без чего сокращение сосуда, как целого, невозможно. По современным представлениям о взаимодействии клеток сосудистой стенки, электрическое сопротивление связи между КЭ примерно в 600 раз меньше, чем между двумя соседними КГМ и в 30 раз меньше, чем между КЭ и КГМ [23]. Таким образом,

для целей анализа процессов в небольших сосудах, размер моделируемого сегмента должен выбираться с учетом характерных размеров клеточных структур. В разработке модели мы следуем подходу, который поясняется на рисунке 3.1 б). А именно, пренебрегая перекрытием КЭ по длине, можно выделить двухслойную “решетку” клеток, в пределах которой КГМ взаимодействуют с одними и теми же КЭ. Поскольку расстояние 0.05 – 0.1 мм можно считать малым с точки зрения перепада давления и других характеристик потока крови, такая дискретизация подходит и для гемодинамической части модели.

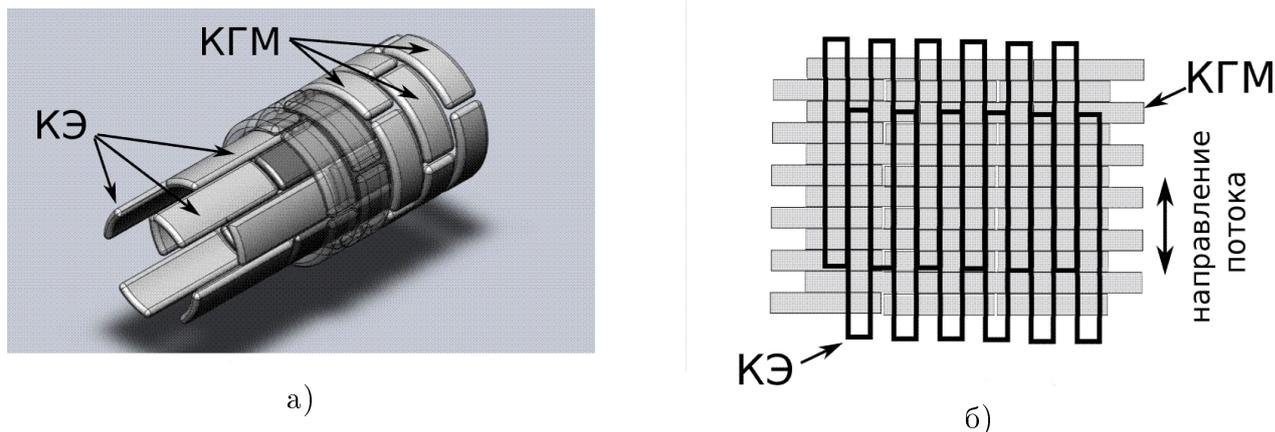


Рисунок 3.1: Схематичное представление структуры клеточных слоев сосуда а) и выделение сегмента как объекта моделирования б) КЭ – клетки эндотелия; КГМ – клетки гладкой мускулатуры.

3.1.2 Основные пути авторегуляции потока в сегменте сосуда

На рисунке 3.2 представлены основные пути регуляции состояния сегмента кровеносного сосуда, как механические, так и опосредованные клетками сосудистой стенки.

В нижней части диаграммы отображен баланс давления в сегменте P и двух потоков, втекающего и вытекающего, которые обусловлены разностью давлений $(P_a - P)$ и $(P - P_v)$. Рост давления P вызывает увеличение радиуса сосуда R , причем сила, расширяющая сосуд постоянной длины, растет пропорционально произведению давления и радиуса, так как с ростом R растет и площадь, на которую оказывается давление. Этой силе противодействует сила упругости сосуда, которая создается как упругими волокнами в стенках сосуда (пассивная упругость, которая зависит только от R), так и сократительным тонусом КГМ (активная составляющая упругости).

В свою очередь, тонус КГМ формируется в результате действия целого набора клеточных механизмов: изменение электрического потенциала V_m клеток обоих типов вызывает изменения внутриклеточной концентрации кальция Ca^{2+} , что ведет к выработке химиче-

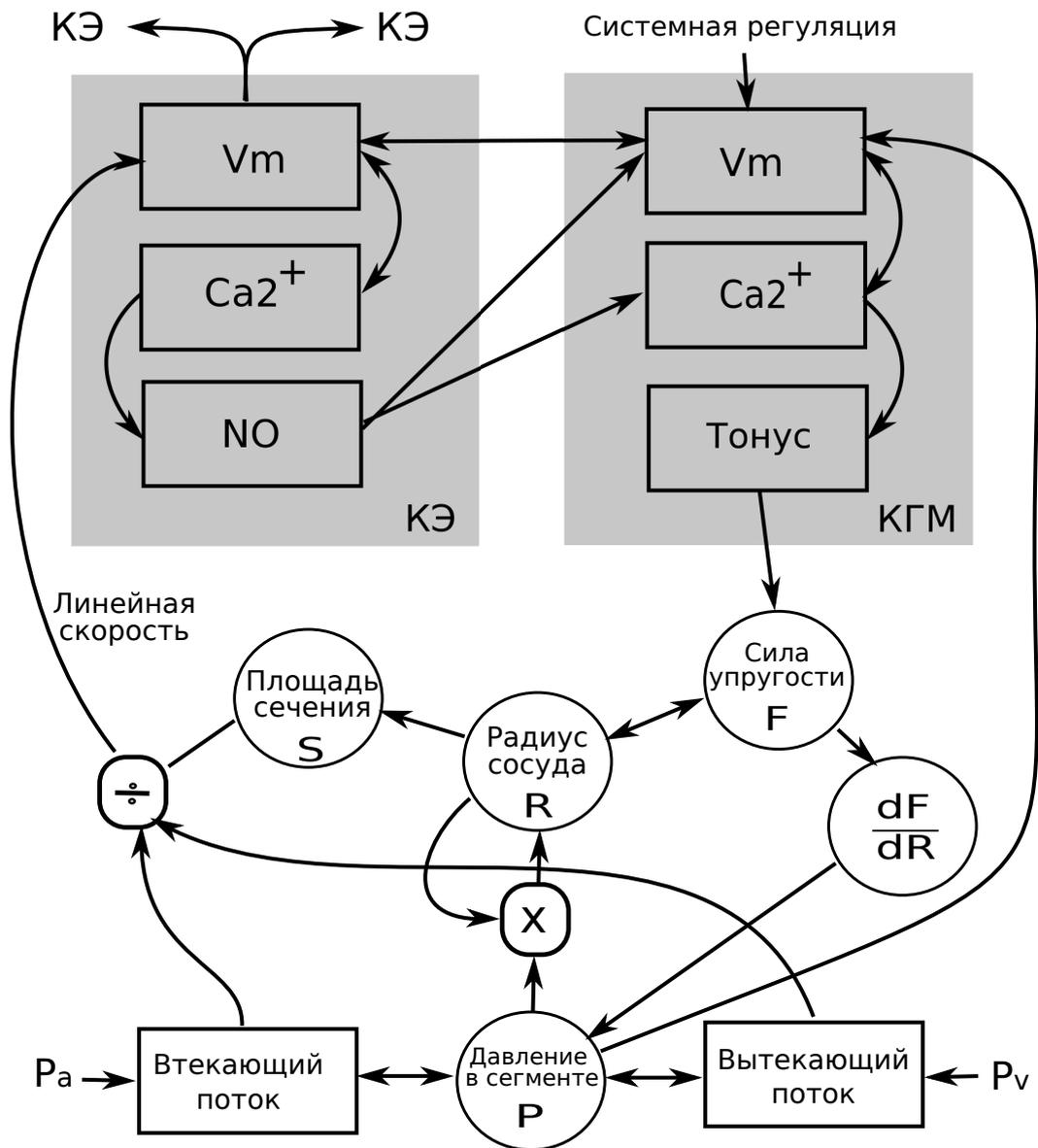


Рисунок 3.2: Основные взаимосвязи величин, определяющих состояние сегмента и пути авторегуляции сосудистого тонуса.

ских сигнальных веществ (например, оксид азота NO в КЭ). Вся эта цепочка имеет своим результатом механическое сокращение КГМ, то есть, изменение гладкомышечного тонуса.

Заметим, что клетки эндотелия и гладкой мускулатуры, выступая в роли сенсоров, реагируют на различные параметры кровотока. КЭ вырабатывают NO в ответ на рост сдвигового напряжения клеточного слоя, то есть, при увеличении линейной скорости кровотока. Это приводит к уменьшению тонуса КГМ и, следовательно, расширению сосуда. В свою очередь, КГМ чувствительны к росту расширяющего сосуд давления, на который они отвечают увеличением силы сокращения.

Представленная картина взаимодействий в сегменте сосуда может быть дополнена путем пространственной электрической связи КЭ друг с другом вдоль сосуда (двойная стрелка вверху диаграммы), а также различными системными (на уровне организма) воздействиями, которые не рассматриваются в рамках данной главы.

Как можно видеть из вышесказанного, пути регуляции сосудистого тонуса даже малого сегмента сосуда довольно многообразны, и попытка учесть их все неизбежно приведет к модели, содержащей несколько десятков дифференциальных уравнений и множество параметров. Основной задачей, которая решалась при построении функциональной модели, был выбор набора элементов, соответствующих конкретным задачам диссертационного исследования. В нашем случае, в отличие от большинства работ в области моделирования гемодинамики, второстепенными для нас являются характеристики потока, который мы будем моделировать по типу модели Windkessel, представляя сегмент в виде двух неэластичных участков с одинаковым гидродинамическим сопротивлением и одного элемента упругого изменения объема, который не имеет гидродинамического сопротивления. Важным аспектом описанной ниже модели является учет нелинейного характера и динамической регуляции степени упругости стенки сосуда, так как именно это позволяет наблюдать в вычислительном эксперименте реакции адаптации сосуда к изменениям давления и потока, аналогичные тем, которые наблюдаются в экспериментах.

3.1.3 Уравнения модели сегмента

Вывод модельных уравнений опирается на следующие основные соотношения [21]:

$$\frac{dW}{dt} = J_{in} - J_{out}, \quad (3.1)$$

$$\mu \frac{d^2 R}{dt^2} + \gamma \frac{dR}{dt} + (F_{elastic} + F_{active}) = 2\pi RLP, \quad (3.2)$$

где уравнение (3.1) описывает изменение объема сегмента сосуда W в соответствии с втекающим и вытекающим потоками J_{in} и J_{out} . В свою очередь, $W = PC$, где P и C – есть давление в эластичном элементе сегмента и величина его податливости (растяжимости, эта величина обратна коэффициенту упругости), соответственно. Так как мы считаем C переменной во времени величиной, то $dW = d(PC) = CdP/dt + PdC/dt$.

Уравнение (3.2) описывает поведение сегмента сосуда радиусом R как осциллятора с параметром инерции μ и коэффициентом вязкого трения γ . $F_{elastic}$ и F_{active} обозначают силы реакции, возникающие за счет эластичных элементов стенки сосуда и за счет сокращения клеток гладкой мускулатуры, соответственно. Величина $2\pi RLP$ есть расширяющая сегмент сила, где давление P приложено к площади сегмента $2\pi RL$, (L – длина в направлении вдоль потока).

Дополнение уравнений (3.1) и (3.2) путями взаимодействия, рисунок 3.2, а также конкретным видом функций отклика путей регуляции, приводит к модельной системе, которая содержит 4 дифференциальных уравнения. В размерном представлении модели c – это податливость на единицу длины (crosssectional compliance), которая имеет размерность $\text{мм}^2 / \text{мм рт.ст.}$. Размерность длины сегмента L и радиуса r выражены в мм, давления в сегменте p – в мм рт.ст. Переменные e и m – безразмерны, они отражают степень активации клеток эндотелия и гладкой мускулатуры, соответственно, и изменяются в интервале от 0 до 1.

$$Lc \frac{dp}{dt} = j_{in} - j_{out} - p \frac{dLc}{dr} \cdot \frac{dr}{dt}, \quad (3.3)$$

$$\tau_r \frac{dr}{dt} = 2\pi Lrp - L(f_e(r) + f_a(m)), \quad (3.4)$$

$$\tau_e \frac{de}{dt} = \frac{v(j_{in}, j_{out})}{K_e + v(j_{in}, j_{out})} - e, \quad (3.5)$$

$$\tau_m \frac{dm}{dt} = \frac{\alpha_p(p) - \alpha_e e}{K_m + \alpha_p(p) - \alpha_e e} - m, \quad (3.6)$$

$$j_{in} = r^4 (p_a - p) \frac{\pi}{8L\eta}, \quad j_{out} = r^4 (p - p_v) \frac{\pi}{8L\eta}, \quad (3.7)$$

$$f_e(r) = \kappa_e \frac{1}{2} \ln \left\{ \frac{r/r_0}{2 - r/r_0} \right\}, \quad (3.8)$$

$$f_a(m) = (\kappa_a m)(r/r_0), \quad (3.9)$$

$$c = \frac{d(\pi r^2)}{d\left(\frac{f_a + f_e}{2\pi r}\right)} = \frac{4\pi^2 r^2}{\frac{df_e}{dr} + \frac{df_a}{dr} - (f_e + f_a)/r} = \frac{8\pi^2 r^3}{\kappa_e \left(\frac{2r_0}{2-r/r_0} - \ln\left(\frac{r/r_0}{2-r/r_0}\right)\right)}, \quad (3.10)$$

$$v(j_{in}, j_{out}) = 0.5(|j_{in}| + |j_{out}|)/\pi r^2, \quad (3.11)$$

$$\alpha_p(p) = (p/p_{max}(1 + th(2(p/p_{max}) - 0.8)))/2. \quad (3.12)$$

В уравнении (3.3) для p размерность потоков j_{in} и j_{out} выражена в $\text{мм}^3/\text{с}$.

В уравнении (3.4) для радиуса сосуда, размерность $2\pi Lrp$ – это сила давления на всю поверхность сегмента длиной L , а $f_e(r)$ и $f_a(m)$ – силы пассивной и активной упругости на единицу длины, имеют размерность $\text{мм рт.ст.} \times \text{мм}$. Коэффициент вязкого трения τ_r имеет размерность $\text{мм рт.ст.} \times \text{мм} \times \text{с}$.

При записи модельных уравнений, действие каждого из двух механизмов регуляции (две выделенные серым области на рисунке 3.2) было описано с помощью одного нелинейного дифференциального уравнения первого порядка. Таким образом, уравнение (3.5) обобщенно описывает реакцию e клеток эндотелия, игнорируя детали многоступенчатого механизма и принимая в расчет только наличие определенного временного масштаба τ_e в выработке регулирующего фактора (оксида азота), а также нелинейное ограничение действия сигнальной величины $v(j_{in}, j_{out})$, которая, в свою очередь, пропорциональна средней линейной скорости потока в сосуде согласно (3.11). Аналогично, уравнение (3.6) для величины мышечного тонуса m , активируется действием давления p посредством (3.12) и частично деактивируется переменной e , а параметр τ_m задает относительную скорость сократительной реакции мышц гладкой мускулатуры. Параметры K_e и K_m определяют степень и диапазон чувствительности указанных переменных к действию активирующих факторов.

В уравнении (3.5), размерность скорости v и константы половинной активации K_e есть $\text{мм}/\text{с}$, тогда дробь безразмерна, как и сама переменная e . Параметр τ_e описывает характерное время реакции клеток эндотелия на сдвиговое напряжение и имеет размерность секунды. Соответственно, в (3.11), потоки выражены в $\text{мм}^3/\text{с}$, радиус в мм , тогда скорость v получается в $\text{мм}/\text{с}$.

В (3.6), $\alpha_p(p)$ – это безразмерная функция, так как e – безразмерная переменная (степень активации клеток эндотелия), при этом безразмерный коэффициент α_e задает относительный вклад эндотелия в модуляцию сосудистого тонуса.

Параметр τ_m описывает характерное время реакции клеток гладкой мускулатуры и имеет размерность секунды.

В (3.7), потоки выражены в $\text{мм}^3/\text{с}$, поэтому вязкость крови η необходимо выразить в $\text{мм рт.ст.} \times \text{с}$.

В (3.8) величина упругой силы зависит от степени растяжения по отношению к базальному (в состоянии покоя, при отсутствии давления и потока) радиусу сосуда r_0 , выбранной формой функции допускается максимальное растяжение в 2 раза (на практике, для вен эта величина может быть больше, около 2.5). Для артерий реалистичное отношение r/r_0 не

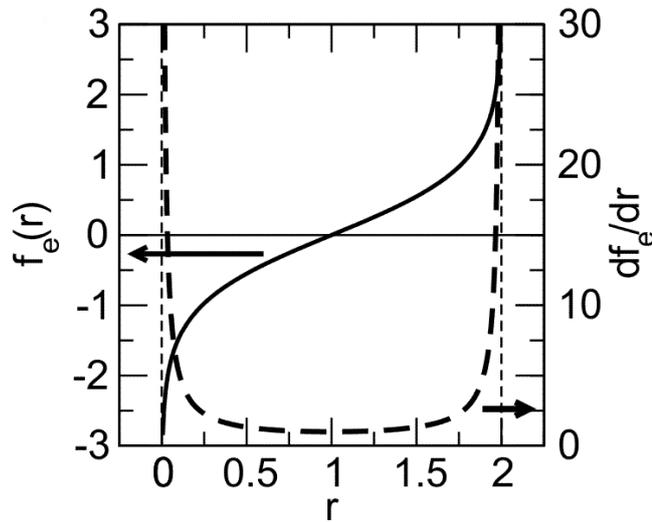


Рисунок 3.3: График модельной зависимости силы пассивной упругости $f_e(r)$ (сплошная линия) и ее производной (пунктир) от радиуса сосуда r .

должно превышать величину 1.5. Коэффициент κ_e задает величину упругой силы на единицу длины и имеет размерность мм рт.ст. \times мм.

Аналогично, в (3.9) коэффициент κ_a задает величину силы активной регуляции на единицу длины и имеет размерность мм рт.ст. \times мм.

В (3.10), базальная (для нерастянутого сосуда) величина c_0 (податливость, crosssectional compliance) задается на основе литературных данных с размерностью мм²/мм рт.ст. и на этой основе рассчитывается оценка $\kappa_e = 4\pi^2 r_0^3 / c$. Выбор в уравнении (3.10) конкретной нелинейности в виде смещенной функции ареатангенса обусловлен ее подходящей формой и простым видом производной. А именно как показано на рисунке 3.3, в исходном состоянии $r/r_0 = 1$ и $f_e(r) = 0$, то есть упругие силы отсутствуют. По мере отклонения радиуса в меньшую или большую стороны сила пассивной упругости резко нарастает при приближении к $r = 0$ (сосуд сжат полностью, просвет отсутствует) или $r = 2r_0$ (двукратное растяжение сосуда, которое мы принимаем как предельно возможное без его разрушения). Соответственно, производная от $f_e(r)$, которая входит в (3.20), задает значение пассивного коэффициента упругости при конкретном r .

В (3.11) скорость v рассчитывается в единицах мм/с.

В (3.12), параметр p_{max} – это предельное давление для работы миогенного механизма, так, чтобы безразмерная функция $\alpha_p(p)$ выходила на насыщение ≈ 1 .

3.1.4 Безразмерная форма модели

При исследовании особенностей динамики, описанную выше модель удобно представить в безразмерном и несколько упрощенном виде, путем объединения коэффициентов и их нормирования:

$$cp' = j_{in} - j_{out} - p \frac{dc}{dr} r', \quad (3.13)$$

$$\tau_r r' = rp - (f_e(r) + f_a(m)), \quad (3.14)$$

$$\tau_e e' = \frac{v(j_{in}, j_{out})}{K_e + v(j_{in}, j_{out})} - e, \quad (3.15)$$

$$\tau_m m' = \frac{\alpha_p(p) - e}{K_m + \alpha_p(p) - e} - m, \quad (3.16)$$

$$j_{in} = r^4 \sigma_r (p_a - p), \quad j_{out} = r^4 \sigma_r (p - p_v), \quad (3.17)$$

$$f_e(r) = \frac{1}{2} \kappa_e \ln \left\{ \frac{r}{2-r} \right\}, \quad (3.18)$$

$$f_a(m) = (\kappa_a m) r, \quad (3.19)$$

$$c = \frac{d(r^2)}{d\left(\frac{f_a + f_e}{2r}\right)} = \frac{2r^2}{\frac{df_a}{dr} + \frac{df_e}{dr} - \frac{f_a + f_e}{r}} = \frac{4r^3}{\kappa_e \left(\frac{2}{2-r} - \ln\left(\frac{r}{2-r}\right)\right)}, \quad (3.20)$$

$$v(j_{in}, j_{out}) = 0.5(|j_{in}| + |j_{out}|) / \pi r^2, \quad (3.21)$$

$$\alpha_p(p) = p(1 + th(2p - 0.8)) / 2. \quad (3.22)$$

Как и выше, в уравнении (3.14) для радиуса влиянием инерции пренебрегли, что хорошо соответствует большинству сосудов, за исключением наиболее крупных. Коэффициент вязкого трения и площадь поверхности сегмента вошли в τ_r . Силы пассивной (за счет эластичности) и активной (за счет мышечного сокращения) упругости представлены величинами $f_e(r)$ и $f_a(m)$, их конкретный вид задается уравнениями (3.18) и (3.19) и масштабируется коэффициентами κ_e и κ_a , соответственно.

