

Лазерная спекл-визуализация «автономии» мозгового кровообращения на уровне макро- и микроциркуляции у крыс

О.В.Семячкина-Глушкова, А.С.Абдурашитов, С.С.Синдеев, В.В.Тучин

С применением метода лазерной спекл-визуализации для одновременного исследования макро- и микроциркуляции церебральных сосудов у здоровых крыс показано, что механизмы поддержания «автономии» мозгового кровообращения зависят от исходного состояния организма и от пола особи. Фармакологическое дозозависимое стимулирование повышения периферического артериального давления не сопровождается ответами мозгового кровообращения аналогичной интенсивности, а проявляется в виде «сдерживающих» реакций – перераспределения кровотока на уровне макро- (у самок) и микроциркуляции (у самок и у самцов). Полученные результаты расширяют представления о значимости метода лазерной спекл-визуализации в нейрофизиологических исследованиях резервных возможностей ауторегуляции мозгового кровотока при формировании гипертензивного статуса.

Ключевые слова: лазерная спекл-визуализация, мозговой кровоток, макро- и микроциркуляция.

1. Введение

С появлением в конце XX века принципиально новых устройств для регистрации изображения, таких как ПЗС (прибор с зарядовой связью) и КМОП (комплементарная структура металл–оксид–полупроводник), методы спеклометрии стали активно внедряться в различные области исследований. Одним из самых популярных методов, особенно в биологии, стал метод лазерной спекл-визуализации потоков. Принцип его работы основан на конечности времени захвата кадра (времени экспозиции элемента КМОП или ПЗС) и на наличии флуктуаций интенсивности в рассеянном объектом спекл-поле. Причем характерное время флуктуаций должно быть меньше времени экспозиции камеры. При наблюдении этих условий те участки объекта, где имеет место движение, например эритроцитов в кровеносном сосуде, на изображении проявляются в виде локального «размытия» спекл-картины. Численно анализируя степень этого «размытия» и особенно его динамику, можно оценить параметры движения рассеивающих частиц, например эритроцитов [1].

Широкое распространение лазерная спекл-визуализация, или, более точно, визуализация спекл-контраста, получила из-за простой аппаратной части, представляющей собой высококогерентный источник излучения и камеру для регистрации спекл-картины. Основные достоинства метода состоят в возможности построения карты скоростей по относительно большому (5×5 мм и более) участку объекта без сканирования, в получении результатов

в реальном времени с высокой скоростью регистрации и в простоте его комбинирования с другими методами для мультимодального исследования биологических объектов [2–7].

Достоинства лазерной спекл-визуализации были использованы при создании нового инструментария нейрофизиологических исследований мозгового кровотока [2, 3, 8–10]. Изучение автономии мозгового кровообращения и ее независимости от изменений периферического артериального давления (ПАД) является одной из самых актуальных задач нейрофизиологии, поскольку нарушения этих процессов лежат в основе сосудистых катастроф мозга, например при инсульте [11]. Поддержание ауторегуляции мозгового кровоснабжения определяется процессами перераспределения кровотока между макро- и микроциркуляциями, механизмы которых остаются малоизученными и требуют пристального внимания исследователей. Применение метода лазерной спекл-визуализации для изучения этих процессов представляется перспективным, однако необходимы специальные инновации, способствующие расширению возможностей метода, в том числе и для одновременного исследования макро- и микроциркуляции сосудов головного мозга.

Изложенные выше соображения определили цель настоящих исследований, которая заключалась в изучении резервных возможностей ауторегуляционных механизмов мозговой гемодинамики с применением метода лазерной спекл-визуализации макро- и микроциркуляции при фармакологическом провоцировании откликов мозгового кровотока в случае изменении ПАД у самок и самцов крыс.