Активная регуляция тонуса сосудистой стенки представлена уравнениями (3.15) и (3.16), а также соотношениями (3.19), (3.21) и (3.22).

3.1.5 Модель как динамическая система

Для безразмерного вида математической модели было исследовано фазовое пространство и построен фазовый портрет (ФП). В виду того, что модель описывается системой из четырех дифференциальных уравнений, а строить ФП в четырехмерной системе затруднительно, в системе уравнений было упразднено дифференциальное уравнение баланса потоков 3.13. Это стало возможным, поскольку, во-первых, давление в системе приходит к постоянно-

му значению достаточно быстро и значительно быстрее остальных переменных модели, что видно, например, из рисунка 3.5, и, во-вторых, выше было сказано, что для модели одиночного сегмента давление в его центральной точке всегда устанавливается равным среднему от заданных давлений на его концах, поэтому упразднив дифференциальное уравнение для давления, давление в остальных уравнениях было заменено его средним значением от заданных величин на концах сегмента. Таким образом, ФП строился для трех дифференциальных уравнений, отображающих изменение радиуса и степень активации клеток эндотелия и клеток гладкой мускулатуры.

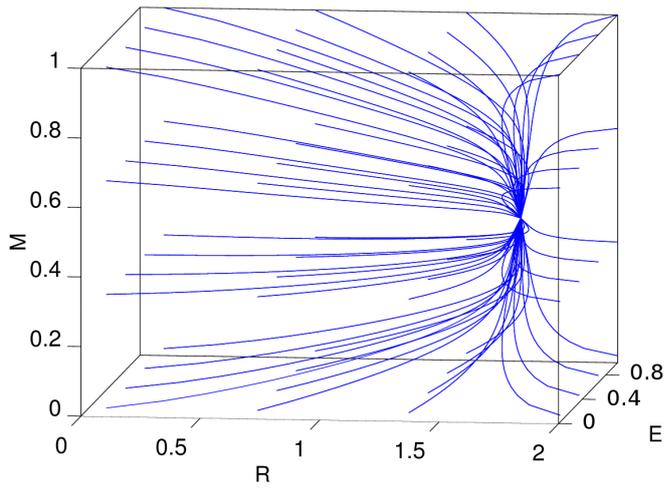
На рисунке 3.4 а) – е) показаны примеры ФП для различных состояний системы, обусловленных определенным набором параметров, представленных в таблице 3.1. По осям координат отложены радиус (R), степень активации КЭ (E) и степень активации КГМ (M). В качестве начальных значений переменных R , E и M была выбрана комбинация из четырех значений в следующих пределах, от 0 до 1.9, от 0 до 1, и от 0 до 1, соответственно.

Из рисунка видно, что при сочетании различных наборов переменных и параметров система имеет одно устойчивое состояние равновесия, а именно устойчивый вырожденный узел.

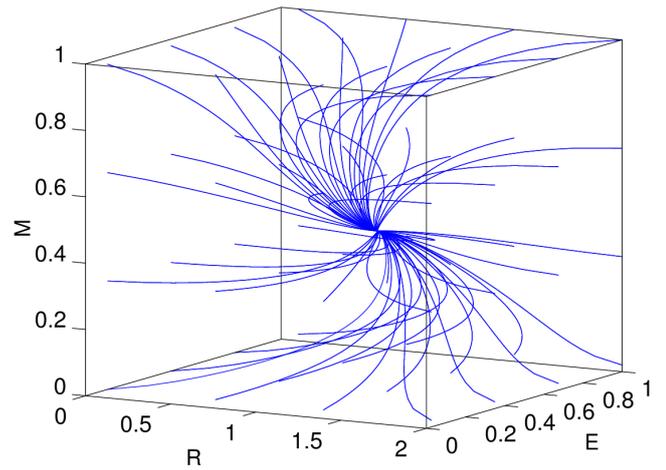
На панели б) была включена активация КГМ, относительно предыдущей реализации, что отражается на перемещение точки равновесия в значение меньшего радиуса, в следствии нормализации системы. На панели в) была добавлена активация КЭ. На панели г) кривые также сходятся в точку равновесия, однако она не так четко выражена и обозначена красной точкой для лучшей наглядности. “Размытие” точки равновесия объясняется увеличением времени активации эндотелиальных клеток. На панели д) было увеличено среднее значение давления, что влечет к максимальному расширению сосуда, и в результате этого точка равновесия стремится к максимальным значениям переменных. На панели е) была изменена величина силы упругости, которая стремится сжать сосуд, и точка равновесия переходит в состоянии при R близкое к 1.

3.1.6 Параметризация модели

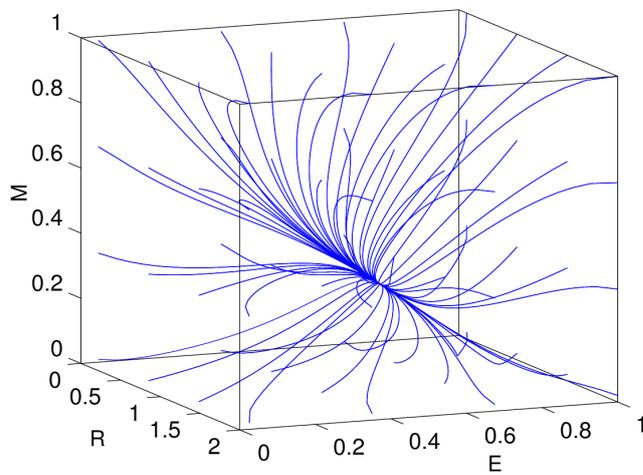
Для безразмерного варианта модели, соотношение параметров можно подобрать так, чтобы результирующее поведение модели качественно соответствовало известным экспериментальным данным. А именно, чтобы суммарный баланс действия давления и сил реакции приводил к увеличению радиуса не более чем в 1.6-1.7 раз, что и являлось опорным показателем для характеристики давления как “высокого”. Временные параметры τ_e , τ_m реакции клеточных механизмов регуляции должны быть достаточно большими, чтобы указанные



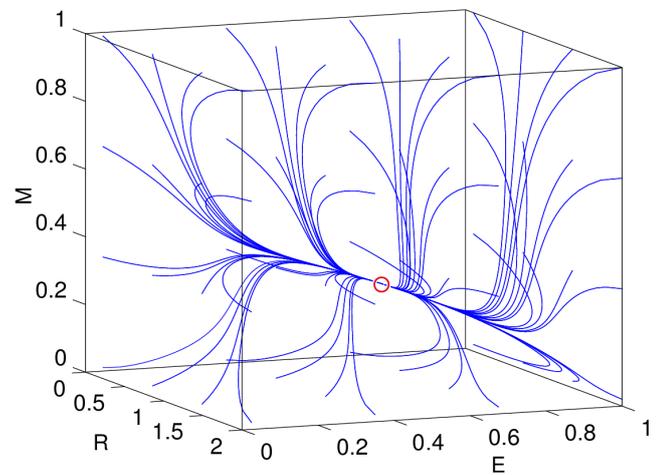
а)



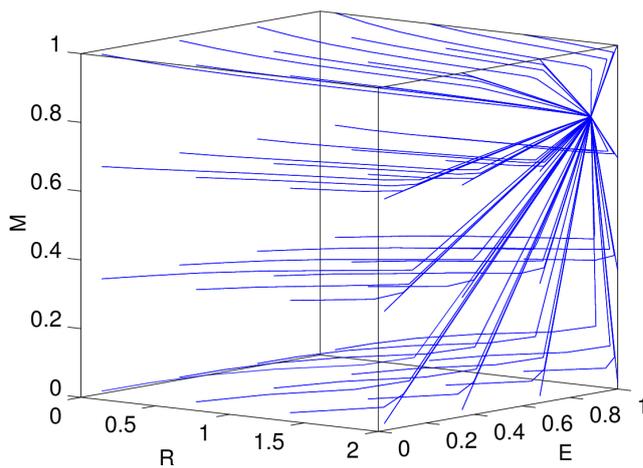
б)



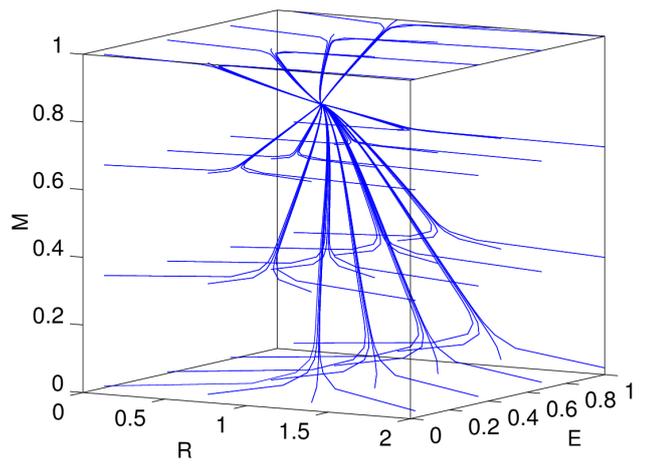
в)



г)



д)



е)

Рисунок 3.4: Фазовый портрет безразмерной математической модели. По осям отложены переменные модели: радиус (R), степень активации клеток гладкой мускулатуры (M) и эндотелиальных клеток (E). Номера рисунков а) – г) соответствуют разному набору параметров модели из таблицы 3.1.

9. Чувствительность эндотелиального механизма к скорости потока K_e ;

10. Параметр чувствительности клеток гладкой мускулатуры к эндотелиальным сигналам α_e ;

11. Начальные значения переменных $p = p_0$, $r = r_0$, $e = 0$, $m = 0$.

Перепад давления может быть задан извне в экспериментах на изолированном сегменте сосуда [206], однако в интактной микроциркуляторной сети его измерить сложно. Автору диссертации удалось найти лишь одну экспериментальную работу [207], где на сосудах брыжейки кошки измерили перепад давления, который составил $0.713 \cdot 10^2 \pm 0.418 \cdot 10^2$ см H_2O /мкм для артериальных сосудов диаметром 29.0 ± 13.3 мкм. Также были рассчитаны и измерены R , ξ , R/L и значение напряжения сдвига стенки для артериальных и венозных сосудов.

По указанной причине, в литературе в основном имеются данные по соотношению диаметра сосуда, потока и скорости кровотока в нем. В работе [208] описаны результаты экспериментов на сосудах ретины человека. На основе измеренных данных диаметра и скорости кровотока артериальных и венозных сосудов, был вычислен поток через них. Также, поток и диаметр артериальных сосудов ретины человека на основе значений измеренной скорости был вычислен в работе [209], средние значения скорости составили 6.3 ± 1.2 см/с, потока 38.1 ± 9.1 мл/с, диаметра 163 ± 17 мкм. Согласно [210] для капиллярных сосудов мезентерия кролика установлено, что при нормальных условиях сосуду диаметром 30 мкм соответствует скорость порядка 3-5 мм/с, при экстремальных условиях скорость может достигать значений в 80 мм/с. В работе [211] скорость кровотока через капилляры мозга крыс составляла 0.39 ± 0.27 мм/с. Значения скорость-диаметр, измеренные на ХАО, были показаны в работе [212], для сосудов размером 61.3 ± 14.8 , 45.2 ± 13.6 , 33.8 ± 9.70 и 44.6 ± 12.5 мкм, скорость составила 554 ± 190 , 495 ± 280 , 330 ± 177 и 432 ± 136 мкм/сек, соответственно.

Приведенные выше данные для их использования требуют знания длины участка сосуда указанного радиуса. Соотношения между длинами и диаметрами различных типов сосудов приведены в работах [213, 214], в которых исследовали капиллярные сосуды 6-18 дневных куриных эмбрионов; в работе [215] – сосуды крыла летучей мыши; а также в работах [187, 216], – кровеносные сосуды собаки.

Объединяя две группы данных (диаметр-поток и диаметр-длина), можно оценить перепад давления на участке сосуда.

Оценка гемодинамического сопротивления связана с заданием в модели величины вязкости крови. Как известно, кровь не соответствует модельному представлению о ньютоновской жидкости, что проявляется тем сильнее, чем меньше диаметр сосудов. С уменьшением размеров сосудов уменьшается скорость в них, и увеличивается вязкость крови. Однако в

сосудах диаметром меньше 500 мкм происходит упорядочивание движущихся эритроцитов, они выстраиваются в ряд и змейкой движутся по сосуду, тем самым значение вязкости крови уменьшается, достигая значений вязкости плазмы (1.9-2.3 Па·с), данное явление носит название эффекта Фареуса-Линдквиста [217]. Зная диаметр, длину, градиент давления на концах сосуда и скорость, исходя из уравнения Пуазейля, можно оценить значение вязкости, как, например, делали в работе [207].

На основе проведенных нами экспериментов по регистрации последовательности кадров кровеносной сети ХАО куриного эмбриона, было выбрано несколько образцов сосудов разного диаметра (d) 120 мкм, 74 мкм и 34 мкм. У данных образцов была измерена длина сосуда и скорость кровотока. Скорость кровотока (v), протекающего через сосуды, была рассчитана с помощью метода μPIV , с использованием программы, написанной на языке *LabView*. Для вычисления объемной скорости потока крови (J), проходящей через сосуд в единицу времени, было использовано соотношение $J = d^2 v \pi / 4$ [218].

Вычисление градиента давления было произведено на основе закона Пуазейля. Значение вязкости, соответствующее среднему значению вязкости крови человека, было выбрано из литературных данных [2]. Для сосуда малого диаметра значение вязкости было уменьшено в соответствии с эффектом Фареуса-Линдквиста, о котором упоминалось выше.

Задав в математической модели в качестве входных параметров значения длины сосуда, радиуса сосуда и градиента давления, были рассчитаны ожидаемые значения скорости кровотока и изменение объемного потока. Как видно из таблицы 3.2, мы получили достаточно близкое совпадение данных величин. Среднее значение отклонений скорости и потока составило порядка 6% и 7%, соответственно. Для расчетов в модель был также введен параметр удельной податливости. Данная величина была выбрана в соответствии с работой [186], в которой моделировался артериальный кровоток в сосудах мыши.

Заметим, что податливость сосудистой стенки (от англ. “Compliance” – податливость) [219] характеризует эластичность сосудов, способность их к растяжению. С возрастом значение общей артериальной податливости уменьшается, в то время как артериальное сопротивление увеличивается [220]. Величину податливости можно определить как изменение объема (dW) в результате изменения давления, в соответствии с формулой (3.23)

$$C = dW/dP. \quad (3.23)$$

В такой формулировке этот параметр описывает реакцию на давление всего участка сосуда, заключенного между точками задания давления, и измеряется в мл/мм рт.ст. При расче-

Таблица 3.2: Сравнение значений параметров, измеренных в результате эксперимента *in situ* на ХАО и полученных в результате математического моделирования.

Образец	1		2		3	
Параметры	заданные	вычисленные	заданные	вычисленные	заданные	вычисленные
Радиус, мм	0.060 ^a	0.061 ^u	0.037 ^a	0.038 ^u	0.017 ^a	0.017 ^u
Длина, мм	0.556 ^a	–	0.926 ^a	–	0.314 ^a	–
Вязкость, мм рт.ст. · с	3e-5 ^b	–	3e-5 ^b	–	4e-5 ^b	–
Скорость, мм/с	0.603 ^a	0.559 ^u	0.354 ^a	0.322 ^u	0.128 ^a	0.126 ^u
Градиент давления, мм рт.ст.	0.020 ^d	–	0.050 ^d	–	0.040 ^d	–
Поток, мм ³ /с	0.00697 ^c	0.00627 ^u	0.00159 ^c	0.00142 ^u	0.000127 ^c	0.000127 ^u
α_e	0.1 ^m	–	0.1 ^m	–	0.2 ^m	–
Податливость, мм ² /мм рт.ст.	0.0002 ^m	–	0.00012 ^m	–	0.000003 ^m	–
κ_a	0.45 ^m	–	0.60 ^m	–	0.00 ^m	–

^a – экспериментально измеренные данные, ^b – типичные данные по статьям, учебникам и монографиям, ^c – рассчитано на основе соотношения $J = v\pi r^2$, ^d – рассчитано на основе закона Пуазейля, ^u – вычисленные данные в результате мат. моделирования, ^m – значения параметров, заданные в модели

те податливости в погонных единицах, на единицу длины, ее размерность иная, например – мм²/мм рт.ст. Это обстоятельство важно учитывать при анализе литературных данных. Зависимость податливости на единицу длины от давления показана в работах [186, 221]. В работе [222] приведены значения податливости и сопротивления, используемые при построении 4-элементной модели типа Windkessel.

Группа параметров регуляции сосудистого тонуса описывает как пассивную, так и активную регуляцию сосудистого тонуса. Эти параметры модели обобщенно описывают целый набор путей регуляции, и их количественная оценка возможна лишь приближенно. Так, параметры τ_e и τ_m модели определяют характерное время реакции клеточных механизмов эндотелия и гладкой мускулатуры на изменение условий, соответственно. Так, типичное время реакции сосуда на изменение давления может составлять от нескольких секунд до нескольких десятков секунд. Реакция на изменение скорости кровотока (изменение сдвигового напряжения) еще более медленна, так как включает дополнительный этап активации клеток эндотелия сосуда. Мы принимаем этот параметр τ_e равным ≈ 20 с, что в итоге дает общее время реакции сосуда в 1-1.5 минуты, что соответствует физиологическим данным по эффекту FMD (flow-mediated dilation) [30]. Значения оставшихся параметров модели K_e , α_e , K_m и κ_a затруднительно оценить непосредственно, их величина оценивается по результирующему действию на авторегуляцию сосудистого тонуса.

На основе приведенного анализа литературных данных и собственных оценок, нами был составлен опорный набор параметров, который и использовался для вычислительных экспериментов. Он приведен в таблице 3.3.

Таблица 3.3: Типовой набор параметров модели.

Название	Размерность	Значение размерное	Значение безразмерное
L	мм	5.0	–
r_0	мм	0.1	–
τ_r	с	8	1.0
τ_e	с	20	2.0
K_e	мм/с	5	0.55
τ_m	с	10	2.0
p_{max}	мм рт.ст.	100	100
α_e	б/р	0	–
k_a	б/р	0	0
α_{neuro}	б/р	0	–
K_m	б/р	0.1	1.0
p_a	мм рт.ст.	30	–
p_v	мм рт.ст.	29.9	–
η	мм рт.ст. · с	3e-5	–
c	мм ² /мм рт.ст.	0.00077	–
κ_a/κ_e	б/р	0.1	1.0

3.2 Реакция одиночного сегмента на тестовый сигнал

Безразмерный вариант разработанной модели тестировался в форме одиночного сегмента с целью лучшего понимания того, как наличие путей активной регуляции проявляет себя в сравнении со случаем “просто эластичной трубки”.

В качестве тестового сигнала использовалась величина давления на входном (со стороны артерий) терминале сегмента. Реакция модели на такой резкий перепад входного давления с одной стороны, имеет очевидный аналог в терминах физиологического эксперимента, а с другой – соответствует анализу переходной характеристики в радиотехнике, что является стандартным методом анализа линейных систем.

Другой вид оценки реакции сосуда – медленный подъем входного давления (т.н. “ramping”), дает информацию о стационарном состоянии модели, после затухания переходного процесса. Результаты обоих этих тестов описаны ниже.

На рисунке 3.5 приведены графики изменения давления p (слева) и радиуса сегмента r (справа) в ответ на мгновенный скачок входного давления p_a в момент времени $t = 10.0$ (переходная характеристика). Цифры 1, 2, 3, 6 и 10, обозначающие кривые на обеих панелях, соответствуют величине скачка давления от начального нулевого уровня. Пунктиром даны графики для случая отключенной активной регуляции $m = 0$ в (3.19) и (3.20), а сплошными линиями – для набора параметров, указанных в таблице 3.3.

Как можно видеть, графики изменения давления p в сегментах совпадают в обоих случаях, причем процесс его установления гораздо быстрее, чем процесс подстройки радиуса сосуда.

Отметим, что в силу структуры модели (сегмент однороден, а давление приписывается его центру) достигаемое стационарное значение p всегда равно среднему от давлений на входе p_a и выходе p_v . По этой причине, ниже анализируется преимущественно характер реакции радиуса сегмента.

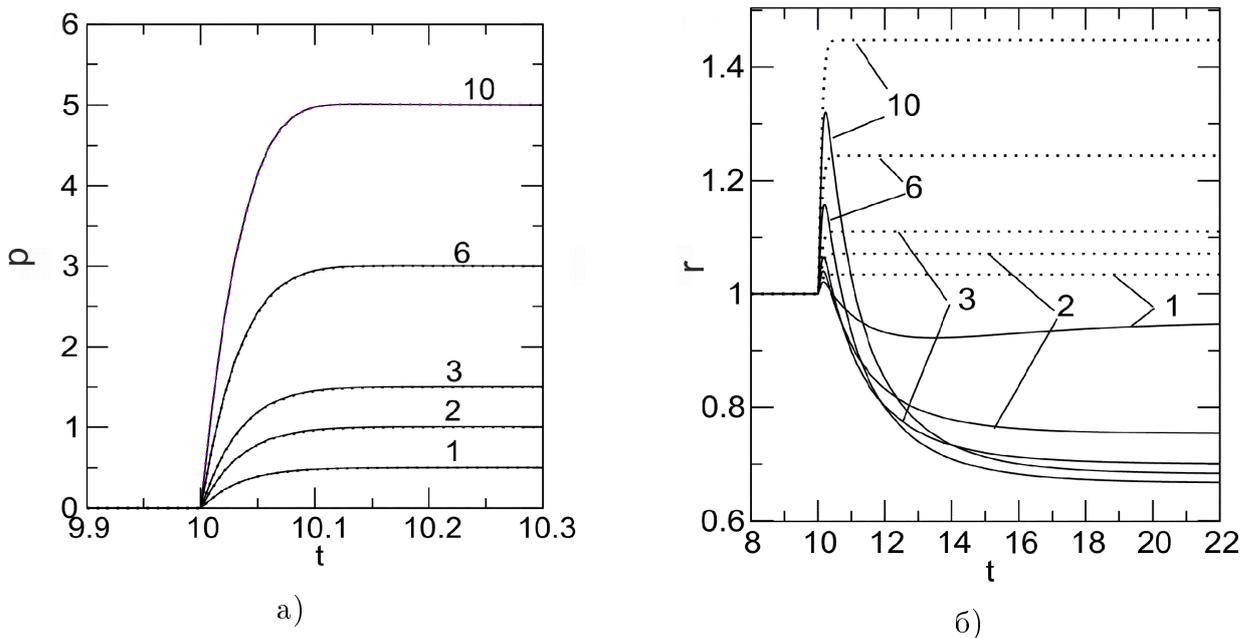


Рисунок 3.5: Изменение давления а) и изменение радиуса б) в ответ на скачок входного давления. Цифры 1, 2, 3, 6 и 10 на панелях а) и б) соответствуют величине скачка давления от начального нулевого уровня. На панели б) пунктиром обозначено изменение радиуса без активной регуляции, сплошными линиями – в условиях активной регуляции.

Графики же изменения радиуса сосуда r существенно различаются в указанных случаях. При выключенной активной регуляции радиус стабилизируется примерно одновременно с давлением и его величина монотонно растет с ростом p (пунктирные линии). Включение активной регуляции существенно меняет реакцию модели. Можно видеть, что даже при небольшом скачке входного давления (кривые 1, 2) величина r после короткого всплеска стабилизируется на значении меньше единицы, причем для кривой 1 можно выделить минимум и максимум – процесс установления носит характер единичного затухания. Увеличению скачка входного давления (кривые 3, 6, 10) соответствует рост пикового значения r и немонотонное уменьшение достигаемого стационарного уровня.

В целом, график на рисунке 3.5 демонстрирует выраженный нелинейный характер отклика радиуса сегмента при включенной его активной регуляции, в то время как по графику давления это поведение диагностировать практически невозможно.

Рисунок 3.6 показывает, что происходит при медленном повышении уровня давления p_a при ($p_v = 0$), отложенного по горизонтальным осям обеих панелей, левая из которых а) показывает изменение стационарного значения радиуса r , а правая б) – соответствующего ему среднего потока сегмента $j_a = (j_{in} + j_{out})/2$. Кривые пронумерованы следующим образом: 1) отсутствие активной регуляции ($m = 0$), 2) $K_m = 10.0$, 3) $K_m = 0.5$, 4) $K_m = 0.3$.

Величина K_m задает чувствительность изменения активности клеток гладкой мускулатуры к росту давления p , причем большее значение соответствует меньшей чувствительности.

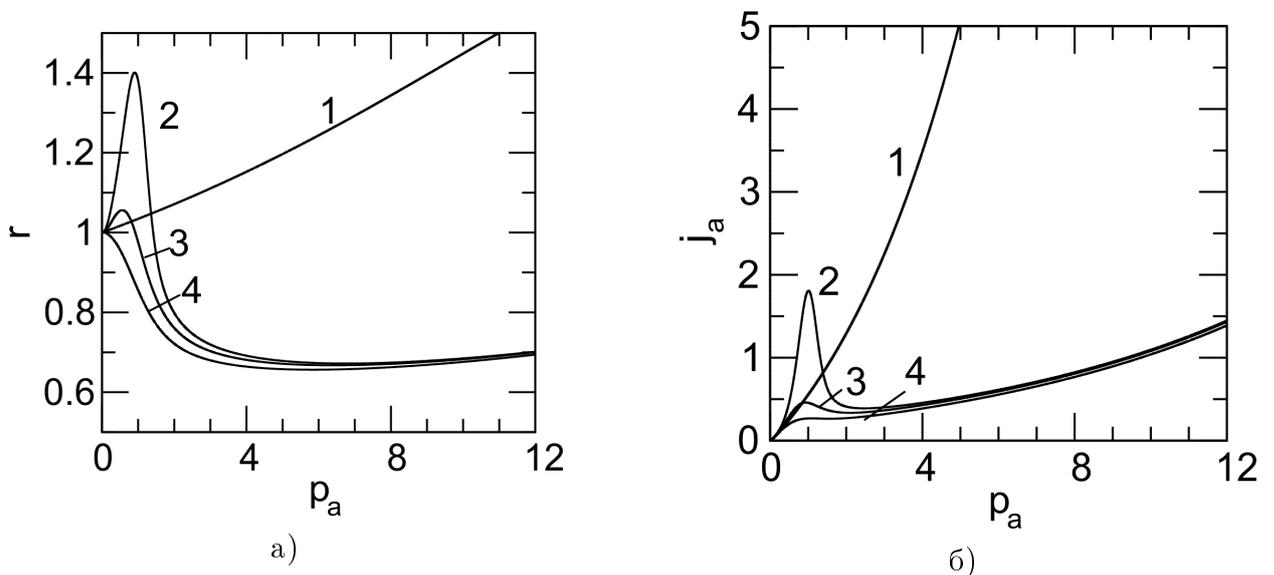


Рисунок 3.6: Авторегуляция в действии. Изменение стационарных значений радиуса а) и потока б) в сегменте с ростом давления. Кривая 1 соответствует значениям радиуса и потока в отсутствии активной регуляции, Кривые 2, 3, 4 – в условиях активной регуляции, при значениях параметра $K_m = 10.0, 0.5, 0.3$, соответственно.

Как можно видеть из рисунка 3.6, при выключенной регуляции и радиус, и поток монотонно растут с ростом p_a (кривая 1). При $K_m = 10.0$ росту p_a на начальном участке отвечает значительный (до $r \approx 1.4$) рост радиуса и вместе с ним – потока, однако уже при $p_a \approx 1$ рост сменяется спадом и последующей стабилизацией радиуса на величии около 0.7. Поток при этом продолжает расти, в силу роста давления, но значительно слабее, чем в случае без активной регуляции. Уменьшение K_m делает такое поведение еще более выраженным, при $K_m = 0.3$ начального пика значений радиуса и потока не наблюдается вовсе.

В целом, описанная выше реакция модельной системы на рост входного давления хорошо соответствует описанным в литературе типичным реакциям резистивных сосудов [2]. В частности, уменьшение радиуса сосуда по сравнению с его начальным значением в ответ на

рост давления является классическим проявлением действия миогенного механизма, особенно сильно выраженного, например, в почке или сосудах сетчатки глаза [26] и служит целью стабилизации интенсивности кровоснабжения органа при различных состояниях организма.

3.2.1 Динамика авторегуляции диаметра сосуда во времени: комбинированный отклик на давление и поток

Для размерной формы модели неразветвленного сегмента сосуда был выбран набор параметров, адекватный малой артерии диаметром 0.2 мм, см. таблицу 3.3.

Исследование временной динамики сегмента сосуда отражено на рисунке 3.7. Заметим, что для модели одиночного сегмента давление в его центральной точке всегда устанавливается равным среднему от заданных давлений на его концах, и потому график давления не несет значимой информации. По этой причине, при анализе вычислительных экспериментов ориентировались прежде всего на изменение радиуса сосуда r .

На рисунке 3.7 а) приведены графики изменения радиуса сосуда, рассчитанные на интервале времени 200 секунд в условиях отключенной эндотелиальной регуляции, за которую отвечает параметр модели α_e . При этом параметр k_a , устанавливающий общий вклад мышечной регуляции в тонус сосуда, изменялся в широких пределах, как отображено в обозначении каждого графика.

Как можно видеть из вставки, укрупненно показывающей начало эволюции, радиус сосуда за доли секунд увеличивается приблизительно на 50% от исходного состояния, от 0.1 мм до примерно 0.15 мм. На этом этапе миогенная регуляция еще не успевает включиться, и процесс не зависит от значения k_a .

На временах более 0.2 с радиус начинает уменьшаться, так как миогенная регуляция направлена на противодействие расширяющему действию трансмурального давления. При характерном времени реакции миогенного механизма $\tau_m = 20.0$ радиус достигает стационарного значения на временах порядка 50 секунд. Как можно видеть, при значении $k_a = 0.5$ в итоге устанавливается примерно то же значение радиуса, что и было до подачи давления, $r \approx r_0$. Таким образом, при таком значении параметра k_a имеет место практически полная стабилизация радиуса в ответ на прирост давления. Заметим, что стабилизация радиуса не означает стабилизацию потока, который остается пропорциональным увеличивающемуся перепаду давлений на концах сегмента.

На рисунке 3.7 б) показаны результаты вычислительного эксперимента, для которого при выбранном значении миогенного параметра $k_a = 0.6$ последовательно увеличивался вклад

эндотелиальной регуляции, что задавалось увеличением параметра α_e от 0 до 0.28. При этом, радиус сосуда все сильнее реагирует на повышение линейной скорости потока крови. Как можно видеть из рисунка, этот процесс отражается относительно медленным ростом r на временах $t > 25$ с. В итоге, эндотелиальный механизм реакции на скорость потока может полностью скомпенсировать реакцию на рост трансмурального давления.

При значениях $k_a = 0.6$, $\alpha_e = 0.15$ итоговый радиус сосуда повышается на $\approx 10\%$, что соответствует литературным данным влияния эндотелиальной регуляции на состояние кровеносных сосудов.

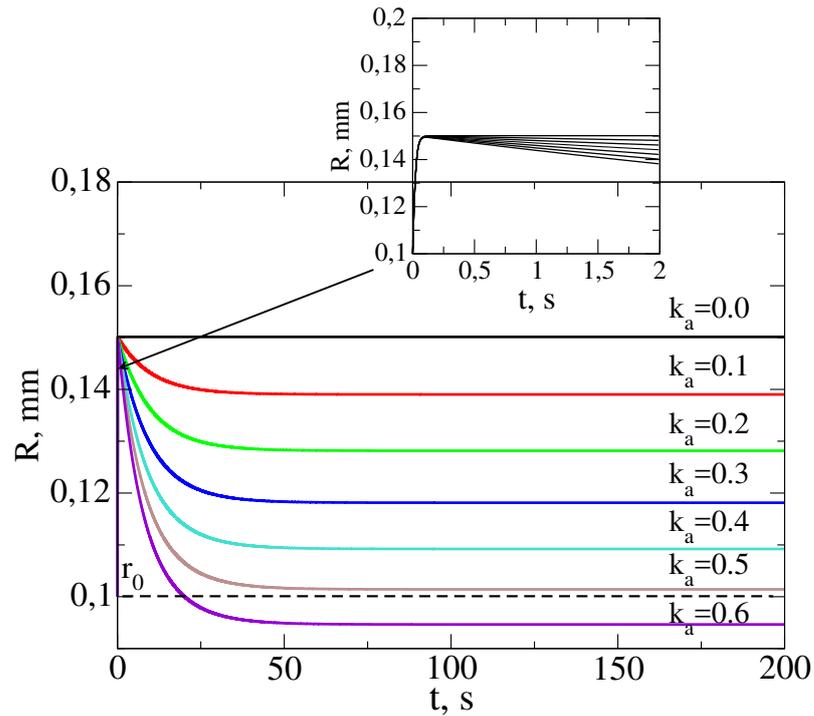
3.2.2 Действие эндотелиального механизма при пульсациях кровотока

В экспериментах на ХАО куриного эмбриона зачастую наблюдалась значительная степень пульсаций кровотока, включая режимы с противотоком, при которых средняя скорость дрейфа форменных тел крови мала, в то время как средний модуль линейной скорости кровотока остается высоким (см. Глава 2, раздел 2.3, рисунок 2.6). Очевидно, что эти режимы могут сильно различаться с точки зрения реакции сосудистой стенки. А именно, различия в результирующем среднем сдвиговом напряжении должны приводить к различной степени активации сосудодвигательных реакций посредством эндотелиальных клеток. Наличие соответствующей цепи регуляции в математической модели позволяет провести вычислительный эксперимент с целью воспроизвести данный эффект, что и описано ниже.

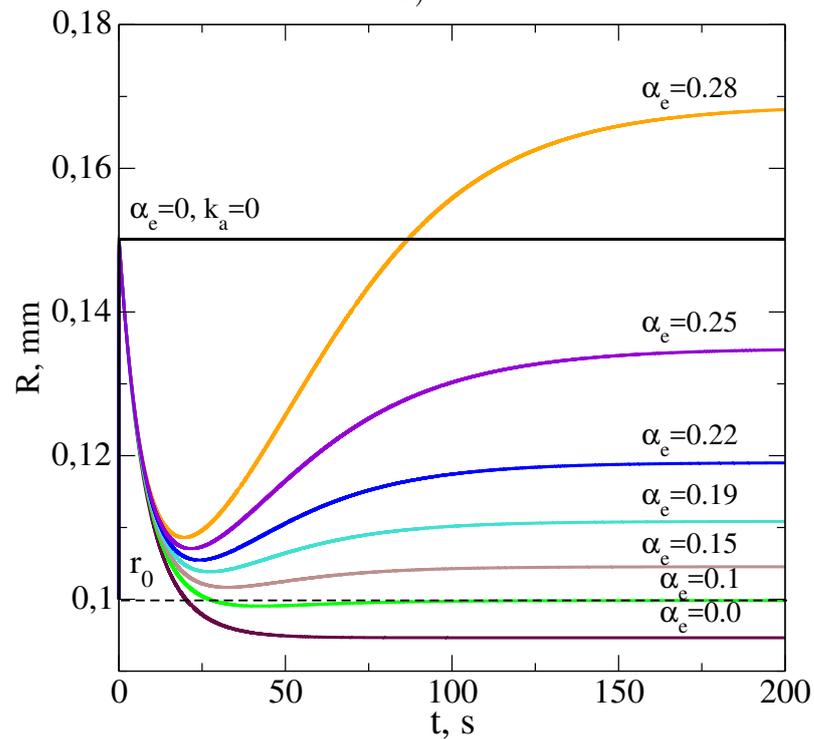
Протокол вычислительного эксперимента был следующим:

1. До времени $t = 5$ с оба механизма регуляции отключены, сосуд “пассивно” реагирует на приложенное давление увеличением радиуса;
2. С $t = 5$ с до момента времени $t = 100$ с устанавливается стационарное значение радиуса сосуда в соответствии с действием механизмов его активной регуляции.
3. В момент $t = 100$ с включаются пульсации кровотока, для чего входное давление модулируется по гармоническому закону, при этом управляющим параметром является относительная (безразмерная) глубина пульсаций x по отношению к начальному давлению.

На рисунке 3.8 можно видеть, что при небольшом значении глубины пульсаций ($x = 0.1$) результирующий поток оказывается промодулирован по скорости, но не меняет своего направления. При значительной глубине пульсаций ($x = 0.5$) появляются моменты, когда давление на входе модельного сегмента сосуда ниже, чем на его выходе, в результате чего поток меняет свое направление.



а)



б)

Рисунок 3.7: Временная динамика изменения радиуса сосуда в ответ на приложенную миогенную и эндотелиальную регуляцию. Пунктиром отмечено начальное положение радиуса. Линия черного цвета соответствует радиусу при деактивации регуляции, $k_a = 0.0$, $\alpha_e = 0.0$. (а) Сосудистый ответ на миогенную регуляцию; (б) Сосудистый ответ на миогенную и эндотелиальную регуляцию, при $k_a = 0.6$, $\alpha_e = 0.0$, 0.1, 0.15, 0.19, 0.22, 0.25, 0.28.

В таблице 3.4 приведены значения радиусов и потоков, а также процентное изменение этих величин к моментам времени $t=100$ секунд и $t=300$ секунд, что соответствует постоянному уровню до включения пульсаций и после для обеих панелей рисунка 3.8. Небольшие пульсации, панель I, приводят к уменьшению радиуса сосуда на 4%, при этом на 24% уменьшается скорость объемного потока. На наличие более существенных пульсаций (панель II) радиус сосуда отвечает противоположной реакцией и увеличивается на 3%. С точки зрения физиологии данную реакцию можно связать с ростом среднего значения напряжения сдвига при пульсациях кровотока и последующей реакцией эндотелиальных клеток с выделением NO и расслаблением сосудистых стенок. Поток в данном случае увеличивается на 24%, через сосуд проходит больший поток крови по сравнению с наличием небольших пульсаций.

Таблица 3.4: Значения параметров при пульсациях кровотока

Панель	R_{100} , мм	R_{300} , мм	ΔR , %	F_{100} , мм ³ /с	F_{300} , мм ³ /с	ΔF , %
I	0.117	0.112	- 4	0.041	0.031	- 24
II	0.117	0.121	3	0.041	0.051	24

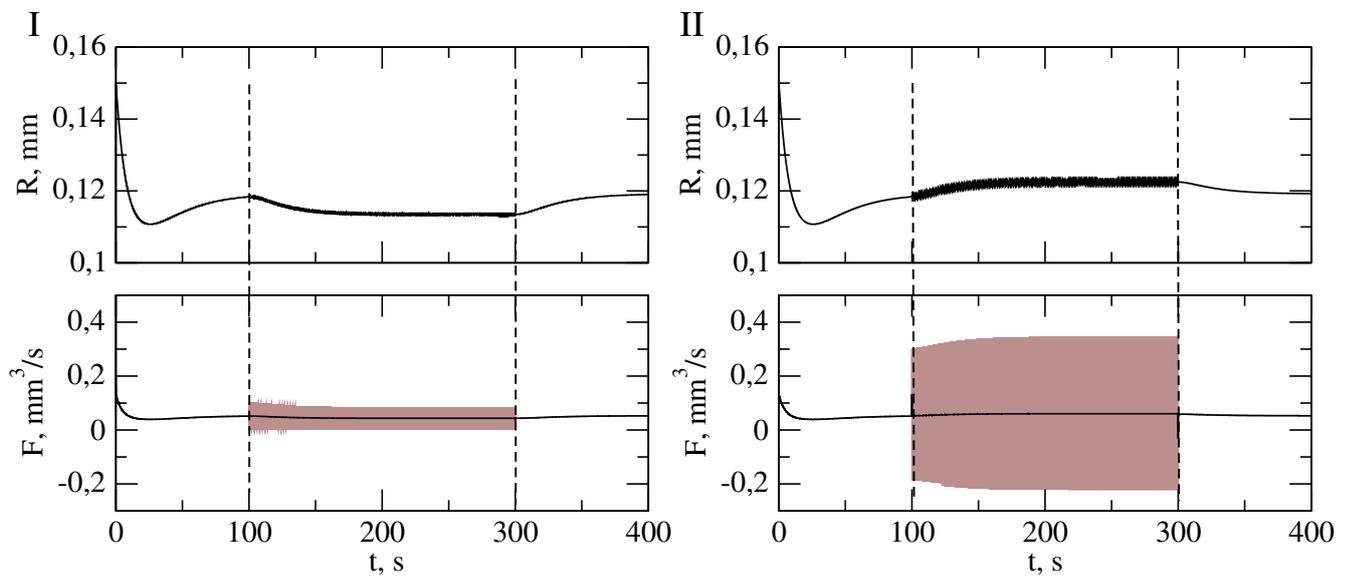


Рисунок 3.8: Временная динамика изменения радиуса и потока сосуда в ответ на приложенную пульсацию различной силы. Пульсации находятся в активном состоянии в интервале времени между 100 и 300 секундами. I) Слабая пульсационная активность, $x=0.1$. II) Сильная пульсационная активность, $x=0.5$.

3.3 Эффекты перераспределения кровотока в Y – бифуркации сосуда

В данном разделе описан вычислительный эксперимент, имитирующий перераспределение кровотока при окклюзии одного из сосудов, образующих Y-бифуркацию: модельная сеть состояла из трех сосудов, одного материнского и двух дочерних. Ранее, во второй главе диссертационной работы были приведены результаты эксперимента по лазерному воздействию на сеть ХАО куриного эмбриона и проанализировано изменение потоков после воздействия, рисунок 2.14. Интересной особенностью результатов эксперимента было увеличение входящего потока в результате воздействия (сосуд номер 1), рисунок 2.14,г,д. Такой эффект можно объяснить либо уменьшением общего сопротивления исследуемых сосудов, либо увеличением перепада давлений, в том числе за счет изменений состояния сети выше либо ниже по потоку. Заметим, так как в эксперименте кровоток поддерживается работой сердца эмбриона, его постоянство в ходе измерений не гарантировано.