2. Материалы и методы исследования

Для измерения индекса мозгового кровотока применялся метод лазерной спекл-визуализации (LSCI) (рис.1). Аппаратная часть установки представляла собой высококогерентный линейно-поляризованный (300:1) источник лазерного излучения – He–Ne-лазер Thorlabs HNL210L (632.8 нм, 21 мВт). С помощью одномодового волоконного световода (Thorlabs PMC630-50B-APC) излучение

О.В.Семячкина-Глушкова, А.С.Абдурашитов, С.С.Синдеев. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; e-mail: glushkovskaya@mail.ru

В.В.Тучин. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Институт проблем точной механики и управления РАН, Россия, 410028 Саратов, ул. Рабочая, 24; Томский государственный университет, Россия, 634050 Томск, ул. Ленина, 36; e-mail: tuchin@sgu.ru

Поступила в редакцию 21 апреля 2016 г.

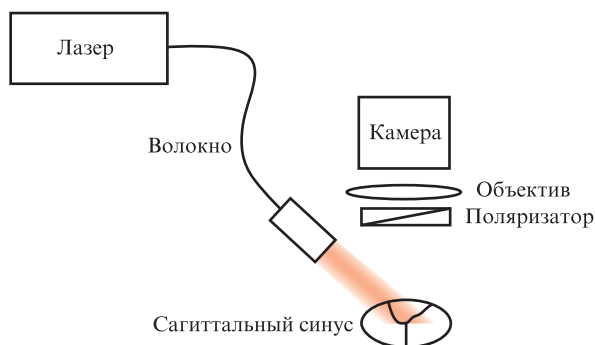


Рис.1. Принципиальная схема установки LSCI.

экспонировало кору головного мозга исследуемого животного. Субъективная спекл-картина объекта, формируемая объективом Computar M1614-MP2, регистрировалась КМОП-камерой (Basler acA2500-14 gm). Для комфортного соответствия критерию Найквиста (более двух пикселей на один спекл) апертурное число объектива устанавливалось равным $f/6$. Поляризационный фильтр перед объективом служил для отсекаания прямых (неинформативных) отражений и бликов от поверхности объекта.

Цифровая обработка зарегистрированных спекл-структур осуществлялась с использованием классической формулы для подсчета пространственного спекл-контраста [1]

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

где σ и $\langle I \rangle$ – стандартное отклонение и среднее значение интенсивности спекл-картины в скользящем окне. Скользящее окно представляет собой маску, попиксельно сдвигаемую вдоль строчек и столбцов изображения. Физически такой алгоритм разбивает исходное изображение на множество подизображений для подсчета локального спекл-контраста. В нашем случае размер окна был выбран равным 5×5 пикселей, что является компромиссом между сохранением приемлемого пространственного разрешения и достоверностью получаемых данных. При получении одного изображения усреднялись 50 последовательных кадров, обработанных таким образом.

Для получения информации об индексе кровотока на основе параметров зарегистрированной спекл-контрастной картины использовался алгоритм анализа гистограмм изображения (или его участков) [12, 13]. Основным его преимуществом является возможность автоматической дифференциации крупных магистральных и оптически неразрешимых сосудов. Наряду с этим данная методика позволяет исключить ошибку, которая возникает при простом усреднении значений спекл-контраста по участку изображения, имеющего асимметричную гистограмму. В этом случае полученное значение сдвигается от истинного в сторону асимметричного «хвоста» распределения (рис.2).

Необходимым условием корректной дифференциации сосудов является достаточное количество изображений сосудов различного диаметра в исследуемой области. В этом случае гистограмма такой области будет представлять собой отчетливое мультимодальное распределение, пригодное для дальнейшего анализа (рис.3).

Индекс кровотока определялся как величина, обратная спекл-контрасту, и в контрольной группе как у са-

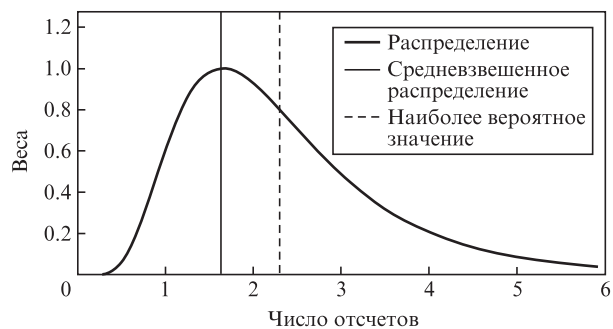


Рис.2. Иллюстрация ошибки, проявляющейся при усреднении значений спекл-контраста по участку изображения, имеющего асимметричную гистограмму. Такое распределение спекл-контраста может появляться при записи изображения с артефактами, например с неравномерностью освещения, а также может отражать «ненормальное» распределение значений спекл-контраста по сосуду. При анализе таких изображений в их гистограммах возникает асимметричное распределение. Простое усреднение по такому участку будет давать ошибочный результат, отличный от статистически наиболее вероятного значения, тем самым внося систематическую ошибку в измерения.