Тем не менее результаты эксперимента позволяют сформулировать гипотезу, согласно которой рост потока вызван действием эндотелиального механизма, который в нестандартной ситуации – при полном перекрытии одного из дочерних сегментов – настолько увеличивает радиус другого дочернего сегмента, что его сопротивление становится меньше, чем у обоих сегментов в начальном состоянии. Несложные расчеты показывают, что при равных исходных размерах дочерних сосудов необходимое увеличение диаметра составляет около 40%, ($\sqrt{2}-1$ раз), что укладывается в физиологически разумный диапазон изменения для малых артериальных сосудов.

В ходе вычислительного эксперимента была использована модельная сеть из трех сегментов – первый разветвлялся на второй и третий. Общее время расчета динамики составляло 200 секунд, при этом на 100-й секунде сопротивление 3-го сегмента было резко (в 100 раз) увеличено, что служило имитацией окклюзии сосуда. Рисунок 3.9 дает представление о том, как при этом меняются потоки и радиусы сосудов. Так, на панели II видно, что до окклюзии сумма потоков 2 и 3 сегментов равна потоку, проходящему через 1 сегмент ($0.023+0.012=0.035$ мм³/с, соответственно).

После введения окклюзии, поток через 3 сегмент, как и планировалось, упал до нуля, поток, проходящий через 1 сегмент резко сократился, а поток через 2 сегмент немного повысился, и они сравнялись (0.025 мм³/с), что согласуется с типичным поведением в экспериментах, описанных в Главе 2, рисунок 2.10.

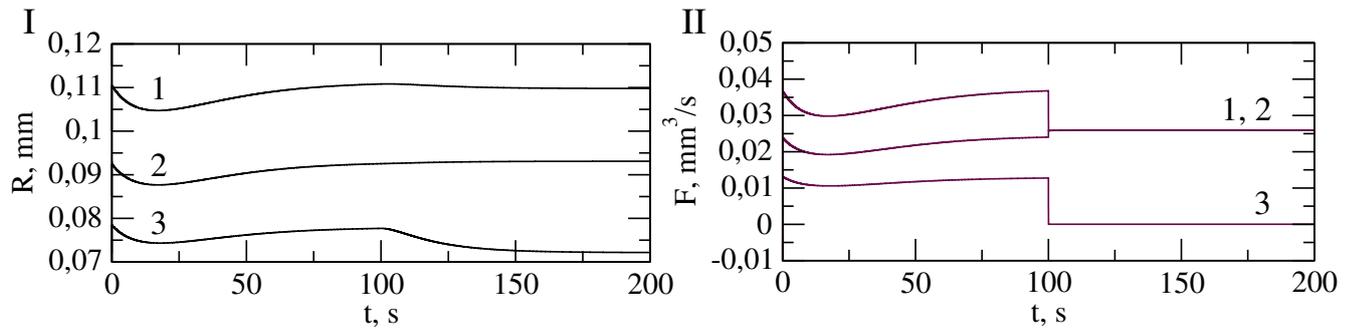


Рисунок 3.9: Характеристика потоков на Y-бифуркации. На 100 секунде эксперимента была активирована окклюзия 3 сегмента. Панель I – изменение радиусов сосуда. Панель II – изменение потоков сосудов.

Графики на рисунке 3.9, панель I, показывают, что радиусы 1 и 2 сегмента незначительно изменились после окклюзии, в то время как радиус 3 сегмента снизился до начального значения. В целом, результаты данного вычислительного эксперимента демонстрируют динамику потоков, ожидаемую для такой простейшей сети, и позволяют считать, что и распределение потоков в более сложных конфигурациях микроциркуляторных сетей будет моделироваться адекватно.

Далее, набор управляющих параметров был подстроен под ситуацию более сильного вклада эндотелиального механизма, рисунок 3.10, панель II. В этом случае картина перераспределения потоков иная. После окклюзии 3-го сегмента, происходит настолько значительное увеличение потока во второй дочерний сегмент, что оно активирует эндотелиальный механизм, который увеличивает его радиус и, следовательно, поток. На увеличение размера дочернего сосуда система отвечает адекватным увеличением входящего потока, что дополнительно активирует эндотелиальный механизм в первом сегменте, увеличивая и его поток. Таким образом, система трех сегментов сосудов в ответ на окклюзию одного из сегментов переходит в новое состояние, при котором уменьшение потока за счет окклюзии одного из дочерних сегментов полностью скомпенсировано перестройкой двух других сегментов.

3.4 Особенности действия эндотелиального механизма в малой сети сосудов

Данный раздел содержит описание результатов модельного исследования реакции малой (14 сегментов) микроциркуляторной сети на изменение состояния (окклюзию) одного из входящих в нее сосудов.

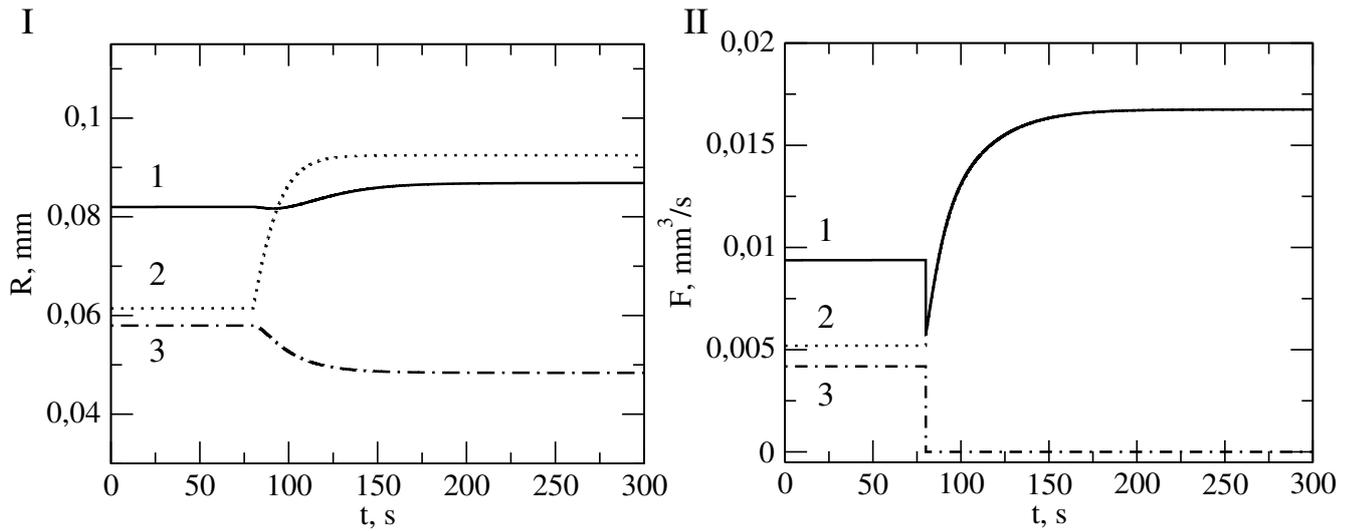


Рисунок 3.10: Характеристика потоков на Y-бифуркации. На 80 секунде эксперимента была активирована окклюзия 3 сегмента. Панель I – изменение радиусов сосуда. Панель II – изменение потоков сосудов.

Целью исследования было оценить возможный вклад эндотелиального механизма в формирование реакции сети как целого, для чего контролировалось изменение сразу всего набора переменных состояния – “спектр радиусов”, или расчетных величин – “спектр потоков”. Также, задачей было не просто изучить поведение отдельно взятого образца сети с заданным набором параметров, а выявить типичные реакции, которые характерны для данной топологии сети.

Для решения указанных задач, вычислительный эксперимент проводился на совокупности 20 различных модельных реализаций сети с одинаковой топологией (7 артериальных и 7 венозных сегментов в виде бинарного дерева), созданных с помощью разработанной в ходе диссертационного исследования программы “VascuNet”, которая более подробно описана в Главе 1. В ходе работы этой программы, ветвление сосудов происходит по алгоритму, основанному на законе Мюррея, но процесс роста сети в целом включает ряд флуктуирующих параметров. Таким образом, каждый запуск программы порождает новую сеть с одной и той же, заранее заданной, топологией, но специфичным набором длин сосудов. Исследованные варианты реализации сети, каждый из которых состоял из 14 сегментов, приведены на рисунке 3.11, где красным и синим цветом выделены артериальная и венозная части, соответственно.

Как можно видеть, имеется существенная вариабельность в относительных длинах сегментов. На рисунке 3.12 приведена детализация первого из показанных вариантов сети по

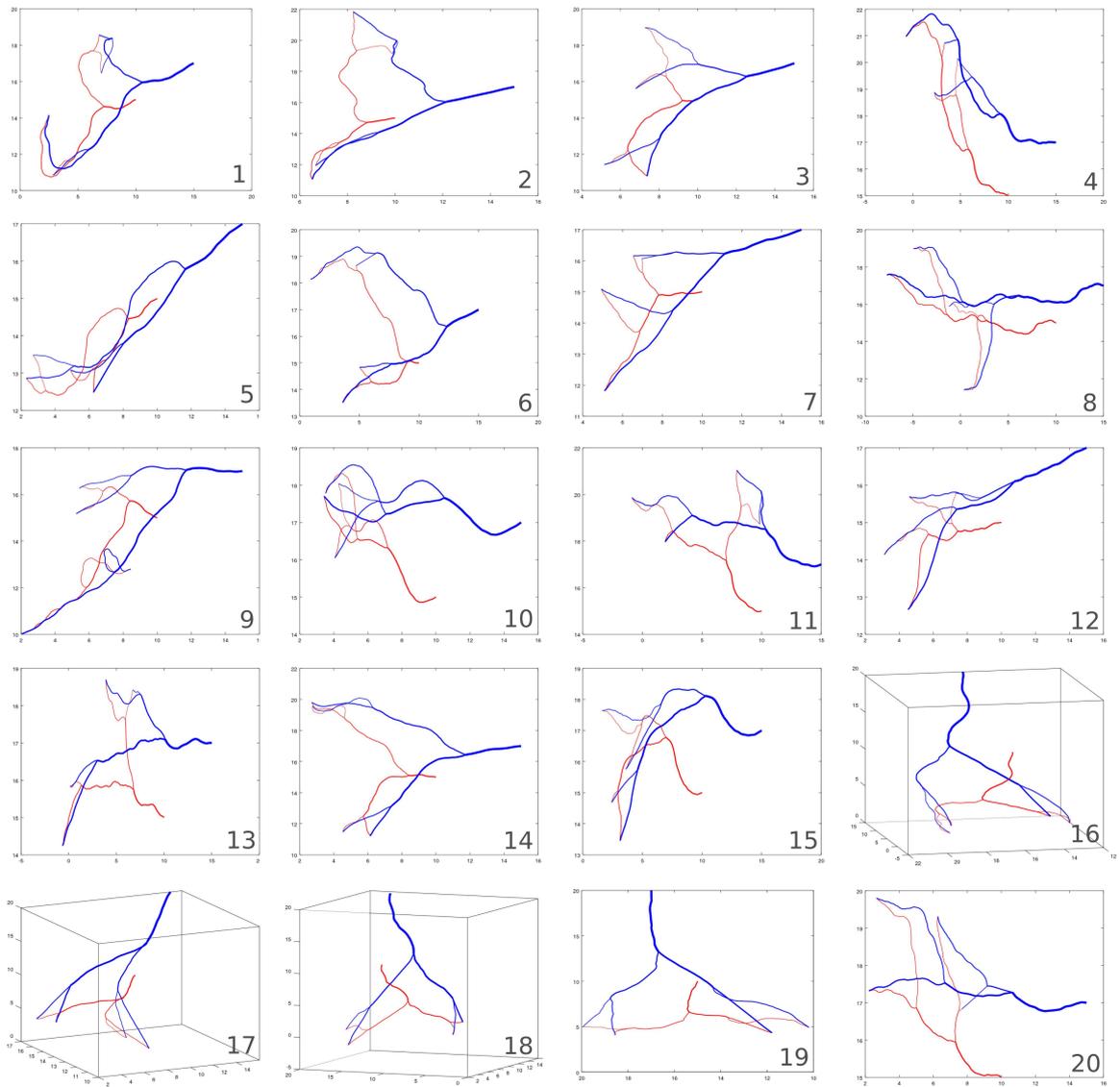


Рисунок 3.11: Вариации построения малой сосудистой сети. По осям каждой панели отложены пространственные координаты.

сегментам, а также указано расположение артериального (АТ) и венозного (VT) терминалов, для которых задавались условия постоянного давления.

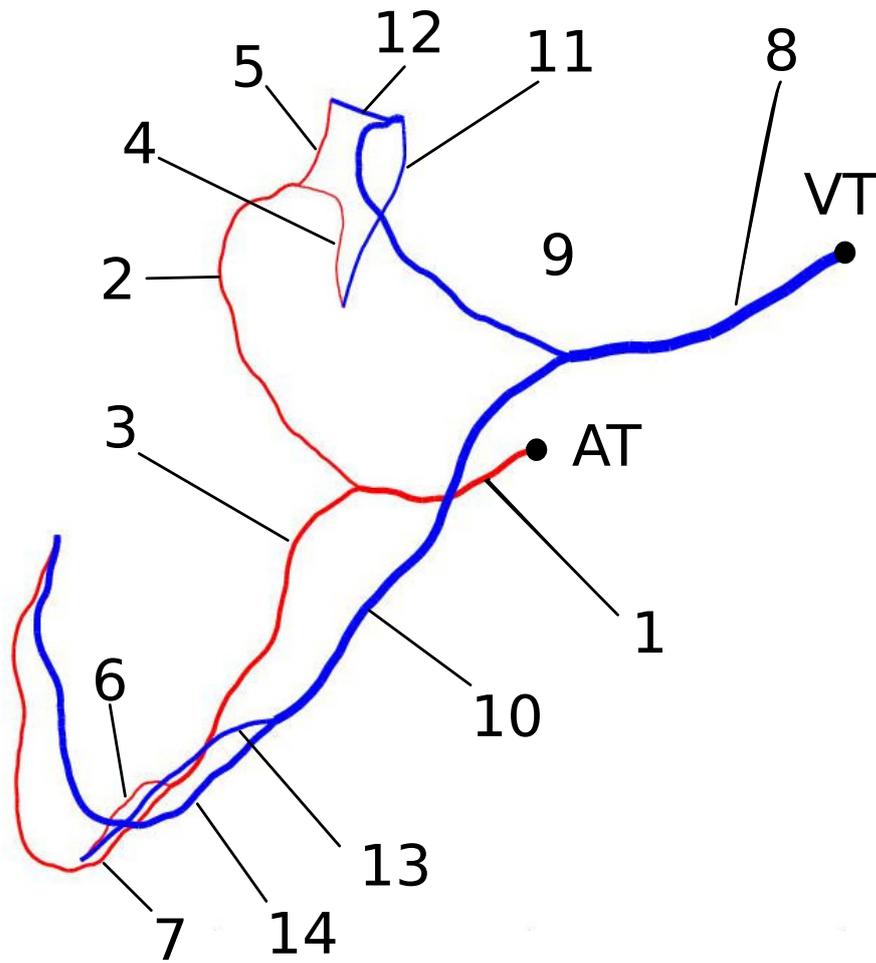


Рисунок 3.12: Детализация сегментов варианта 1 модельной сосудистой сети. Аббревиатурами АТ и VT обозначены артериальный и венозный терминалы, соответственно.

Заметим, что при моделировании работы сети, после подачи давления на артериальный и венозный терминалы, диаметры сегментов перестают быть одинаковыми для разных реализаций сети, так как они зависят от трансмурального давления, а также от текущего вклада в сосудистый тонус миогенного и эндотелиального механизмов регуляции.

В ходе вычислительных экспериментов было исследовано изменение диаметров и величины потока в сегментах в ответ на окклюзию 5-го (артериального) сегмента при действующих цепях миогенной и эндотелиальной регуляции. А именно, как и ранее для одиночного сегмента, для артериальной части сети фиксировались и сопоставлялись следующие последовательности состояний:

Состояние I: В первые секунды после того, как подано давление на артериальный и венозный терминалы. При этом, потоки и распределение давлений установились соответственно закону Пуазейля, в то время как миогенный и эндотелиальный механизмы еще не успели активироваться;

Состояние II: К моменту $t = 25\text{с}$ активировался миогенный механизм, увеличивающий сосудистый тонус сегмента сети при росте давления в нем;

Состояние III: К моменту $t = 100\text{с}$ дополнительно активировался более медленный, чем миогенный, эндотелиальный механизм, направленный на увеличение диаметра сосуда в случае большой линейной скорости кровотока в нем;

Состояние IV: После достижения состояния III была смоделирована окклюзия 5-го сегмента сети путем 1000-кратного увеличения его сопротивления, достигнутое новое состояние считывалось после периода подстройки сети к новому распределению радиусов и потоков при $t = 200\text{с}$.

3.4.1 Эволюция состояния выбранной реализации сети

Проиллюстрируем переходы между указанными состояниями сначала для выбранного (верхнего правого на рисунке 3.11) варианта реализации сети. На рисунке 3.13 показан спектр нормированных на начальное состояние радиусов сегментов, рассчитанный для всех четырех описанных выше состояний.

Как можно видеть, распределение потоков в состоянии I характеризуется увеличением радиуса всех сегментов (панель а) рисунка. Так как венозная часть сети в вычислительных экспериментах играла роль пассивного “буфера”, позволяющего задать венозное давление в единственной точке AV, в дальнейшем мы ограничимся обсуждением артериальной части.

После активации миогенной регуляции все сегменты сети показали уменьшение радиуса, панель б), в итоге (при использованном наборе параметров), многие сосуды даже сузились относительно исходного состояния без давления.

В состоянии III (панель в), когда сработала и эндотелиальная регуляция, состояние сети III оказалось близким к I, при некотором уменьшении радиуса двух наиболее крупных сосудов.

Окклюзия 5-го сегмента наиболее заметно отразилась в изменении диаметра непосредственно того сегмента на который воздействовали, панель г).

Соответствующие изменения потоков оказались намного более выражены, они показаны на рисунке 3.14 для этой же реализации сети. Видно, что вклад миогенной регуляции уменьшает общий поток через сеть, панель б), что согласуется с направленностью данного механизма регуляции. Эндотелиальный механизм наиболее сильно влияет на крупные сосуды сети, увеличивая их поток, панель в).

3.4.2 Вариабельность паттерна реакции в зависимости от выбранной реализации сети

Для того, чтобы выявить особенности вклада миогенной и эндотелиальной регуляции в сетевую динамику, описанный в предыдущем разделе вычислительный эксперимент был выполнен для всех 20 реализаций сети. При этом, для каждого из 7 артериальных сегментов был рассчитан коэффициент вариации c_ν , рассчитываемый как отношение среднеквадратичного отклонения к среднему значению, выраженный в процентах:

$$c_\nu = \frac{SD}{M} 100\%, \quad (3.24)$$

где SD и M – это среднеквадратичное отклонение и среднее значение по 20 реализациям, соответственно. Данная характеристика является де-факто стандартом оценки вариабельности в медико-биологических науках. При этом принято считать, что слабой вариабельности отвечают значения c_ν меньше 10%, средней – от 10 до 20%, и высокой – более 20%.

На этапе генерации различных реализаций исследуемой сети, вариабельностью обладали только длины сегментов. Рассчитанные для них значения c_ν приведены в таблице 3.5 ниже:

Как уже отмечалось выше, при моделировании работы сети, диаметры сегментов перестают быть одинаковыми для разных реализаций сети после подачи давления на артериальный и венозный терминалы, так как они зависят от трансмурального давления, а также от текущего вклада в сосудистый тонус миогенного и эндотелиального механизмов регуляции.