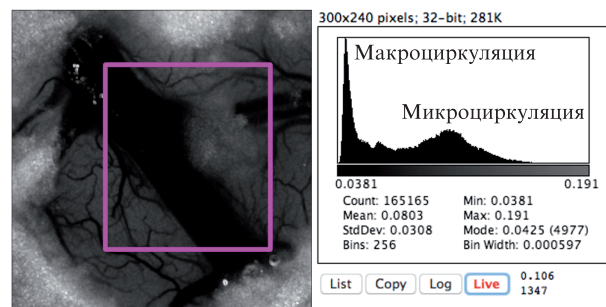


Рис.3. Пример бимодальной гистограммы в интересующей области (отражает макро- и микросоставляющие циркуляции крови).

мок, так и у самцов был принят за единицу. Его значение в других группах рассчитывалось относительно контрольного.

Важно отметить, какой физический смысл вкладывался нами в понятие «индекс кровотока». Как уже упоминалось, процедура интерпретации результатов лазерной спекл-контрастной визуализации представляет собой нетривиальную задачу.

В ставшей уже классической работе [14] показано фундаментальное различие между сигналами LSCI и доплеровской визуализации в отношении перфузии. Это различие связано с зависимостью сигнала спекл-визуализации как от скорости рассеивателей, так и от их концентрации. Еще более детальное исследование вопроса о привлечении таких понятий, как коэффициенты рассеяния и поглощения, было проведено в [15]. От этих двух параметров зависит величина спекл-контраста. Таким образом, изменение оптических свойств объекта может быть интерпретировано как изменение параметров кровотока. Последние исследования показали, что методом LSCI измеряется не поток или абсолютная скорость кровотока, а некая величина, пропорциональная произведению скорости на диаметр сосуда [16]. Поэтому при относительно постоянных рассеивающих свойствах объекта величина, обратная спекл-контрасту, может быть использована как качественная оценка скорости движения крови в сосуде.

Возможность оценки динамики кровотока в микрососудах была продемонстрирована в нескольких работах [3, 17]. Когда мы говорим о микроциркуляции, речь идет не об оптическом разрешении капилляров, а имеется в виду интегральная оценка значительного участка изображения, содержащего большое число оптически-неразрешимых сосудов. В настоящей работе использовался алгоритм для качественной оценки распределения скоростей в области изображения и дифференциации сосудов в нем [12]. Основным критерием отбора служила скорость движения эритроцитов, т. к. она сильно зависит от диаметра сосуда. В идеальном случае имеется бимодальная гистограмма распределения величин контраста с пиками макро- и микроциркуляции (рис.3). При попадании в исследуемую область сосудов промежуточного диаметра возможно присутствие дополнительных пиков, однако они легко устранимы простым переопределением интересующего нас участка изображения.

Исследования были выполнены на 10 самцах и 10 самках половозрелых крыс. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с принципами Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным [18]. Регистрация ПАД у бодрствующих крыс осуществлялась на компьютерно-вычислительном комплексе для прямого мониторинга кровяного давления у мелких животных (PowerLab/400 ML 401, ID Instruments, 2002, Австралия) с программным обеспечением Chart 4 и датчиками кровяного давления (MLT0699, PowerLab, ID Instruments). За сутки до экспериментов в бедренную артерию каждого животного под общей нембуталовой анестезией (0.40 мг/кг, ip) вживлялся полиэтиленовый катетер (рис.4). Стандартная операционная процедура по имплантации полиэтиленовых катетеров в сосуды подробно описана в [19]. В экспериментах использовались полиэтиленовые катетеры (ClayAdams, Parsippany, США), маркированные как BV31695-PE/1 (наружный диаметр 0.61 мм, внутренний диаметр 0.28 мм) и BV31695-PE/3 (наружный диаметр 0.96 мм, внутренний диаметр 0.58 мм).

Для послеоперационного восстановления животных помещали в индивидуальные клетки (0.3×0.25×0.2 м), эксперименты проводили спустя 24 ч после операции. Перед началом каждого опыта крысы адаптировались к экспериментальной обстановке в течение 30 мин. В этот период испытуемому животному через катетер вводили раствор гепарина для предотвращения тромбообразования на его стенках (Biochemi, Vienna/Austria 25000 ED/5 мл). Препарат вводили из расчета 1000 ED/0.2 мл гепарина (0.2 мл гепарина в 0.8 мл физиологического раствора).

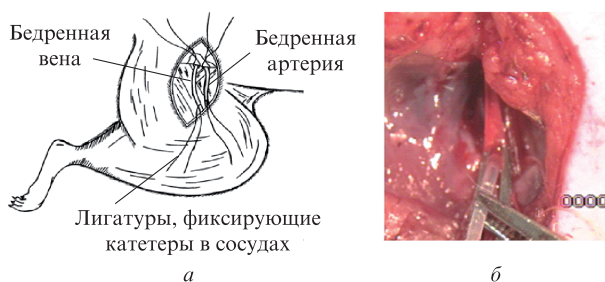


Рис.4. Имплантация полиэтиленовых катетеров в артериальные и венозные сосуды: схема наложения лигатур, фиксирующих катетеры (а), и фотография хирургической имплантации катетера в бедренную артерию (б).

С целью проведения фармакологических тестов животным под общей нембуталовой анестезией имплантировали полиэтиленовый катетер в бедренную вену (рис.4). Эксперимент осуществляли также через сутки после операции. Для фармакологического провоцирования гипертензивных скачков ПАД использовали мезатон (Sigma) в дозах 0.125, 0.25, 0.5 и 1 мг/кг. Выбор этого препарата был связан с необходимостью исключения прямого воздействия на сосуды мозга, поскольку мезатон не проходит через гематоэнцефалический барьер [20, 21].

Введение препаратов бодрствующим крысам осуществляли болюсным методом через дополнительный переходник, подсоединенный к венозному катетеру. Объем вводимого препарата составлял 100 мкл на 100 г веса животного.

Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с помощью пакета программ Statistica 5.0. Различия считались статистически значимыми при уровне достоверности $p < 0.05$.

3. Результаты исследования

Рассмотрим влияние мезатона на ПАД. Внутривенное введение препарата сопровождалось дозозависимым повышением ПАД у животных обоего пола (рис.5). Однако гипертензивные реакции на мезатон у самцов были более выраженными. Максимально яркие результаты получены на дозе 1 мг/кг, при которой различие в амплитудах увеличения ПАД составило 24% ($p < 0.05$).

Периферические гипертензивные реакции, индуцированные мезатонем, сопровождалось изменениями мозговой гемодинамики, причем у самок и самцов в разной степени. Так, у самок при подъеме ПАД от 148 ± 8 до 163 ± 10 мм рт.ст., что составляет 46%–61% ($p < 0.05$) от нормы (101 ± 5 мм рт.ст.), отмечалось повышение мозгового кровотока на 15%–16% ($p < 0.05$) как в венах, так и в сосудах микроциркуляции мозга (рис.6). В отличие от самок, у самцов в этих условиях ПАД было более высоким (168 ± 10 и 177 ± 12 мм рт.ст., повышение на 60% и 68% ($p < 0.05$) относительно нормы – 105 ± 7 мм рт.ст.), но только в микроциркуляторной сети приток крови к области перфузии достоверно увеличился на 13%–14% ($p < 0.05$) (рис.7).