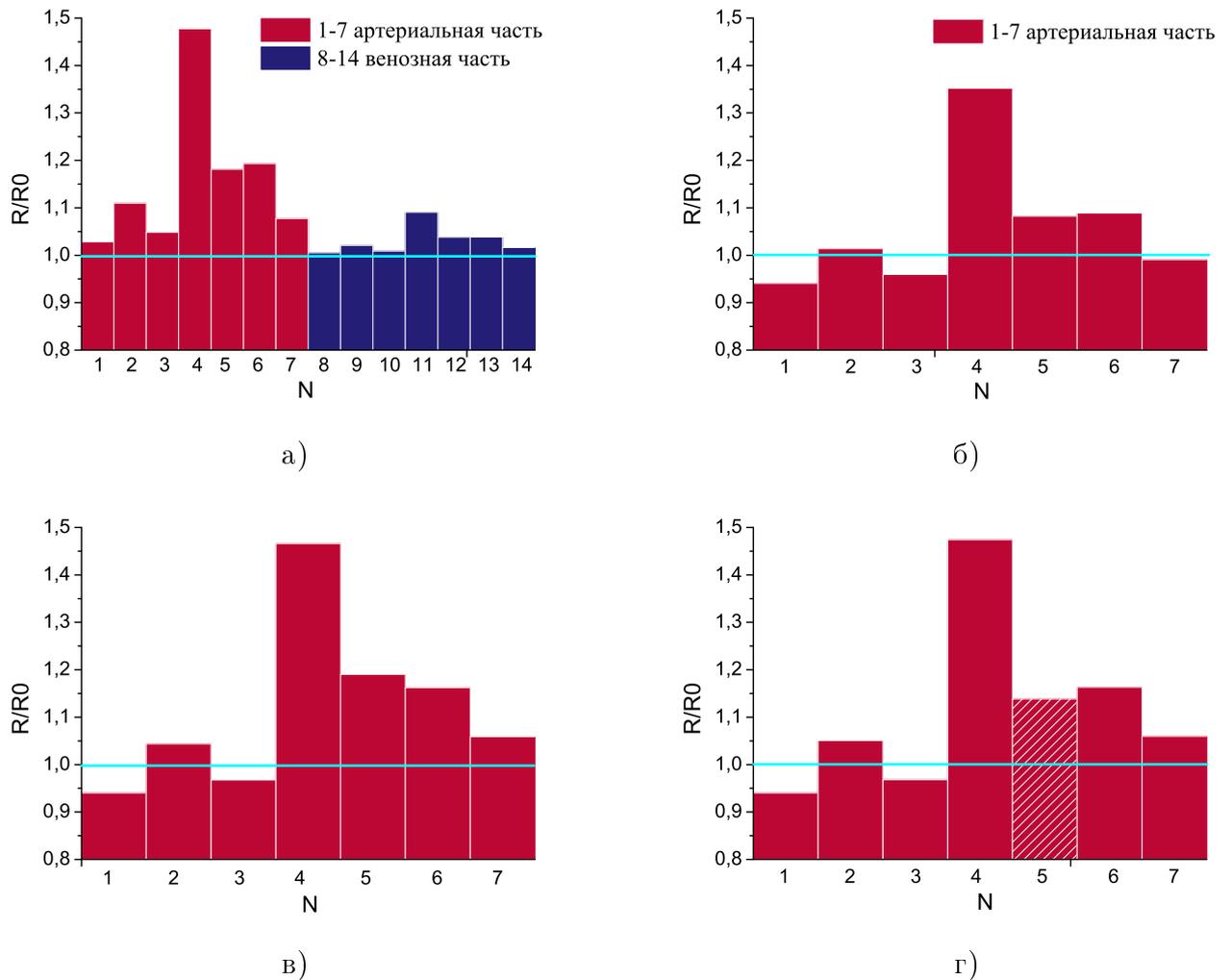
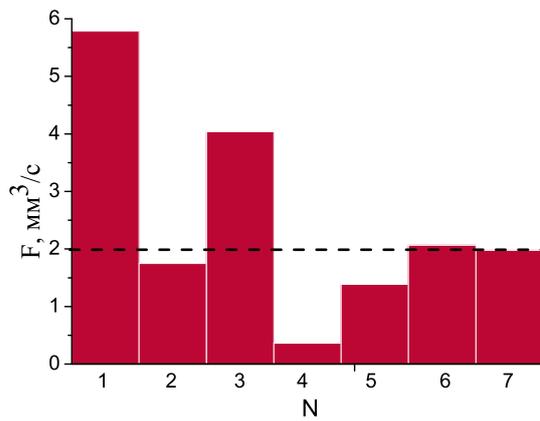
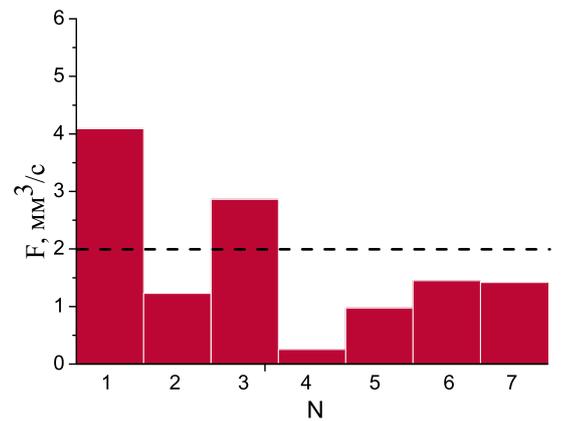


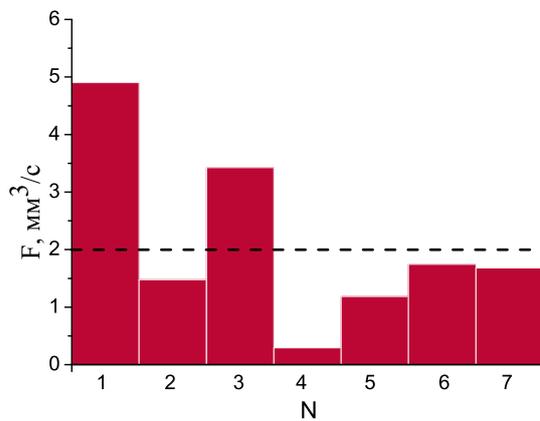
Рисунок 3.13: Относительное изменение радиусов сосудов малой сети (выбранная реализация 1 на рисунке 3.11). По горизонтальной оси – номер сегмента. Голубая линия показывает начальное состояние. а) нормальное состояние. б) ответ на миогенную регуляцию. в) ответ на миогенную и эндотелиальную регуляцию. г) ответ на окклюзию 5 артериального сегмента (отмечен косой линией).



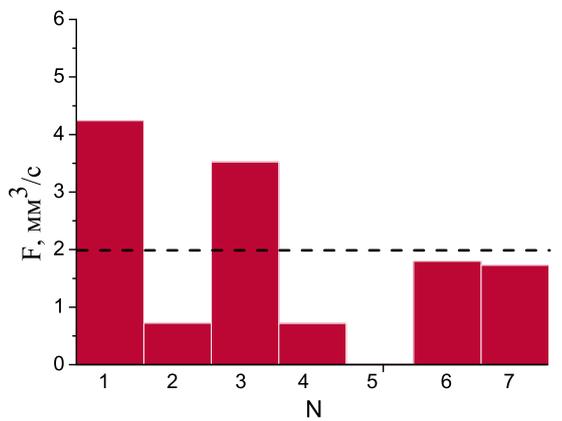
а)



б)



в)



г)

Рисунок 3.14: Изменение потоков в сосудах малой сети. а) Состояние I. б) Ответ на миогенную регуляцию, состояние II. в) Ответ на миогенную и эндотелиальную регуляцию, состояние III. г) ответ на окклюзию 5 артериального сегмента, состояние IV.

Горизонтальная пунктирная линия нанесена для удобства визуализации изменения значений потока.

Таблица 3.5: Значения коэффициента вариации длин артериальных сегментов сети, %

N	1	2	3	4	5	6	7
c_ν	56,8	53,7	39,8	48,4	47,3	61,3	66,4

Таким образом, начальный разброс длин сосудов преобразуется в разброс их диаметров и потоков.

Значения коэффициента вариации для значений радиусов и потоков представлены на рисунке 3.15 а) и б). Из рисунка 3.15 а) видно, что исходные (в состоянии I) значения коэффициента вариации для всех 7 сегментов по всем 20 реализациям малы, менее 0.5% для всех сегментов, и около 1.2% для 4-го сегмента, имеющего наименьший радиус.

Переход к состоянию II на рисунке 3.15 показывает уменьшение вариабельности диаметров всех без исключения сегментов, что укладывается в представления о работе миогенного механизма: увеличение сосудистого тонуса в ответ на рост давления образует петлю отрицательной обратной связи, которая, в среднем, стремится выровнять значения радиусов.

Активация эндотелиального механизма (состояние III), напротив, увеличивает разброс диаметров всех сегментов, кроме 4-го, имеющего наименьший радиус. Причина этого в том, что скорость потока в 4-м сегменте не достигает значений, при которых вклад эндотелиальной регуляции становится существенным. Увеличение разброса диаметров можно объяснить тем, что механизм эндотелиальной регуляции образует петлю положительной обратной связи: увеличенный диаметр сосуда R при прочих равных условиях обеспечивает рост потока пропорционально R^4 , в то время как сечение растёт пропорционально R^2 . Таким образом, большее значение R даёт большую линейную скорость, а значит – больший ответ механизма эндотелиальной регуляции, провоцирующий дальнейшее увеличение R . Таким образом, небольшой начальный разброс радиусов сегментов в состоянии I существенно возрастает в состоянии III. Последующая окклюзия 5-го сегмента слабо влияет на вариабельность радиуса остальных.

Коэффициент вариации потоков, рисунок 3.15 б), имеет изначально высокие значения, но слабо меняется при переходе от одного состояния сети к другому. Большой разброс обусловлен как минимум двумя обстоятельствами. Во-первых, гидродинамическое сопротивление каждого сегмента прямо пропорционально его длине, а значит, начальный разброс потоков (когда радиусы сосудов ещё не изменились) уже будет значительным, как следует из таблицы выше. Во-вторых, согласно закону Пуазейля поток прямо пропорционален изменению ради-

уса в четвертой степени, а значит даже незначительное изменение радиуса может вызвать заметное изменение потока.

Резкий скачок вверх графика для 5-го сегмента обусловлен тем, что при окклюзии поток через него почти обнуляется, что существенно увеличивает вклад различных ошибок счета (деление на почти ноль). Можно отметить также слияние графиков для 4 и 2 сегментов, так как при окклюзии 5-го сегмента через них проходит один и тот же поток.

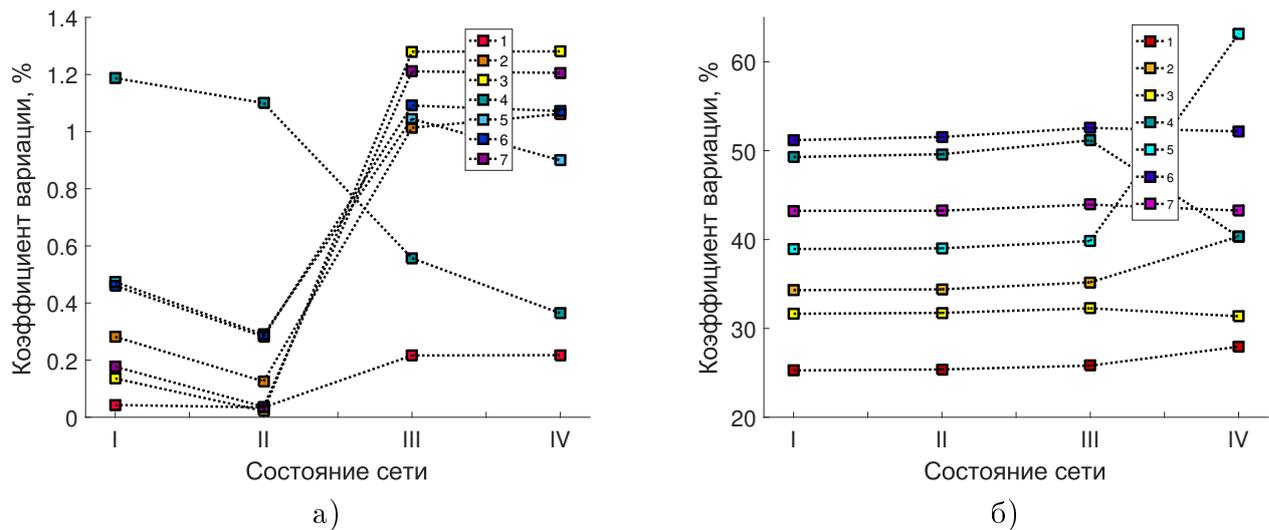


Рисунок 3.15: Статистические данные. Коэффициенты вариации сегментов из набора вариаций малой сосудистой сети для а) радиусов, б) потоков.

В качестве промежуточного итога, описанные выше результаты указывают на то, что эндотелиальный механизм регуляции способен увеличивать изначальный разброс радиусов и потоков по набору реализаций малой сосудистой сети за счет разновеликого увеличения диаметра сегментов. По этой причине, логичным следующим шагом представлялось оценить интегральный результат этого эффекта в виде изменения общего потока в сети, который совпадает с потоком через первый сегмент. С этой целью, фиксировался поток F в сети в состоянии III при различных значениях параметра α_e , задающего степень эндотелиальной регуляции, и рассчитывалось отношение F/F_0 , где за F_0 принималось значение F при $\alpha_e = 0$.

На рисунке 3.16 показано относительное изменение входящего потока (сегмент 1 на рисунке 3.12) при различных значениях α_e для исследуемого набора из 20 реализаций сети, рисунок 3.11. Как можно видеть, при значении $\alpha_e = 0.2$ имеет место небольшое увеличение потока, мало различающееся для большинства реализаций сети (фиолетовые квадраты, нижний ряд на рисунке). Однако при более сильной эндотелиальной регуляции, $\alpha_e = 0.4$, разброс потоков возрастает многократно, из чего следует то, что эндотелиальная регуляция

вносит существенный и различный вклад в изменение состояния каждой из сетей (темно-синие квадраты).

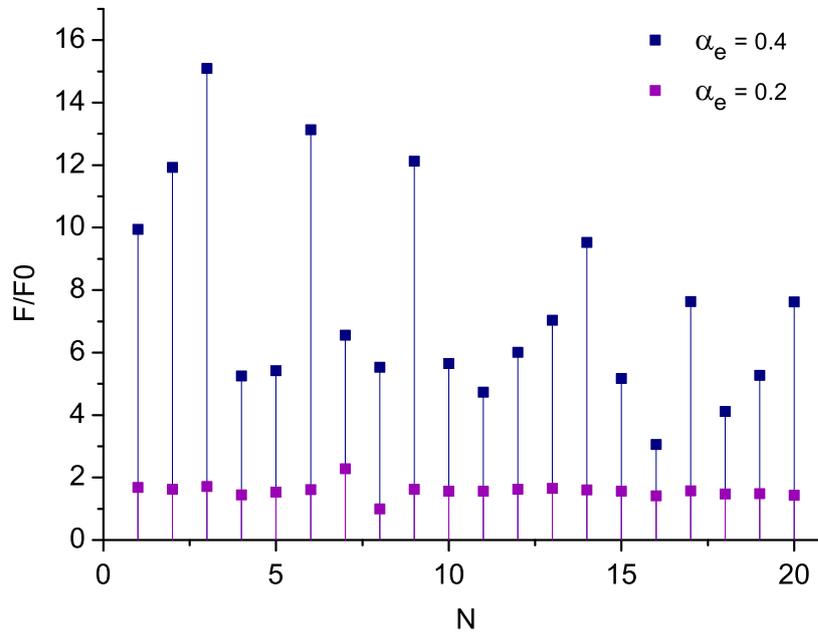


Рисунок 3.16: Моделирование относительного изменения входящего потока в зависимости от эндотелиальной регуляции. $N = 1, 2, \dots, 20$ соответствует набору сетей, рисунок 3.11. Квадраты сиреневого цвета соответствуют значениям относительного изменения потока при $\alpha_e = 0.2$, квадраты синего цвета — при $\alpha_e = 0.4$

На рисунке 3.17 относительное изменение входящего потока показано для четырех избранных реализаций сети в зависимости от величины α_e . До $\alpha_e = 0.3$ входящий поток относительно равномерно увеличивается во всех выбранных сетях. При дальнейшем увеличении α_e наблюдается резкое нарастание потока, а также рост разброса в значениях для конкретных реализаций сетей.

3.4.3 Эндотелиальная регуляция в однородной сети

Как уже отмечалось выше применительно к минимальной сети из трех сегментов сосудов, в результате интенсивной работы эндотелиальной регуляции возможно перераспределение потоков в сосудах таким образом, что через один из сосудов поток перестает идти. Подобный механизм “схлопывания” сосудов был описан [223] для одиночного сосуда, где он обусловлен недостаточной пассивной упругостью сосудистой стенки. Аналогично, в рассматриваемой 14-сегментной сети эндотелиальная регуляция влияет на динамику микроциркуляторной системы по механизму положительной обратной связи. Под действием увеличения

напряжения сдвига происходят процессы, приводящие к расширению сосудов, что в свою очередь вызывает увеличение потока. На увеличенный поток сосуд реагирует еще большим увеличением напряжения сдвига. В результате сосуд, имеющий большую чувствительность, расширяется до своих максимальных размеров, тем самым максимально пропуская поток через себя, что провоцирует обратный процесс в соседних сосудах.

Описанный выше механизм позволяет предположить, что аналогичные эффекты локальной разбалансировки потоков могут иметь место даже в случае полностью симметричной сети, под которой мы понимаем сеть той же топологии, что и рассмотренные выше, но составленную из одинаковых сегментов: одной и той же длины и диаметра. Анализ поведения такого вырожденного случая позволяет наглядно продемонстрировать характер действия эндотелиальной регуляции.

В отдельной серии вычислительных экспериментов было исследовано поведение малой 14-сегментной сети, составленной из сегментов одинаковой длины и диаметра, в условиях различного вклада эндотелиальной регуляции.

На рисунке 3.18 по горизонтали 7 артериальных сегментов расположены в соответствии с их позицией в сосудистом дереве. А именно, в центре находится сегмент 1, через который проходит весь поток. Он делится на сегменты 2 и 3 – справа и слева, соответственно. 5, 4 (справа) и 6, 7 (слева) – дочерние ветви сегментов 2 и 3, соответственно.

Как видно из рисунка, при $\alpha_e = 0 \dots 0.2$ происходит равномерное распределение потоков на каждом уровне ветвления. При $\alpha_e = 0.3$ расходятся величины потоков в парах 4,5 и 6,7, тогда как потоки в ветвях 2 и 3 остаются равными. При $\alpha_e = 0.4$ разбаланс потоков наблюдается уже в паре дочерних сосудов 2 и 3, и к парам 4,5 и 6,7 приходят уже существенно разные потоки. Такой асимметричный режим, начиная со значения $\alpha_e = 0.4$, приводит к значительному уменьшению потока через 2 сегмент что, в свою очередь, восстанавливает симметричное распределение потоков на бифуркации сегмента 2 в сегменты 4 и 5. В то же время, поток через сегмент 3 достиг максимальных значений, что поддерживает и максимальный разбаланс между сегментами 6 и 7.

Таким образом, эндотелиальный механизм регуляции в рассмотренном симметричном сосудистом дереве проявляет себя сложным образом. В зависимости от величины α_e на бифуркациях сосудов наблюдается разбаланс сильных потоков и наоборот, восстановление симметрии в ветвях с уменьшенным кровоснабжением.

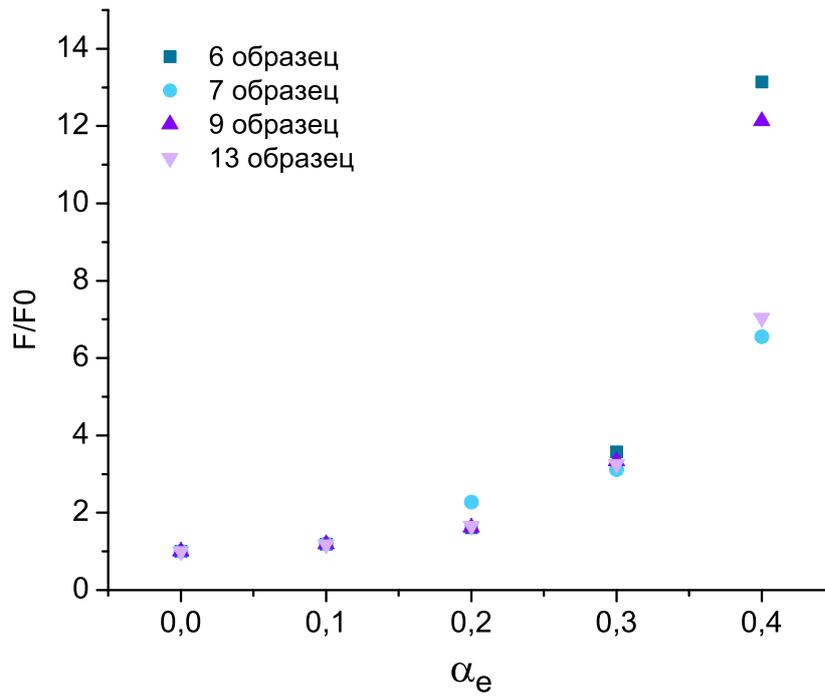


Рисунок 3.17: Моделирование относительного изменения входящего потока в зависимости от эндотелиальной регуляции.

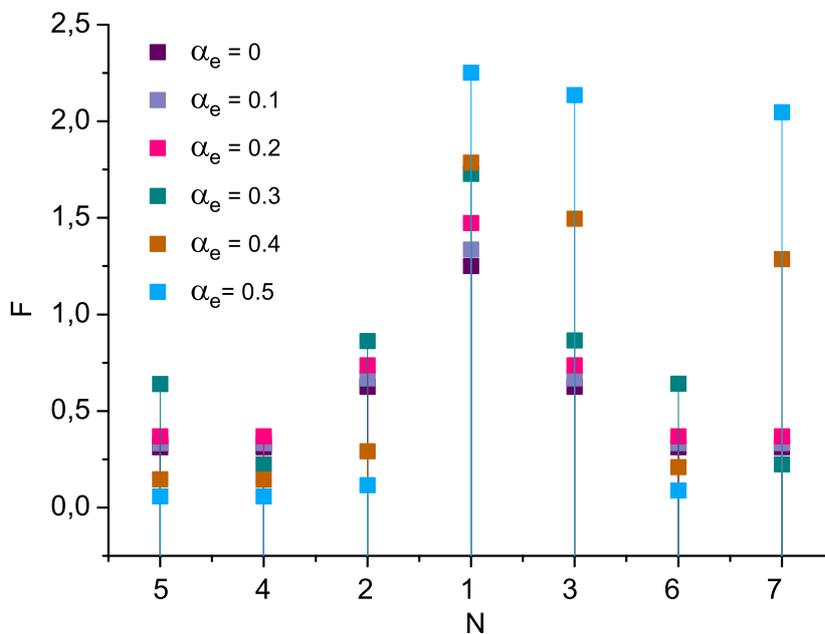


Рисунок 3.18: Моделирование изменения протекающего потока через симметричную сеть в зависимости от силы эндотелиальной регуляции. Цифры 1,2 ... 7 соответствуют сегментам сети, представленной на рисунке 3.12. α_e – параметр, отвечающий за силу эндотелиальной регуляции.