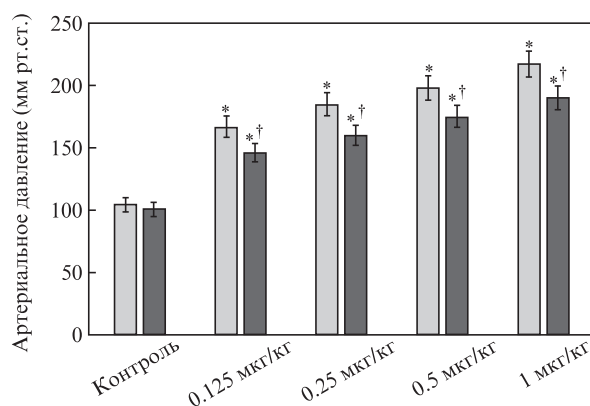


Рис.5. Изменения периферического артериального давления при фармакологическом провоцировании гипертензивных реакций на фоне введения мезатона в различных дозах у самок (■) и самцов (□) крыс. Обозначения статистической достоверности: * для $p < 0.05$, значения достоверны относительно контроля; † – значения достоверны между самками и самцами.

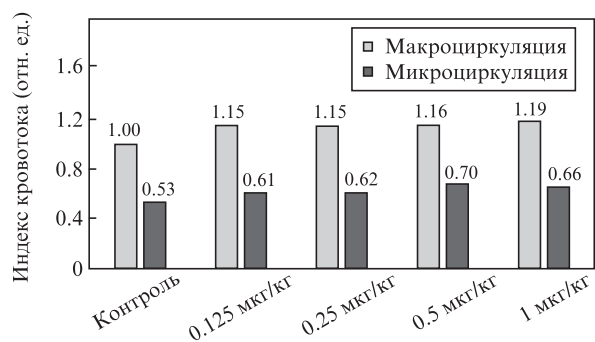


Рис.6. Динамика изменения индекса кровотока у самок.

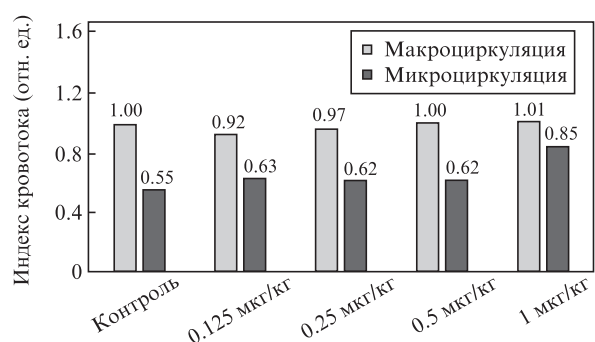


Рис.7. Динамика изменения индекса кровотока у самцов.

Повышение ПАД до 175 ± 10 мм рт.ст. у самок и до 198 ± 12 мм рт.ст. у самцов явилось «предельным» для первых, но не для вторых. Так, при дозе мезатона 1 мкг/кг у самок отмечались максимальные изменения в церебральной гемодинамике, которые были более выраженными на уровне микроциркуляции (32%, $p < 0.05$), чем в венозной части (19%, $p < 0.05$). У самцов, напротив, несмотря на большее повышение ПАД, изменения в церебральной гемодинамике продолжали оставаться в пределах нормы.

Интересно отметить, что «запредельное» увеличение ПАД (до 182 ± 11 мм рт.ст. у самок и до 215 ± 12 мм рт.ст. у самцов) не сопровождалось максимальными изменениями мозгового кровотока у первых, но вызывало чрезмерное повышение притока крови в область микроциркуляции у вторых (54%, $p < 0.05$).

На рис.8 приведен пример спекл-визуализации изменения мозгового кровотока на фоне фармакологиче-

ской гипертензии в зависимости от пола исследуемых животных.

Таким образом, гипертензивные реакции здорового организма на уровне периферического кровообращения отражаются на церебральной макро- (у самок) и микроциркуляции (у самок и у самцов) в виде повышения венозного кровотока (у самок) и повышения перфузии в области микрососудов (у самок и у самцов).

4. Обсуждение

В настоящей работе с помощью системы спекл-визуализации изучались отклики церебральной макро- и микроциркуляции на фармакологическое стимулирование периферических гипертензивных реакций у животных с учетом их пола. С этой целью применяли мезатон, который вызывает повышение ПАД за счет активации сосудистых $\alpha 1$ -адренорецепторов, не проникая в мозг, т.е. не проходя через гематоэнцефалический барьер [20, 21]. Этот факт стал ключевым при выборе препарата для изучения откликов церебральной гемодинамики, связанных с изменениями только ПАД, а не с непосредственным воздействием вазоактивных веществ на мозговой кровоток.

Введение мезатона сопровождалось дозозависимым повышением ПАД, уровни которого у самцов были выше, чем у самок. Эти данные согласуются с уже широко известным фактом, что гипертензивные реакции в мужском организме являются более интенсивными, чем в женском (как у людей, так и у животных) [22]. В наших предыдущих исследованиях было показано, что женский тип сосудистых реакций на гипертензию, т.е. на повышение тонуса сосудов, благоприятнее мужского [23, 24]. Это в значительной степени связано с более пластичными восстановительными механизмами, в силу чего в организме женщины исходный уровень ПАД восстанавливается быстрее.

Аналогичное заключение можно сделать, анализируя изменения мозгового кровотока при периферической гипертензии. Мы выявили, что у самок, в отличие от самцов, несмотря на более высокую реактивность венозного компонента церебральной гемодинамики и более чувствительные сдвиги в области микроциркуляции, церебральный кровоток стабилизировался после достижения критического повышения перфузии на уровне микроциркуляции (до 32%, $p < 0.05$), когда ПАД составляло 175 мм рт.ст.

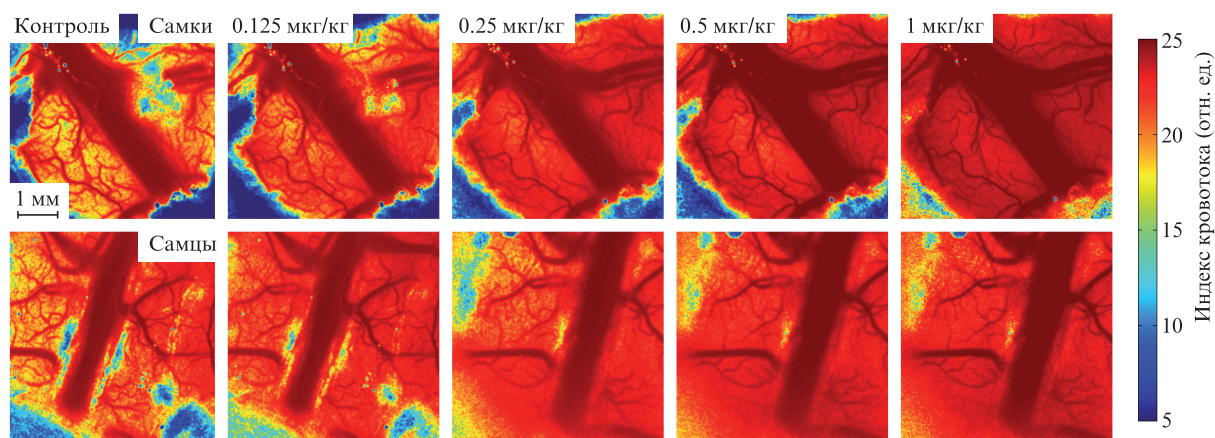


Рис.8. Иллюстрация динамики увеличения индекса кровотока у самок и самцов (численные данные представлены на рис.6 и 7).

В результате этих процессов введение максимальной дозы мезатона (1 мкг/кг), которая вызывала самое большое увеличение ПАД, сопровождалось более выраженными изменениями в микроциркуляции (до 54%, $p < 0.05$) только у самцов, тогда как у самок изменения на уровне макро- и микроциркуляции соответствовали таковым при средних дозах препарата.

Таким образом, критические изменения в ауторегуляции мозгового кровообращения при дозозависимом повышении ПАД происходят у самок быстрее (доза мезатона 0.5 мкг/кг, ПАД 175 мм рт.ст.), чем у самцов (1 мкг/кг, 215 мм рт.ст.). Однако у самок подключаются компенсаторные механизмы, которые сдерживают интенсивность откликов мозговых сосудов, тогда как у самцов сосудистая реактивность становится чрезмерной, превышающей таковую у самок по амплитуде в четыре раза ($p < 0.05$).