3.5 Обсуждение результатов и выводы по главе

В данной главе предложена математическая модель процесса авторегуляции кровотока в сегменте кровеносного сосуда, которая представляет собой компромисс между релевантным описанием основных физиологических закономерностей с одной стороны, и приемлемой вычислительной эффективностью – с другой.

В части описания гемодинамики, данная модель базируется на широкоизвестных моделях класса Windkessel, то есть, на замене распределенных в пространстве параметров потока на их идеализированные точечные эквиваленты. В отличие от большинства моделей этого класса, где такие ключевые величины как радиус сосуда и упругость (податливость) сосудистой стенки заданы как управляющие параметры, в предложенной модельной системе они нелинейным образом зависят от параметров кровотока и состояния клеточных структур сосудистой стенки.

В части описания авторегуляции сосудистого тонуса, клеточные механизмы, реализуемые совместным действием клеток эндотелия и клеток гладкой мускулатуры, описаны феноменологически и минималистично, с учетом знака воздействия на упругость сосудистой стенки (увеличение или уменьшение) и характерного времени реакции. Такое описание базируется прежде всего на том факте, что разнообразные факторы, влияющие на сосудистый тонус, реализуют свое действие через единственный механизм – рост внутриклеточной концентрации кальция, который разблокирует сократительную систему (актин-миозиновый комплекс).

Описанные в главе результаты вычислительных экспериментов позволяют утверждать, что предложенная модель локальной авторегуляции сосудистого тонуса в форме четырехмерной динамической системы адекватно описывает реакции одиночного сосуда на изменение характеристик кровотока. А именно, модель хорошо воспроизводит эффект изменений радиуса и стабилизации потока при значительных (в несколько раз) изменениях давления на входе в сегмент. Параметризация (задание согласованного набора размерных параметров) размерной версии модели показала, что результирующая динамика укладывается в рамки физиологически релевантных значений.

На основе вышесказанного, предложенная модель была использована в задаче модельно-теоретического исследования возможного вклада механизма эндотелиальной регуляции сосудистого тонуса в динамику кровотока, в том числе – простейших васкулярных сетей. А именно:

1) Для одиночного сосуда было показано, что наличие сильных пульсаций кровотока способно вызвать сбой в работе эндотелиального механизма. А именно, если в ходе пульсаций

поток меняет направление (ситуация, наблюдавшаяся в экспериментах, описанных в Главе 2), то эндотелиальный механизм может индуцировать вазодилатацию даже при нулевом среднем потоке сквозь сегмент сосуда.

2) Для простейшей сети из трех сегментов сосудов (Y-бифуркация) была показана возможность сохранения или даже прироста величины потока (что также наблюдалось в экспериментах Главы 2) при окклюзии одной из “дочерних” ветвей в том случае, если чувствительность эндотелиального механизма превышает некоторый критический уровень.

3) Для 14-сегментной модели сосудистой сети показано, что действие миогенного механизма уменьшает, а эндотелиального механизма – увеличивает разброс характеристик популяции сетей, изначально переменных лишь по одному параметру (длины сегментов). На примере симметричной (с одинаковыми сегментами) модели сосудистой сети показано, что разным значениям вклада эндотелиальной регуляции в динамику соответствуют различные паттерны распределения радиусов сегментов и потоков в них.

Таким образом, методами модельного исследования выявлена и исследована возможная роль эндотелиального механизма регуляции сосудистого тонуса в формировании пространственно-временной динамики сетевого кровотока, в основе которой лежит эффект индуцированного быстрым потоком разбаланса состояний соседних сосудов.

Заключение

В ходе исследований по диссертации основные задачи, перечисленные во Введении, были выполнены, что позволяет считать достигнутой и основную цель работы.

В рамках экспериментальной части работы отработана технология экспериментального исследования сетевого кровотока *in vivo*. При этом, как выбор биомодели (хориоаллантаисная оболочка куриного эмбриона), так и разработанный метод (бесконтактное воздействие лазерным излучением на стенку кровеносного либо лимфатического сосуда) оказались адекватными решаемым задачам.

На момент представления диссертации к защите, автором выполнены пробные эксперименты аналогичного характера по воздействию на сосуды головного мозга мыши, которые показали, что во-первых, наблюдаемые эффекты весьма схожи, а во-вторых, сопоставимые качество и стабильность видеозаписи кровотока требуют в этом случае гораздо больших усилий, нежели при использовании сосудистой сети хориоаллантаисной оболочки куриного эмбриона.

В ходе исследований было показано, что высоколокализованное дозированное лазерное воздействие индуцирует сосудодвигательные реакции (вазореактивность), при этом тип реакции (дилатация или констрикция) может быть различным и, согласно полученным данным, зависит от длины волны лазерного излучения. Показано, что высоколокализованное дозированное лазерное воздействие на сосудистую стенку сосудов хориоаллантаисной оболочки куриного эмбриона, помимо локального вазореактивного эффекта, индуцирует распространяющуюся вазоконстрикцию, охватывающую расположенные выше и ниже по потоку участки сосуда, и в ряде случаев – переходящую на соседние сегменты сосудов. Исследование лазер-индуцированной вазореактивности интактного фрагмента микроциркуляторной сети хориоаллантаисной оболочки куриного эмбриона показало, что паттерны изменения диаметров и линейной скорости кровотока в сосудах, прилежащих к месту воздействия лазером, имеют сложный характер и существенно отличаются от тех, которые можно было бы ожидать при “гидродинамической” интерпретации реакций такой системы. Получены данные о реакции среднеразмерного (3-7 сосудов) фрагмента интактной микроциркуляторной сети хо-

риоаллантоисной оболочки куриного эмбриона на локальное лазерное облучение одного из сегментов сети.

Применение аналогичной методики эксперимента к лимфатическим сосудам брыжейки крысы показало, что высоколокализованное дозированное лазерное воздействие с длиной волны 405 нм оказывает стимулирующее действие на сократительную активность выбранного для воздействия лимфангиона.

В целом, экспериментальная часть исследования дала новые знания как по методике эксперимента – способу бесконтактного и неразрушающего воздействия на интактную микроциркуляторную сеть, так и по типичным паттернам реакции сосудов на такое воздействие. Результаты по активации лимфатических сосудов убеждают в том, что наблюдаемые эффекты связаны не столько с высвобождением оксида азота эритроцитами (как исходно предполагалось), сколько с внутриклеточными ионными механизмами, баланс которых меняется в ходе облучения лазером. Детали этих механизмов еще нуждаются в уточнении.

В рамках теоретико-модельной части диссертации (Глава 3), развит подход к модельному описанию регуляции кровотока в малых сетях. Разработана и верифицирована математическая модель малого сегмента кровеносного сосуда, оптимизированная для задач исследования динамики паттернов вазореактивности путем объединения в сети различной топологии с учетом как локальных механизмов регуляции сосудистого тонуса, так и эффекта распространяющейся вазореактивности. Разработан комплект программ моделирования микроциркуляции, оптимизированный для задач исследования динамики паттернов вазореактивности и включающий модуль генерации топологии васкулярных структур. Продемонстрировано различие в реакции математических моделей малого фрагмента сети на локальную окклюзию отдельной структуры и фрагмента большой сети. Показано, что действие эндотелиального механизма регуляции сосудистого тонуса (поток-зависимая дилатация) способствует разбалансировке потоков в точках бифуркации сосудов. На уровне многосегментной модельной сети данный эффект приводит к увеличению степени ее неоднородности, что выражается в большем разбросе диаметров и потоков по сравнению со случаем, когда эндотелиальный механизм не действует.

Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному руководителю профессору, д.ф.-м.н. Дмитрию Энгелевичу Постнову за активную помощь и поддержку, проявленную им при подготовке данной работы на всех ее этапах. Автор искренне благодарит к.ф.-м.н., доцента Ивана Владленовича Федосова за консультации при подготовке данной работы; Максима Андреевича Курочкина за помощь в проведении экспериментов и

обработку данных лазерного воздействия на хориоаллантаоисную оболочку куриного эмбриона; Марию Олеговну Цой за моральную поддержку и ценные советы при обработке данных; Николая Игоревича Львова (СГМУ имени В.И. Разумовского) за возможность проведения и помощь в проведении экспериментов на крысах.

Список сокращений

Ниже приводится список сокращений, часто используемых в данной работе:

- **КГМ** – клетка гладкой мускулатуры
- **КЭ** – клетка эндотелия
- **NO** – молекула оксида азота
- **НС** – напряжение сдвига
- **ПМ** – плазматическая мембрана
- **eNOS** – эндотелиальная синтаза оксида азота
- **VCR** – распространяющиеся сосудистые реакции (от англ. Vascular Conducted Responses)
- **КЛМ** – лимфатические мышечные клетки
- **ЛЭК** – лимфатические эндотелиальные клетки
- **ХАО** – хориоаллантоисная оболочка
- **PIV** – анемометрия по изображению частиц (от англ. Particle Image Velocimetry)
- **МЦС** – микроциркуляторная сеть

Список литературы

1. Vascular biology and medicine in the 1990s: scope, concepts, potentials, and perspectives. / V. J. Dzau, G. H. Gibbons, J. P. Cooke, N. Omoigui // *Circulation*. — 1993. — Vol. 87, no. 3. — Pp. 705–719.
2. Фундаментальная и клиническая физиология: Учебник для студ. высш. учеб. заведений / Ed. by А. Г. Камкин, А. А. Каменский. — Москва: Академия, 2004.
3. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови / Ed. by А. И. Крупаткин, В. В. Сидоров. — Медицина, 2005. — P. 256.
4. *Jensen L. J., Holstein-Rathlou N.-H.* The vascular conducted response in cerebral blood flow regulation // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. — 2013. — Vol. 33. — P. 649–656.
5. Cellular microdomains for nitric oxide signaling in endothelium and red blood cells / F. Leo, V. Hutzler, C. A. Ruddiman et al. // *Nitric Oxide*. — 2020.
6. Роль оксида азота в регуляции микроциркуляторного звена системы гемостаза (обзор литературы) / Е. В. Андронов, В. Ф. Киричук, А. Н. Иванов, Н. В. Мамонтова // *Саратовский научно-медицинский журнал*. — 2007. — Vol. 3, no. 3.
7. *Vallance P.* Endothelial regulation of vascular tone. // *Postgraduate medical journal*. — 1992. — Vol. 68, no. 803. — P. 697.
8. *Battisti-Charbonney A., Fisher J., Duffin J.* The cerebrovascular response to carbon dioxide in humans // *The Journal of physiology*. — 2011. — Vol. 589, no. 12. — Pp. 3039–3048.
9. The plasma membrane as a mechanochemical transducer / A.-L. Le Roux, X. Quiroga, N. Walani et al. // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. — 2019. — Vol. 374, no. 1779. — P. 20180221.
10. *Gerhold K. A., Schwartz M. A.* Ion channels in endothelial responses to fluid shear stress // *Physiology*. — 2016. — Vol. 31, no. 5. — Pp. 359–369.

11. *Martinac B., Poole K.* Mechanically activated ion channels // *The international journal of biochemistry & cell biology*. — 2018. — Vol. 97. — Pp. 104–107.
12. Shear stress regulates TRPV4 channel clustering and translocation from adherens junctions to the basal membrane / S. Baratchi, M. Knoerzer, K. Khoshmanesh et al. // *Scientific reports*. — 2017. — Vol. 7, no. 1. — Pp. 1–9.
13. Caveolae: a role in endothelial inflammation and mechanotransduction? / W. A. Shihata, D. L. Michell, K. L. Andrews, J. P. F. Chin-Dusting // *Frontiers in physiology*. — 2016. — Vol. 7. — P. 628.
14. *Chen L.-J., Wang W.-L., Chiu J.-J.* Vascular Endothelial Mechanosensors in Response to Fluid Shear Stress // *Molecular and Cellular Mechanobiology*. — Springer, 2016. — Pp. 29–56.
15. *Gustafsson F., Holstein-Rathlou N.-H.* Conducted vasomotor responses in arterioles: characteristics, mechanisms and physiological significance // *Acta physiologica scandinavica*. — 1999. — Vol. 167, no. 1. — Pp. 11–21.
16. *Segal S. S., Damon D. N., Duling B. R.* Propagation of vasomotor responses coordinates arteriolar resistances // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 1989. — Vol. 256, no. 3. — Pp. H832–H837.
17. *Hong K.-S., Kim K.* Skeletal muscle contraction-induced vasodilation in the microcirculation // *Journal of exercise rehabilitation*. — 2017. — Vol. 13, no. 5. — P. 502.
18. *Sagach V. F., Kindyalyuk A. M., Kovalenko T. N.* Functional hyperemia of skeletal muscle: role of endothelium. // *Journal of cardiovascular pharmacology*. — 1992. — Vol. 20. — Pp. S170–5.
19. A critical role for the vascular endothelium in functional neurovascular coupling in the brain / B. R. Chen, M. G. Kozberg, M. B. Bouchard et al. // *Journal of the American Heart Association*. — 2014. — Vol. 3, no. 3. — P. e000787.
20. Stimulation-induced increases in cerebral blood flow and local capillary vasoconstriction depend on conducted vascular responses / C. Cai, J. C. Fordsmann, S. H. Jensen et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2018. — Vol. 115, no. 25. — Pp. E5796–E5804.

21. *Keener J., Sneyd J.* Mathematical Physiology / Ed. by J. E. Marsden, S. Wiggins, L. Sirovich. — New York: Springer-Verlag, 1998.
22. *Formaggia L., Quarteroni A., Veneziani A.* Cardiovascular Mathematics. Modeling and simulation of the circulatory system. — Springer-Verlag Italia, Milano, 2009.
23. Defining electrical communication in skeletal muscle resistance arteries: a computational approach / H. K. Diep, E. J. Vigmond, S. S. Segal, D. G. Welsh // *The Journal of physiology*. — 2005. — Vol. 568, no. 1. — Pp. 267–281.
24. *Kapela A., Nagaraja S., Tsoukias N. M.* A mathematical model of vasoreactivity in rat mesenteric arterioles. II. Conducted vasoreactivity // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2010. — Vol. 298, no. 1. — Pp. H52–H65.
25. *Neganova A. Yu.* Dynamical characteristics of microvascular networks with a myogenic response gradient // *Journal for Modeling in Ophthalmology*. — 2017. — Vol. 1, no. 4. — Pp. 43–61.
26. The myogenic response in isolated rat cerebrovascular arteries: smooth muscle cell model / J. Yang, J.W. Clark Jr., R.M. Bryan, C. Robertson // *Med Eng Phys*. — 2003. — no. 25(8). — Pp. 691–709.
27. *Potente M., Mäkinen T.* Vascular heterogeneity and specialization in development and disease // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2017. — Vol. 18, no. 8. — P. 477.
28. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis / D. S. Celermajer, K. E. Sorensen, V. M. Gooch et al. // *The lancet*. — 1992. — Vol. 340, no. 8828. — Pp. 1111–1115.
29. Characterization of blood flow patterns and endothelial shear stress during flow-mediated dilation / F. Morales-Acuna, L. Ochoa, C. Valencia, A. N. Gurovich // *Clinical physiology and functional imaging*. — 2019. — Vol. 39, no. 4. — Pp. 240–245.
30. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline / D. H. J. Thijssen, M. A. Black, K. E. Pyke et al. // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2011. — Vol. 300, no. 1. — Pp. H2–H12.
31. *Uchimido R., Schmidt E. P., Shapiro N. I.* The glycocalyx: a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis // *Critical Care*. — 2019. — Vol. 23, no. 1. — P. 16.

32. *Chistiakov D. A., Orekhov A. N., Bobryshev Y. V.* Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow // *Acta physiologica*. — 2017. — Vol. 219, no. 2. — Pp. 382–408.
33. *Lansman J. B., Hallam T. J., Rink T. J.* Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? // *Nature*. — 1987. — Vol. 325, no. 6107. — Pp. 811–813.
34. *Olesen S.-P., Clapham D., Davies P.* Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells // *Nature*. — 1988. — Vol. 331, no. 6152. — Pp. 168–170.
35. Shear stress regulates the endothelial Kir2. 1 ion channel / J. H. Hoyer, V. I. Ilyin, S. Forsyth, A. Hoyer // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2002. — Vol. 99, no. 11. — Pp. 7780–7785.
36. *Lieu D. K., Pappone P. A., Barakat A. I.* Differential membrane potential and ion current responses to different types of shear stress in vascular endothelial cells // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. — 2004. — Vol. 286, no. 6. — Pp. C1367–C1375.
37. *Longden T. A., Nelson M. T.* Vascular inward rectifier K⁺ channels as external K⁺ sensors in the control of cerebral blood flow // *Microcirculation*. — 2015. — Vol. 22, no. 3. — Pp. 183–196.
38. Capillary K⁺-sensing initiates retrograde hyperpolarization to increase local cerebral blood flow / T. A. Longden, F. Dabertrand, M. Koide et al. // *Nature neuroscience*. — 2017. — Vol. 20, no. 5. — P. 717.
39. *Garland C. J., Dora K. A.* EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling // *Acta Physiologica*. — 2017. — Vol. 219, no. 1. — Pp. 152–161.
40. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels / B. Coste, J. Mathur, M. Schmidt et al. // *Science*. — 2010. — Vol. 330, no. 6000. — Pp. 55–60.
41. Two resting potential levels regulated by the inward-rectifier potassium channel in the guinea-pig spiral modiolar artery / Z. G. Jiang, J. Q. Si, M. R. Lasarev, A. L. Nuttall // *J Physiol*. — 2001. — no. 537(Pt 3). — Pp. 829–842.
42. *Ottolini M., Hong K., Sonkusare S. K.* Calcium signals that determine vascular resistance // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. — 2019. — Vol. 11, no. 5. — P. e1448.

43. Haas T. L., Duling B. R. Morphology favors an endothelial cell pathway for longitudinal conduction within arterioles // *Microvascular research*. — 1997. — Vol. 53, no. 2. — Pp. 113–120.
44. Rhodin J. A. G. The ultrastructure of mammalian arterioles and precapillary sphincters // *Journal of ultrastructure research*. — 1967. — Vol. 18, no. 1-2. — Pp. 181–223.
45. Inwardly rectifying K⁺ channels are major contributors to flow-induced vasodilatation in resistance arteries / S. J. Ahn, I. S. Fancher, J.-T. Bian et al. // *The Journal of physiology*. — 2017. — Vol. 595, no. 7. — Pp. 2339–2364.
46. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation / H. Shimokawa, H. Yasutake, K. Fujii et al. // *Journal of cardiovascular pharmacology*. — 1996. — Vol. 28, no. 5. — Pp. 703–711.
47. Furchgott R. F., Zawadzki J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // *nature*. — 1980. — Vol. 288, no. 5789. — Pp. 373–376.
48. Koshland Jr. Daniel E. The molecule of the year // *Science*. — 1992. — Vol. 258, no. 5090. — Pp. 1861–1862.
49. Collins D. M., McCullough W. T., Ellsworth M. L. Conducted vascular responses: communication across the capillary bed // *Microvascular research*. — 1998. — Vol. 56, no. 1. — Pp. 43–53.
50. Dietrich H. H. Effect of locally applied epinephrine and norepinephrine on blood flow and diameter in capillaries of rat mesentery // *Microvascular Research*. — 1989. — Vol. 38, no. 2. — Pp. 125 – 135.
51. Prominent role of $K_{Ca3.1}$ in endothelium-derived hyperpolarizing factor-type dilations and conducted responses in the microcirculation in vivo / S. E. Wolffe, V. J. Schmidt, J. Hoyer et al. // *Cardiovascular Research*. — 2009. — Vol. 82, no. 3. — Pp. 476–483.
52. Domeier T. L., Segal S. S. Electromechanical and pharmacomechanical signalling pathways for conducted vasodilatation along endothelium of hamster feed arteries // *The Journal of Physiology*. — 2007. — Vol. 579, no. 1. — Pp. 175–186.