Важно отметить, что как у самок, так и у самцов вены мозга менее активно реагируют на повышение ПАД, чем сосуды микроциркуляции, что, очевидно, связано с особенностями сосудов мозга и с открытием артериовенозных шунтов при достижении ПАД 140 мм рт.ст. [25]. Эти процессы обеспечивают поддержание постоянства кровоснабжения тканей мозга кислородом на фоне значительного сужения периферических сосудов и, следовательно, затруднения доставки крови в мозг.

Однако стоит отметить, что данные результаты получены на здоровых животных. В наших предыдущих исследованиях с применением модели стресс-индуцированного развития инфаркта головного мозга мы показали, что предынсультное состояние характеризуется повышением венозного кровотока без видимых изменений микроциркуляции, которая реагирует на изменения только в постинсультный период [13]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у самок венозный компонент церебральной гемодинамики более чувствителен к периферическим изменениям ПАД, что свидетельствует о более эффективном перераспределении мозгового кровотока с целью снижения нагрузки на микрососуды мозга.

Даже при малых дозах мезатона у здоровых животных мы наблюдали отклики со стороны макро- (самки) и микро- (самцы) церебральной гемодинамики, т.е. при изменениях ПАД в пределах физиологических значений сосуды мозга дают отклики в виде повышения кровотока в них от 13% до 16% ($p < 0.05$). Эти данные подтверждаются аналогичными результатами других исследователей, которые также установили повышение кровотока мозга на 7% при увеличении ПАД в пределах 10 мм рт.ст. [26]. Это означает, что понятие ауторегуляции мозгового кровообращения является динамичным, зависящим от исходного состояния организма и от пола.

5. Заключение

Практическое применение интегрального алгоритма анализа спекл-контрастного изображения показало его эффективность при изучении механизмов «автономии» мозгового кровообращения. Мультимасштабная оценка распределения кровотока может служить средством оценки системного влияния (на сосуды разного размера) фармакологических агентов. Для ряда задач исследования церебрального кровотока, быстрота и качество получаемых результатов ставят метод LSCI на одинаковый, а с точки зрения простоты и быстроты действия даже на более

высокий уровень по сравнению с доплеровской флуометрией и доплеровской оптической когерентной томографией (ДОКТ).

Главным недостатком спекл-контрастного метода по сравнению с ДОКТ является относительно невысокий динамический диапазон измерения скоростей при использовании одной (фиксированной) экспозиции и довольно сложный процесс интерпретации результатов. Несмотря на наличие таких ограничений, положительные стороны данного метода, связанные с его более широким, чем у ДОКТ, пространственным разрешением позволили выявить важные закономерности в механизмах поддержки «автономии» мозгового кровообращения и резервных возможностей этих процессов. Установлено, что изменения ПАД в запрещенном (от 140 до 215 мм рт.ст.) физиологическом диапазоне не отражаются сильно на мозговом кровотоке, а проявляется в виде сдерживающих механизмов поддержания ауторегуляции церебрального кровоснабжения. У самок максимальные изменения в мозговом кровотоке происходят быстрее, но менее интенсивно, чем у самцов. Достижение критических сдвигов в церебральной гемодинамике на фоне гипертензивных реакций у самок сопровождается компенсаторной инертностью сосудов мозга к дальнейшему повышению ПАД, в то время как у самцов в этих условиях отмечается чрезмерная реактивность микроциркуляторного звена мозга. Церебральная гемодинамика у самок по сравнению с самцами пластичнее и адаптивнее к гипертензивным реакциям на периферии, что, возможно, является одним из механизмов их более высокой устойчивости к инсульту на фоне хронически высокого ПАД.

Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00128).