53. Wagner A. J., Holstein-Rathlou N. H., Marsh D. J. Internephron coupling by conducted vasomotor responses in normotensive and spontaneously hypertensive rats // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. — 1997. — Vol. 272, no. 3. — Pp. F372–F379. — PMID: 9087681.
54. The role of L- and T-type calcium channels in local and remote calcium responses in rat mesenteric terminal arterioles / T. H. Braunstein, R. Inoue, L. Cribbs et al. // *Vascular Research*. — 2009. — Vol. 46, no. 2.
55. Emerson G. G., Segal S. S. Endothelial Cell Pathway for Conduction of Hyperpolarization and Vasodilation Along Hamster Feed Artery // *Circulation Research*. — 2000. — Vol. 86.
56. Emerson G. G., Neild T. O., Segal S. S. Conduction of hyperpolarization along hamster feed arteries: augmentation by acetylcholine // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2002. — Vol. 283, no. 1. — Pp. H102–H109. — PMID: 12063280.
57. Propagated endothelial Ca^{2+} waves and arteriolar dilation in vivo: measurements in Cx40BAC GCaMP2 transgenic mice / Y. N. Tallini, J. F. Brekke, B. Shui et al. // *Circ Res*. — 2007. — Vol. 101. — P. 1300–1309.
58. Uhrenholt T. R., Domeier T. L., Segal S. S. Propagation of calcium waves along endothelium of hamster feed arteries // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. — 2007. — Vol. 292. — P. H1634–H1640.
59. BK(Ca) and K(V) channels limit conducted vasomotor responses in rat mesenteric terminal arterioles / B. O. Hald, J. Ch. B. Jacobsen, T. H. Braunstein et al. // *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. — 2012. — Vol. 463, no. 2. — Pp. 279–295.
60. Electrically induced vasomotor responses and their propagation in rat renal vessels in vivo / M. Steinhausen, K. Endlich, R. Nobile et al. // *The Journal of physiology*. — 1997. — Vol. 505, no. 2. — Pp. 493–501.
61. Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice / C. de Wit, F. Roos, S.-S. Bolz et al. // *Circulation research*. — 2000. — Vol. 86, no. 6. — Pp. 649–655.
62. Haefliger J.-A., Nicod P., Meda P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall // *Cardiovascular research*. — 2004. — Vol. 62, no. 2. — Pp. 345–356.

63. Expression of homocellular and heterocellular gap junctions in hamster arterioles and feed arteries / S. L. Sandow, R. Looft-Wilson, B. Doran et al. // *Cardiovascular research*. — 2003. — Vol. 60, no. 3. — Pp. 643–653.
64. *de Wit C.* Connexins pave the way for vascular communication // *Physiology*. — 2004. — Vol. 19, no. 3. — Pp. 148–153.
65. Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries / F. Gustafsson, H. B. Mikkelsen, B. Arensbak et al. // *Histochemistry and cell biology*. — 2003. — Vol. 119, no. 2. — Pp. 139–148.
66. Conducted vasoconstriction in rat mesenteric arterioles: role for dihydropyridine-insensitive Ca²⁺ channels / F. Gustafsson, D. Andreasen, M. Salomonsson et al. // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2001. — Vol. 280, no. 2. — Pp. H582–H590.
67. *Yashiro Y., Duling B. R.* Integrated Ca(2+) signaling between smooth muscle and endothelium of resistance vessels // *Circ Res*. — 2000. — Vol. 87. — Pp. 1048–1054.
68. *Rivers R. J.* Cumulative conducted vasodilation within a single arteriole and the maximum conducted response // *Am J Physiol*. — 1997. — no. 273(1 Pt 2). — Pp. H310–H316.
69. *Crane G. J., Neild T. O., Segal S. S.* Contribution of active membrane processes to conducted hyperpolarization in arterioles of hamster cheek pouch // *Microcirculation*. — 2004. — no. 11. — Pp. 425–433.
70. *Hill C.E.* Long distance conduction of vasodilation: a passive or regenerative process? // *Microcirculation*. — 2012. — no. 19(5). — Pp. 379–390.
71. Consensus statement on the immunohistochemical detection of ocular lymphatic vessels / F. Schroedl, A. Kaser-Eichberger, S. L. Schlereth et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2014. — Vol. 55, no. 10. — Pp. 6440–6442.
72. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules / A. Aspelund, S. Antila, S. T. Proulx et al. // *Journal of Experimental Medicine*. — 2015. — Vol. 212, no. 7. — Pp. 991–999.
73. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels / A. Louveau, I. Smirnov, T. J. Keyes et al. // *Nature*. — 2015. — Vol. 523, no. 7560. — P. 337.

74. Myogenic constriction and dilation of isolated lymphatic vessels / M. J. Davis, A. M. Davis, C. W. Ku, A. A. Gashev // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2009. — Vol. 296, no. 2. — Pp. H293–H302.
75. *Gasheva O. Yu., Gashev A. A., Zawieja D. C.* Cyclic guanosine monophosphate and the dependent protein kinase regulate lymphatic contractility in rat thoracic duct // *The Journal of Physiology*. — 2013. — Vol. 591, no. 18. — Pp. 4549–4565.
76. *von der Weid P.-Y., Zawieja D. C.* Lymphatic smooth muscle: the motor unit of lymph drainage // *The international journal of biochemistry & cell biology*. — 2004. — Vol. 36, no. 7. — Pp. 1147–1153.
77. *Chakraborty S., Davis M. J., Muthuchamy M.* Emerging trends in the pathophysiology of lymphatic contractile function // *Seminars in cell & developmental biology* / Elsevier. — Vol. 38. — 2015. — Pp. 55–66.
78. *Van Helden D. F.* Pacemaker potentials in lymphatic smooth muscle of the guinea-pig mesentery. // *The Journal of Physiology*. — 1993. — Vol. 471, no. 1. — Pp. 465–479.
79. *Mizuno R., Ono N., Ohhashi T.* Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in spontaneous activity of isolated lymph microvessels in rats // *American journal of physiology-heart and circulatory physiology*. — 1999. — Vol. 277, no. 4. — Pp. H1453–H1456.
80. Kit-like immunopositive cells in sheep mesenteric lymphatic vessels / K. McCloskey, M. Hollywood, K. Thornbury et al. // *Cell and tissue research*. — 2002. — Vol. 310, no. 1. — Pp. 77–84.
81. Tetrodotoxin-sensitive sodium current in sheep lymphatic smooth muscle / M. A. Hollywood, K. D. Cotton, K. D. Thornbury, N. G. McHale // *The Journal of Physiology*. — 1997. — Vol. 503, no. 1. — Pp. 13–20.
82. Isolated sheep mesenteric lymphatic smooth muscle cells possess both T-and L-type calcium currents / M. A. Hollywood, K. D. Cotton, K. D. Thornbury, N. G. McHale // *Journal of Physiology-London* / CAMBRIDGE UNIV PRESS 40 WEST 20TH STREET, NEW YORK, NY 10011-4211. — Vol. 501. — 1997. — Pp. P109–P110.
83. *Lee Stewart, Roizes Simon, von der Weid Pierre-Yves.* Distinct roles of L-and T-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in regulation of lymphatic vessel contractile activity // *The Journal of physiology*. — 2014. — Vol. 592, no. 24. — Pp. 5409–5427.

84. Voltage-gated sodium channels contribute to action potentials and spontaneous contractility in isolated human lymphatic vessels / N. Telinius, J. Majgaard, S. Kim et al. // *The Journal of physiology*. — 2015. — Vol. 593, no. 14. — Pp. 3109–3122.
85. Hyperpolarisation-activated inward current in isolated sheep mesenteric lymphatic smooth muscle / K. D. McCloskey, H. M. Toland, M. A. Hollywood et al. // *The Journal of Physiology*. — 1999. — Vol. 521, no. 1. — Pp. 201–211.
86. *McHale N. G., Meharg M. K.* Co-ordination of pumping in isolated bovine lymphatic vessels // *The Journal of physiology*. — 1992. — Vol. 450, no. 1. — Pp. 503–512.
87. Lymphangion coordination minimally affects mean flow in lymphatic vessels / A. M. Venugopal, R. H. Stewart, G. A. Laine et al. // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2007. — Vol. 293, no. 2. — Pp. H1183–H1189.
88. *Von der Weid P. Y., Crowe M. J., Van Helden D. F.* Endothelium-dependent modulation of pacemaking in lymphatic vessels of the guinea-pig mesentery // *The Journal of physiology*. — 1996. — Vol. 493, no. 2. — Pp. 563–575.
89. *von der Weid P.-Y., Van Helden D. F.* Functional electrical properties of the endothelium in lymphatic vessels of the guinea-pig mesentery // *The Journal of physiology*. — 1997. — Vol. 504, no. 2. — Pp. 439–451.
90. A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction / A. Zijlstra, R. Mellor, G. Panzarella et al. // *Cancer research*. — 2002. — Vol. 62, no. 23. — Pp. 7083–7092.
91. *Ribatti D.* The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology // *Experimental cell research*. — 2014. — Vol. 328, no. 2. — Pp. 314–324.
92. The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research / K. H. Kain, J. W. I. Miller, C. R. Jones-Paris et al. // *Developmental Dynamics*. — 2014. — Vol. 243, no. 2. — Pp. 216–228.
93. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis / N. A. Lokman, A. S. F. Elder, C. Ricciardelli, M. K. Oehler // *International journal of molecular sciences*. — 2012. — Vol. 13, no. 8. — Pp. 9959–9970.

94. The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research / L. C. DeBord, R. R. Pathak, M. Villaneuva et al. // *American journal of cancer research*. — 2018. — Vol. 8, no. 8. — P. 1642.
95. Chick chorioallantoic membrane assay as an in vivo model to study the effect of nanoparticle-based anticancer drugs in ovarian cancer / B. T. Vu, S. A. Shahin, J. Croissant et al. // *Scientific reports*. — 2018. — Vol. 8, no. 1. — Pp. 1–10.
96. Establishment of xenografts of urological cancers on chicken chorioallantoic membrane (CAM) to study metastasis / J. Hu, M. Ishihara, A. I. Chin, L. Wu // *Precision clinical medicine*. — 2019. — Vol. 2, no. 3. — Pp. 140–151.
97. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. / D. Ribatti, A. Vacca, L. Roncali, F. Dammacco // *International Journal of Developmental Biology*. — 1996. — Vol. 40, no. 6. — Pp. 1189–1197.
98. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis // *Rom J Morphol Embryol*. — 2008. — Vol. 49, no. 2. — Pp. 131–135.
99. Quantification of angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane (CAM) / S. Blacher, L. Devy, R. Hlushchuk et al. // *Image Analysis & Stereology*. — 2011. — Vol. 24, no. 3. — Pp. 169–180.
100. Using ex ovo chick chorioallantoic membrane (CAM) assay to evaluate the biocompatibility and angiogenic response to biomaterials / N. Mangir, S. Dikici, F. Claeysens, S. MacNeil // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. — 2019. — Vol. 5, no. 7. — Pp. 3190–3200.
101. Toxicologic screening of some surfactants using modern in vivo bioassays / S. Ardelean, S. Feflea, D. Ionescu et al. // *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*. — 2011. — Vol. 115, no. 1. — Pp. 251–258.
102. Brinzolamide-loaded nanoemulsions: ex vivo transcorneal permeation, cell viability and ocular irritation tests / M. M. Mahboobian, A. Seyfoddin, R. Aboofazeli et al. // *Pharmaceutical development and technology*. — 2019. — Vol. 24, no. 5. — Pp. 600–606.
103. The Isolated Chicken Eye test to replace the Draize test in rabbits / M. K. Prinsen, C. F. M. Hendriksen, C. A. M. Krul, R. A. Woutersen // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. — 2017. — Vol. 85. — Pp. 132–149.

104. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs / C. S. Kue, K. Y. Tan, M. L. LaM, H. B. Lee // *Experimental animals*. — 2015. — Pp. 14–0059.
105. *Dünker N., Jendrossek V.* Implementation of the Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Model in Radiation Biology and Experimental Radiation Oncology Research // *Cancers*. — 2019. — Vol. 11, no. 10. — P. 1499.
106. *Borgave S., Ghodke K., Ghaskadbi S.* The heart forming region of early chick embryo is an alternative source of embryonic stem cells // *International Journal of Developmental Biology*. — 2009. — Vol. 53, no. 1. — Pp. 91–99.
107. Куриный эмбрион как объект эксперимента для изучения развития сердечно-сосудистой системы / А. Х. Каде, А. И. Трофименко, А. Ю. Туровая et al. // *Российский медико-биологический вестник имени академика ИИП Павлова*. — 2018. — Vol. 26, no. 4.
108. *Wittig J. G., Münsterberg A.* The Chicken as a Model Organism to Study Heart Development // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. — 2019. — P. a037218.
109. Improved preparation of chick embryonic samples for magnetic resonance microscopy / X. Zhang, T. M. Yelbuz, G. P. Cofer et al. // *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*. — 2003. — Vol. 49, no. 6. — Pp. 1192–1195.
110. Chick Embryos as an Alternative Experimental Animal for Cardiovascular Investigations: Stable Recording of Electrocardiogram of Chick Embryos on the 16th Day of Incubation / T. Sugiyama, H. Miyazaki, K. Saito et al. // *Toxicology and Applied Pharmacology*. — 1996. — Vol. 138, no. 2. — Pp. 262–267.
111. *Kamran K., Khan M. Y., Minhas L. A.* Ethanol vapour induced dilated cardiomyopathy in chick embryos // *J Pak Med Assoc*. — 2013. — Vol. 63, no. 9. — Pp. 1084–8.
112. The effect of magnetic resonance imaging on neural tube development in an early chicken embryo model / E. Kantarcioglu, G. Kahilogullari, M. Zaimoglu et al. // *Child's Nervous System*. — 2018. — Vol. 34, no. 5. — Pp. 933–938.
113. *Hamamichi S., Nishigori H.* Establishment of a chick embryo shell-less culture system and its use to observe change in behavior caused by nicotine and substances from cigarette smoke // *Toxicology letters*. — 2001. — Vol. 119, no. 2. — Pp. 95–102.

114. Study of potential health effects of electromagnetic fields of telephony and Wi-Fi, using chicken embryo development as animal model / H. Woelders, A. de Wit, A. Lourens et al. // *Bioelectromagnetics*. — 2017. — Vol. 38, no. 3. — Pp. 186–203.
115. Toxicity studies of six types of carbon nanoparticles in a chicken-embryo model / N. Kurantowicz, E. Sawosz, G. Halik et al. // *International journal of nanomedicine*. — 2017. — Vol. 12. — P. 2887.
116. Lee J. Y., Ji H. S., Lee S. J. Micro-PIV measurements of blood flow in extraembryonic blood vessels of chicken embryos // *Physiological measurement*. — 2007. — Vol. 28, no. 10. — P. 1149.
117. Davis A., Izatt J., Rothenberg F. Quantitative measurement of blood flow dynamics in embryonic vasculature using spectral Doppler velocimetry // *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. — 2009. — Vol. 292, no. 3. — Pp. 311–319.
118. Measurement of the absolute velocity of blood flow in early-stage chick embryos using spectral domain optical coherence tomography / Z.-H. Ma, Y.-S. Ma, Y.-Q. Zhao et al. // *Applied optics*. — 2017. — Vol. 56, no. 31. — Pp. 8832–8837.
119. Benslimane F. M., Yalcin H. C. Adaptation of a Mice Doppler Echocardiography Platform to measure cardiac flow velocities for embryonic chicken and adult Zebrafish. // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. — 2019. — Vol. 7. — P. 96.
120. In vivo micro particle image velocimetry measurements of blood-plasma in the embryonic avian heart / P. Vennemann, K. T. Kiger, R. Lindken et al. // *Journal of biomechanics*. — 2006. — Vol. 39, no. 7. — Pp. 1191–1200.
121. Hamburger V., Hamilton H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo // *Journal of morphology*. — 1951. — Vol. 88, no. 1. — Pp. 49–92.
122. Measurements of the wall shear stress distribution in the outflow tract of an embryonic chicken heart / C. Poelma, K. Van der Heiden, B. P. Hierck et al. // *Journal of the Royal Society Interface*. — 2009. — P. rsif20090063.
123. Altered wall shear stresses in embryonic chicken outflow tract due to homocysteine exposure / A. M. Oosterbaan, C. Poelma, E. Bon et al. // *Journal of Medical and Biological Engineering* 34 (1), 56-61.(2014). — 2014.

124. *Тучин В. В.* Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. 2-е изд., испр. и доп. / Ed. by В. В. Тучин. — ФИЗМАТЛИТ, 2010.
125. Towards the nature of biological zero in the dynamic light scattering diagnostic techniques / I. V. Meglinsky, V. V. Kalchenko, Yu. L. Kuznetsov et al. // *Doklady Physics Proceedings of the Russian Academy of Sciences*. — 2013. — Vol. 58, no. 8. — P. 323–326.
126. *Сагайдачный А. А., Фомин А. В.* Анализ временной производной температурной реакции пальцев рук на плечевую окклюзию и ее взаимосвязь с параметрами гемодинамики // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. — 2017. — Vol. 16, no. 3. — Pp. 31–40.
127. *Мизева И. А., Думлер А. А., Муравьев Н. Г.* Особенности пульсовой волны при хронической артериальной недостаточности нижних конечностей // *Российский журнал биомеханики*. — 2012. — no. 2.
128. *Schultz-Ehrenburg U., Blazek V.* Value of quantitative photoplethysmography for functional vascular diagnostics. Current status and prospects // *Skin Pharmacol. Appl. Skin. Physiol.* — 2001. — Vol. 14, no. 5. — P. 316–323.
129. *Zhang Zhengji.* LDA application methods: Laser Doppler anemometry for fluid dynamics. — Springer Science & Business Media, 2010.
130. *Бороздова М. А., Федосов И. В., Тучин В. В.* Метод анализа сигнала лазерного доплеровского анемометра для измерения скорости течения крови // *Квантовая электроника*. — 2015. — Vol. 45, no. 3. — Pp. 275–282.
131. Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by V. V. Tuchin. — CRC Press, 2010.
132. Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / Ed. by V. V. Tuchin. — SPIE Press, 2002.
133. *Boas D. A., Dunn A. K.* Laser speckle contrast imaging in biomedical optics // *Journal of biomedical optics*. — 2010. — Vol. 15, no. 1. — P. 011109.
134. Monitoring of rhythms in laser speckle data / D. E. Postnov, A. Y. Neganova, D. D. Postnov, A. R. Brazhe // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2014. — Vol. 7. — P. 1450015.
135. Micro-particle image velocimetry measurement of blood flow: validation and analysis of data pre-processing and processing methods / K. L. Pitts, R. Mehri, C. Mavriplis, M. Fenech // *Measurement Science and Technology*. — 2012. — Vol. 23, no. 10. — P. 105302.

136. A review of arterial phantom fabrication methods for flow measurement using PIV techniques / S. G. Yazdi, P. H. Geoghegan, P. D. Docherty et al. // *Annals of biomedical engineering*. — 2018. — Pp. 1–25.
137. *Postnikov E. B., Tsoy M. O., Postnov D. E.* MATLAB for laser speckle contrast analysis (LASCA): a practice-based approach // Saratov Fall Meeting 2017: Laser Physics and Photonics XVIII; and Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data IV / International Society for Optics and Photonics. — Vol. 10717. — 2018. — P. 1071728.
138. Blood flow velocity measurements in chicken embryo vascular network via PIV approach / M. A. Kurochkin, E. S. Stiukhina, I. V. Fedosov, V. V. Tuchin // Saratov Fall Meeting 2017: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX / International Society for Optics and Photonics. — Vol. 10716. — 2018. — P. 107160H.
139. High-frame-rate contrast-enhanced US particle image velocimetry in the abdominal aorta: first human results / S. Engelhard, J. Voorneveld, H. J. Vos et al. // *Radiology*. — 2018. — P. 172979.
140. *Adrian R. J.* Scattering particle characteristics and their effect on pulsed laser measurements of fluid flow: speckle velocimetry vs particle image velocimetry // *Applied optics*. — 1984. — Vol. 23, no. 11. — Pp. 1690–1691.
141. *Wavelets in medicine and biology* / Ed. by A. Aldroubi, M. Unser. — CRC press, 1996.
142. *Time Frequency and Wavelets in Biomedical Signal Processing* / Ed. by M. Akay. — IEEE Press, 1998.
143. Application of wavelet-based tools to study the dynamics of biological processes / A. N. Pavlov, V. A. Makarov, E. Mosekilde, O. V. Sosnovtseva // *Briefings in bioinformatics*. — 2006. — Vol. 7. — Pp. 375–389.
144. *Semmlow J. L., Griffel B.* Biosignal and medical image processing. — CRC Press, 2014.
145. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring / P. Avci, A. Gupta, M. Sadasivam et al. // *Semin Cutan Med Surg*. — 2013. — Vol. 32, no. 1. — P. 41–52.
146. Response of microvessels of the subcutaneous areolar tissue to argon laser irradiation / V. S. Barkovskii, V. I. Kozlov, P. I. Saprykin, G. M. Nikol'skaya // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. — 1978. — Vol. 85, no. 6. — P. 731–734.