1. Fercher A.F., Briers J.D. *Opt. Commun.*, **37** (5), 326 (1981).
2. Dunn A.K., Bolay H., Moskowitz M.A., Boas D.A. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **21** (3), 195 (2001).
3. Dunn A.K. *Ann. Biomed. Eng.*, **40** (2), 367 (2012).
4. Boas D.A., Dunn A.K. *J. Biomed. Opt.*, **15** (1), 011109 (2010).
5. Виленский М.А., Семячкина-Глушковская О.В., Тимошина П.А., Кузнецова Я.В., Семячкин-Глушковский И.А., Агафонов Д.Н., Тучин В.В. *Квантовая электроника*, **42** (6), 489 (2012).
6. Postnov D.D., Holstein-Rathlou N.H., Sosnovtseva O. *Biomed. Opt. Express*, **6** (12), 5055 (2015).
7. Postnov D.D., Sosnovtseva O., Tuchin V.V. *J. Biophotonics*, **8** (10), 790 (2015).
8. Kalchenko V., Israeli D., Kuznetsov Y., Harmelin A. *Sci. Rep.*, **4**, 5839 (2014).
9. Miao P., Lu H., Liu Q., Li Y., Tong S. *J. Biomed. Opt.*, **16** (9), 090502 (2011).
10. Ayata C., Shin H.K., Salomone S., Ozdemir-Gursoy Y., Boas D.A., Dunn A.K., Moskowitz M.A. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **24**, 1172 (2004).
11. Jordan J.D., Powers W.J. *Am. J. Hypertens.*, **25** (9), 946 (2012).
12. Abdurashitov A.S., Lychagov V.V., Sindeeva O.A., Semyachkina-Glushkovskaya O.V., Tuchin V.V. *Front. Optoelectron.*, **8** (2) 187 (2015).
13. Semyachkina-Glushkovskaya O., Pavlov A., Kurths J., Borisova E., Gisbrecht A., Sindeeva O., Abdurashitov A., Shirokov A., Navolokin N., Zinchenko E., Gekalyuk A., Ulanova M., Zhu D., Luo Q., Tuchin V. *Biomed. Opt. Express*, **6** (10), 4088 (2015).
14. Briers D., Duncan D.D., Hirst E., Kirkpatrick S.J., Larsson M., Steenbergen W., Stromberg T., Thompson O.B. *J. Biomed. Opt.*, **18** (6), 066018 (2013).
15. Khaksari K., Kirkpatrick S. *J. SPIE BiOS. Int. Soc. Opt. Photon.*, **9322**, 93220U (2015).
16. Kazmi S.S., Faraji E., Davis M.A., Huang Y.Y., Zhang X.J., Dunn A.K. *Biomed. Opt. Express*, **6** (7), 2588 (2015).

17. Domoki F., Zölei D., Oláh O., Tóth-Szüki V., Hopp B., Bari F., Smausz T. *Microvascular Res.*, **83** (3), 311 (2012).
18. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Washington, DC: The National Academies Press, 2011). <http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf>.
19. Семьякина-Глушковская О.В. *Докт. дис.* (Астраханский государственный университет, Астрахань, 2011).
20. Olesen J. *Neurology*, **22**, 978 (1972).
21. Meng L., Gelb A.W., Alexander B.S., Cerussi A.E., Tromberg B.J., Yu Z., Mantulin W.W. *Br. J. Anaesth.*, **108** (5), 815 (2012).
22. Doumas M., Papademetriou V., Faselis C., Kokkinos P. *Curr. Hypertens. Rep.*, **15** (4), 321 (2013).
23. Semyachkina-Glushkovskaya O., Anishchenko T., Kapralov S., Novikov R., Skvorcov K., Kuznecova Y., Kuznecova A. *Health*, **2** (8), 897 (2010).
24. Anishchenko T., Igosheva N., Yakusheva T., Glushkovskaya-Semyachkina O., Khokhlova O. *Eur. J. Appl. Physiol.*, **85** (3-4), 287 (2001).
25. Khurana I. *Medical Physiology for Undergraduate Students* (New Delhi: Elsevier Health Sci., 2012).
26. Heistad D.D., Kontos H.A. In *Handbook of Physiology, Section 2: The Cardiovascular System Volume III, Peripheral Circulation and Organ Blood Flow, Part 1*. Ed. by Shepherd J.T., Abboud F.M. (Washington, DC: American Physiol. Soc., 1983, pp 137–182).