147. Low-intensity light induces vasomotion / Y. Morimoto, M. Kikuchi, H. Matsuo, T. Arai // *Medical and Biological Engineering and Computing*. — 1996. — Vol. 34, no. SUPPL. 1. — Pp. 283–284.
148. Blue laser light increases perfusion of a skin flap via release of nitric oxide from hemoglobin / R. Mittermayr, A. Osipov, C. Piskernik et al. // *Mol Med*. — 2007. — Vol. 13, no. 1-2. — P. 22–29.
149. Pawloski J. R., Hess D. T., Stamler J. S. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity // *Nature*. — 2001. — Vol. 409, no. 6820. — P. 622.
150. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood / A. Dejam, C. J. Hunter, M. M. Pelletier et al. // *Blood*. — 2005. — Vol. 106, no. 2. — Pp. 734–739.
151. Определение способности эритроцитов генерировать оксид азота у больных с сердечно-сосудистой патологией / Я. Ш. Шварц, М. В. Кручинина, М. М. Тимофеева et al. // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. — 2016. — no. 4-2. — Pp. 386–391.
152. Взаимосвязь генерации оксида азота тромбоцитами с фибриногеном плазмы крови при неотложных состояниях / П. П. Голиков, Н. Ю. Николаева, Е. А. Лужников et al. // *Биомедицинская химия*. — 2005. — Vol. 51, no. 3. — Pp. 329–334.
153. Генерация оксида азота тромбоцитами периферической крови человека в норме и при ранениях груди и живота / М. М. Абакумов, П. П. Голиков, Н. Ю. Николаева et al. // *Вопросы медицинской химии*. — 2002. — Vol. 48, no. 3. — Pp. 286–292.
154. Черток В. М., Коцюба А. Е., Беспалова Е. П. Особенности реакции сосудов микроциркуляторного русла некоторых органов на воздействие гелий-неонового лазера // *ТМЖ*. — 2007. — Vol. 3, no. 29. — P. 48–52.
155. Hamblin M. R., Demidova T. N. Mechanisms of low level light therapy // *Proc. SPIE*. — 2006. — Vol. 6140. — P. 614001.
156. Молекулярные и клеточные механизмы действия низкоинтенсивного лазерного излучения / Ю. А. Владимиров, Г. И. Клебанов, Г. Г. Борисенко, А. Н. Осипов // *Биофизика*. — 2004. — Vol. 49, no. 2. — P. 339–350.

157. Владимиров Ю. А., Осипов А. Н., Клебанов Г. И. Фотобиологические основы терапевтического применения лазерного облучения // *Биохимия*. — 2004. — Vol. 69, no. 1. — P. 103–113.
158. Excimer laser-induced vasoreactivity / M. Mosseri, J. G. Pickering, S. Chokshi et al. // *European Heart Journal*. — 1993. — Vol. 14, no. 10. — P. 1394.
159. Diverse effects of a 445 nm diode laser on isometric contraction of the rat aorta / S. W. Park, K. C. Shin, H. J. Park et al. // *Biomedical optics express*. — 2015. — Vol. 6, no. 9. — Pp. 3482–3493.
160. Vasodilatory effect of a novel Rho-kinase inhibitor, DL0805-2, on the rat mesenteric artery and its potential mechanisms / T. Y. Yuan, Y. Yan, Y. J. Wu et al. // *Cardiovasc Drugs Ther*. — 2014. — Vol. 28, no. 5. — P. 415–424.
161. Vasodilator effects of ibudilast on retinal blood vessels in anesthetized rats / M. Noguchi, A. Mori, K. Sakamoto et al. // *Biol Pharm Bull*. — 2009. — Vol. 32, no. 11. — Pp. 1924–1927.
162. Kezurer N., Farah N., Mandel Y. Endovascular electrodes for electrical stimulation of blood vessels for vasoconstriction – a finite element simulation study // *Scientific Reports*. — 2016. — Vol. 6. — P. 31507.
163. Török J., Zemancikova A. Agmatine modulation of noradrenergic neurotransmission in isolated rat blood vessels // *Chin J Physiol*. — 2016. — Vol. 59, no. 3. — P. 131–138.
164. Microcapsules functionalized with neuraminidase can enter vascular endothelial cells in vitro / W. Liu, X. Wang, K. Bai et al. // *J R Soc Interface*. — 2014. — Vol. 11, no. 101. — P. 20141027.
165. Математическая модель гемодинамики сердечно-сосудистой системы / М. В. Абакумов, К. В. Гаврилюк, Н. Б. Есикова et al. // *Дифференциальные уравнения*. — 1997. — Vol. 33, no. 7. — Pp. 892–898.
166. Абакумов М. В., Ашметиков И. В., Есикова Н. Б. и др. Методика математического моделирования сердечно-сосудистой системы // *Математическое моделирование*. — 2000. — Vol. 12. — Pp. 106–117.
167. Formaggia L., Quarteroni A., Veneziani A. The circulatory system: from case studies to mathematical modelings // *Complex Systems in Biomedicine*. — 2006. — Vol. 12. — Pp. 243–287.

168. Математические модели квази-одномерной гемодинамики / В. Б. Кошелев, С. И. Мухин, Н. В. Соснин, А. П. Фаворский // *М.: МАКС Пресс.* — 2010.
169. *Симаков С. С., Холодов А. С., Евдокимов А. В.* Методы расчета глобального кровотока в организме человека с использованием гетерогенных вычислительных моделей // *Медицина в зеркале информатики. М.: Наука.* — 2008. — Pp. 124–170.
170. *Hales S.* Statistical essays: containig Haemostatics. — Innys and Manby, London, UK Google Scholar, 1733.
171. Non-invasive measurement of arterial pressure-dependent compliance / C. Liu, S. Xin, C. Liu et al. // *Electrical and Computer Engineering.* — 2007. — Pp. 590–593.
172. *Hassani K., Navidbakhsh M., Rostami M.* Simulation of the cardiovascular system using equivalent electronic system // *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia.* — 2006. — Vol. 150, no. 1. — Pp. 105–112.
173. *Huang P. G., Muller L. O.* Simulation of one-dimensional blood flow in networks of human vessels using a novel TVD scheme // *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering.* — 2015. — Vol. 31.
174. A simple, versatile valve model for use in lumped parameter and one-dimensional cardiovascular models / J. P. Mynard, M. R. Davidson, D. J. Penny, J. J. Smolich // *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering.* — 2012. — Vol. 28, no. 6-7. — Pp. 626–641.
175. *Olufsen M., Nadi A.* On deriving lumped models for blood flow and pressure in the systemic arteries // *Math. biosciences and engineering.* — 2004. — Vol. 1. — Pp. 61–80.
176. Model-based parameter estimation using cardiovascular response to orthostatic stress / T. Heldt, E. B. Shim, R. D. Kamm, R. G. Mark // *Computers in Cardiology.* — 2001. — Vol. 28. — Pp. 337–349.
177. Multiscale modelling of the circulatory system: a preliminary analysis / L. Formaggia, F. Nobile, A. Quarteroni, A. Veneziani // *Computing and Visualization in Science.* — 1999. — Vol. 2. — Pp. 75–83.
178. *Kamiya A., Togawa T.* Optimal branching structure of the vascular tree // *The Bulletin of mathematical biophysics.* — 1972. — Vol. 34, no. 4. — Pp. 431–438.

179. *Mulvany M. J.* Modeling the vasculature: a judicious approach? // *Hypertension*. — 2005. — Vol. 46, no. 4. — Pp. 652–653.
180. *Pries A. R., Secomb T. W.* Making microvascular networks work: angiogenesis, remodeling, and pruning // *Physiology*. — 2014. — Vol. 29, no. 6. — Pp. 446–455.
181. Fractal simulation of coronary arteries based on bifurcate rule-base / P. Wang, X. Mou, Ch. Hou, Y. Cai // *Visualization and Optimization Techniques / International Society for Optics and Photonics*. — Vol. 4553. — 2001. — Pp. 157–162.
182. *Keelan J., Chung E. M. L., Hague J. P.* Simulated annealing approach to vascular structure with application to the coronary arteries // *Royal Society Open Science*. — 2016. — Vol. 3, no. 2.
183. *Zamir M.* Distributing and delivering vessels of the human heart. // *The Journal of general physiology*. — 1988. — Vol. 91, no. 5. — Pp. 725–735.
184. *Murray C. D.* The physiological principle of minimum work: I. The vascular system and the cost of blood volume // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1926. — Vol. 12, no. 3. — Pp. 207–214.
185. Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions / J. R. Less, T. C. Skalak, E. M. Sevick, R. K. Jain // *Cancer research*. — 1991. — Vol. 51, no. 1. — Pp. 265–273.
186. A 1D model of the arterial circulation in mice / L. Aslanidou, B. Trachet, Ph. Reymond et al. // *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*. — 2016. — Vol. 33, no. 1. — Pp. 13–28.
187. *Lubashevsky I. A., Gafiychuk V. V.* Analysis of the optimality principles responsible for vascular network architectonics // *arXiv preprint adap-org/9909003*. — 1999.
188. The myogenic response in isolated rat cerebrovascular arteries: vessel model / J. Yang, J.W. Clark Jr., R.M. Bryan, C. Robertson // *Med Eng Phys*. — 2003. — no. 25(8). — Pp. 711–717.
189. *Jacobsen J.C., Mulvany M.J., Holstein-Rathlou N.H.* A mechanism for arteriolar remodeling based on maintenance of smooth muscle cell activation // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. — 2008. — no. 294(4). — Pp. R1379–R1389.

190. Myogenic reactivity and resistance distribution in the coronary arterial tree: a model study / A.J. Cornelissen, J. Dankelman, E. VanBavel et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* — 2000. — no. 278(5). — Pp. H1490–H1499.
191. Balance between myogenic, flow-dependent, and metabolic flow control in coronary arterial tree: a model study / A. J. M. Cornelissen, J. Dankelman, E. VanBavel, J. A. E. Spaan // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* — 2002. — Vol. 282, no. 6. — Pp. H2224–H2237.
192. *Carlson B. E., Arciero J. C., Secomb T. W.* Theoretical model of blood flow autoregulation: roles of myogenic, shear-dependent, and metabolic responses // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* — 2008. — Vol. 295, no. 4. — Pp. H1572–H1579.
193. *Carlson B.E., Secomb T.W.* A theoretical model for the myogenic response based on the length-tension characteristics of vascular smooth muscle // *Microcirculation.* — 2005. — no. 12(4). — Pp. 327–338.
194. *Xie X., Wang Y.* Flow regulation in coronary vascular tree: a model study // *PloS one.* — 2015. — Vol. 10, no. 4.
195. A mathematical model of the myogenic response to systolic pressure in the afferent arteriole / J. Chen, I. Sgouralis, L. C. Moore et al. // *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* — 2011. — Vol. 300, no. 3. — Pp. F669–F681.
196. *Sgouralis I., Layton A. T.* Autoregulation and conduction of vasomotor responses in a mathematical model of the rat afferent arteriole // *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* — 2012. — Vol. 303, no. 2. — Pp. F229–F239.
197. A dynamic computational network model for the role of nitric oxide and the myogenic response in microvascular flow regulation / Y. Liu, D. G. Buerk, K. A. Barbee, D. Jaron // *Microcirculation.* — 2018. — Vol. 25, no. 6. — P. e12465.
198. *Busch C., Krochmann J., Drews U.* The chick embryo as an experimental system for melanoma cell invasion // *PloS one.* — 2013. — Vol. 8, no. 1. — P. e53970.
199. *Aleksandrowicz E., Herr I.* Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo // *ALTEX-Alternatives to animal experimentation.* — 2015. — Vol. 32, no. 2. — Pp. 143–147.

200. *Ausprunk D. H., Knighton D. R., Folkman J.* Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study // *Developmental biology*. — 1974. — Vol. 38, no. 2. — Pp. 237–248.
201. *Ribatti D.* The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of angiogenesis and metastasis: the CAM assay in the study of angiogenesis and metastasis. — Springer Science & Business Media, 2010.
202. *Nowak-Sliwinska P., Segura T., Iruela-Arispe M. L.* The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering // *Angiogenesis*. — 2014. — Vol. 17, no. 4. — Pp. 779–804.
203. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood / A. Dejam, C. J. Hunter, M. M. Pelletier et al. // *Blood*. — 2005. — Vol. 106, no. 2. — P. 734–739.
204. Conducted vasoconstriction in rat mesenteric arterioles: role for dihydropyridine-insensitive Ca^{2+} channels / F. Gustafsson, D. Andreasen, M. Salomonsson et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. — 2001. — Vol. 280, no. 2. — Pp. H582–H590.
205. *McKenzie A. L.* Physics of thermal processes in laser-tissue interaction // *Physics in medicine and biology*. — 1990. — Vol. 35, no. 9. — P. 1175.
206. *Schubert R.* Isolated vessels // *Practical Methods in Cardiovascular Research*. — Springer, 2005. — Pp. 198–211.
207. *Lipowsky H. H., Kovalcheck S., Zweifach B. W.* The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. // *Circulation research*. — 1978. — Vol. 43, no. 5. — Pp. 738–749.
208. Blood velocity and volumetric flow rate in human retinal vessels. / C. E. Riva, J. E. Grunwald, S. H. Sinclair, B. L. Petrig // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 1985. — Vol. 26, no. 8. — Pp. 1124–1132.
209. Calculation of the diameter of the central retinal artery from noninvasive measurements in humans / G. T. Dorner, E. Polska, G. Garhöfer et al. // *Current eye research*. — 2002. — Vol. 25, no. 6. — Pp. 341–345.
210. Measurements of blood flow velocity in the microcirculation / K.-E. Arfors, D. Bergqvist, M. Intaglietta, B. Westergren // *Uppsala journal of medical sciences*. — 1975. — Vol. 80, no. 1. — Pp. 27–33.

211. Dynamic in vivo measurement of erythrocyte velocity and flow in capillaries and of microvessel diameter in the rat brain by confocal laser microscopy / J. Seylaz, R. Charbonné, K. Nanri et al. // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. — 1999. — Vol. 19, no. 8. — Pp. 863–870.
212. Dynamic remodeling of arteriolar collaterals after acute occlusion in chick chorioallantoic membrane / W. Xiang, B. Reglin, B. Nitzsche et al. // *Microcirculation*. — 2017. — Vol. 24, no. 4. — P. e12351.
213. Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis / D. O. DeFouw, V. J. Rizzo, R. Steinfeld, R. N. Feinberg // *Microvascular research*. — 1989. — Vol. 38, no. 2. — Pp. 136–147.
214. The vascular architecture of the chick chorioallantoic membrane: sequential quantitative evaluation using corrosion casting / C. Dimitropoulou, W. Malkusch, E. Fait et al. // *Angiogenesis*. — 1998. — Vol. 2, no. 3. — Pp. 255–263.
215. *Wiedeman M. P.* Dimensions of blood vessels from distributing artery to collecting vein // *Circulation research*. — 1963. — Vol. 12, no. 4. — Pp. 375–378.
216. *LaBarbera M.* Principles of design of fluid transport systems in zoology // *Science*. — 1990. — Vol. 249, no. 4972. — Pp. 992–1000.
217. *Шмидт Р., Тевс Г.* Физиология человека. Т. 2. — М: Мир, 1996.
218. *Zweifach B. W., Lipowsky H. H.* Quantitative studies of microcirculatory structure and function. III. Microvascular hemodynamics of cat mesentery and rabbit omentum. // *Circulation research*. — 1977. — Vol. 41, no. 3. — Pp. 380–390.
219. Податливость (compliance) артериальной системы у спортсменов / В. Л. Карпман, С. С. Никитина (Суворова), Б. Г. Любина, З. Б. Белоцерковский // *Физиология человека*. — 1995. — Vol. 21, no. 5. — Pp. 144–149.
220. Increasing pulse wave velocity in a realistic cardiovascular model does not increase pulse pressure with age / M. W. Mohiuddin, R. J. Rihani, G. A. Laine, C. M. Quick // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2012. — Vol. 303, no. 1. — Pp. H116–H125.
221. *McVeigh G. E., Bank A. J., Cohn J. N.* Arterial compliance // *Cardiovascular medicine*. — Springer, 2007. — Pp. 1811–1831.

222. Conductance catheter-based assessment of arterial input impedance, arterial function, and ventricular-vascular interaction in mice / P. Segers, D. Georgakopoulos, M. Afanasyeva et al. // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2005. — Vol. 288, no. 3. — Pp. H1157–H1164.
223. *Burton A. C.* On the physical equilibrium of small blood vessels // *American Journal of Physiology-Legacy Content*. — 1951. — Vol. 164, no. 2. — Pp. 319–329.

Список публикаций по теме диссертации Литвиненко (Стюхиной) Елены Сергеевны

П1. Е. С. Стюхина, М. А. Курочкин, И. В. Федосов, Д. Э. Постнов Лазер-индуцированные сосудодвигательные реакции на хориоаллантаоисной мембране // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 1. С. 71–78.

П2. Е. С. Стюхина, Ю. Н. Автомонов, Д. Э. Постнов Математическая модель авторегуляции сосудистого тонуса // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2018. Т. 18, вып. 3 С. 202–214.

П3. E. B. Postnikov, E. S. Stiukhina, D. E. Postnov A fast memory-saving method for the Morlet wavelet-based transform and its application to in vivo assessment of microcirculation dynamics // Applied Mathematics and Computation, 2017. V 305. P. 251–261.

П4. E. S. Stiukhina, M. A. Kurochkin, I. V. Fedosov, D. E. Postnov Highly localized laser-induced vascular responses // Proc. SPIE 10717, Saratov Fall Meeting 2017: Laser Physics and Photonics XVIII; and Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data IV, 107171Z.

П5. E. S. Stiukhina, M. A. Kurochkin, V. A. Klochkov, I. V. Fedosov, D. E. Postnov Tissue perfusability assessment from capillary velocimetry data via the multicompartment Windkessel model // proc. SPIE. – 2015. - № 9448. - 94481K.

П6. A. Y. Neganova, E. S. Stiukhina, D. E. Postnov Mathematical model of depolarization mechanism of conducted vasoreactivity // Proc. SPIE. – 2015. - № 9448. - 94481J.

П7. E. S. Stiukhina, D. E. Postnov Modeling study of terminal transients of blood flow // Proc. SPIE 9917, Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS), 99172.

П8. Е. С. Стюхина, М. А. Курочкин, И. В. Федосов, Д. Э. Постнов Лазер-индуцированная вазодилатация как метод тестового воздействия на микроциркуляторную сеть Биология – наука XXI века: 21-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. 17 - 21 апреля 2017 г., Пущино. Сборник тезисов, 2017 С. 77.

П9. Е. С. Стюхина, А. Ю. Неганова, Д. Э. Постнов Исследование механизма регенеративной передачи импульса клетками эндотелия сосудистой стенки, материалы Всероссийской молодежной конференции “Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2012”, Саратов, Издательство Саратовского Университета, 42-44, 2012.

П10. Е. С. Стюхина, М. А. Курочкин, И. В. Федосов, В. В. Тучин, Д. Э. Постнов Оценка динамических характеристик капиллярного кровотока методами окклюзионной фотоплетизмографии и капилляроскопии, материалы VII съезда Российского фотобиологического общества, Пущино, 92, 2014.

П11. Е. С. Стюхина, М. О. Цой, М. А. Курочкин, В. А. Клочков, Д. Э. Постнов Оценка динамики микроциркуляции при венозной окклюзии верхней конечности, материалы Всероссийской молодежной конференции “Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2014”, Саратов, Издательство Саратовского Университета, 252-253, 2014.

П12. Е. С. Стюхина, Д. Э. Постнов Динамические паттерны вазореактивности Биология – наука XXI века: 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, Сборник тезисов, Пущино, 2018. С. 436.

П13. Е. С. Стюхина, Неганова А.Ю., Постнов Д.Э. Нелинейно-динамические аспекты механизмов распространяющейся вазодилатации, Биология – наука XXI века: 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 20-24 апреля 2015 г.). Сборник тезисов. Пущино, 114, 2015.

П14. Е. С. Стюхина, Д. Э. Постнов Исследование динамики кровотока в постмортальном периоде на ХАО куриного эмбриона, V Съезд биофизиков России. Материалы докладов : в 2 т. - Ростов-на-Дону : Издательство Южного федерального университета, т. 2, 279, 2015.

П15. Е. С. Стюхина, Д. Э. Постнов Модельная оценка гравитационного вклада в терминальные переходные процессы кровотока, Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине – 2015 : материалы Всерос. молодеж. конф. / под ред. проф. Д.А. Усанова. - Саратов: Изд-во Саратовский источник, 44, 2015.

П16. М. А. Кurochkin, Е. S. Stiukhina, I. V. Fedosov, D. E. Postnov, V. V. Tuchin Micro-PIV quantification of capillary blood flow redistribution caused by laser-assisted vascular occlusion // Proc. SPIE 9917, Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS), 99171T, 2016.

П17. М. А. Borozdova, Е. S. Stiukhina, А. А. Sdobnov, I. V. Fedosov, D. E. Postnov, V. V. Tuchin Quantitative measurement of blood flow dynamics in chorioallantoic membrane of chicken embryo using laser Doppler anemometry // Proc. SPIE 9917, Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS), 99170W, 2016.

П18. М. А. Kurochkin, Е. S. Stiukhina, I. V. Fedosov Adaptive micro-PIV for visualization of capillary network microcirculation using Niblack local binarization // Proc. SPIE 10336, Saratov Fall Meeting 2016: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII, 103360W, 2017.

П19. А. А. Namykin, Е. S. Stiukhina, I. V. Fedosov, D. E. Postnov Fluorescent angiography of chicken embryo and photobleaching velocimetry // Proc. SPIE 10336, Saratov Fall Meeting 2016: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII, 103360V, 2017.

П20. М. А. Kurochkin, Е. S. Stiukhina, I. V. Fedosov, V. V. Tuchin Blood flow velocity measurements in chicken embryo vascular network via PIV approach // Proc. SPIE 10716, Saratov Fall Meeting 2017: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX, 107160H, 2017.

П21. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ "VascuNet" № 2017661135 от 04.10.2017.