

## **КОНТРОЛЬ, ДИАГНОСТИКА, ИСПЫТАНИЯ**

УДК 616–079.5+535.372

В.В. ДРЁМИН, Е.В. ДРЁМИНА, Е.В. ЖАРКИХ, Е.В. ПОТАПОВА,  
Е.А. АЛИМИЧЕВА, Г.И. МАСАЛЫГИНА, А.В. ДУНАЕВ

### **ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СОЧЕТАННЫХ МЕТОДОВ ОПТИЧЕСКОЙ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ТКАНЕЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ**

*В работе показаны возможности сочетанного применения методов оптической неинвазивной диагностики (флуоресцентной спектроскопии и лазерной доплеровской флоуметрии) при исследовании жизнеспособности тканей пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Проведена серия экспериментальных исследований на 15 пациентах эндокринологического отделения, а также на условно здоровых добровольцах. На основании полученных данных выявлено, что предложенный оригинальный метод может быть использован для диагностики нарушений микроциркуляторного русла и тканевого метаболизма в нижних конечностях пациентов на ранних стадиях, в том числе для уточнения патогенеза «диабетической стопы».*

**Ключевые слова:** *оптическая неинвазивная диагностика, флуоресцентная спектроскопия, лазерная доплеровская флоуметрия, микроциркуляция крови, метаболизм.*

Одним из путей к повышению качества в современной клинической практике, а также в практике передовых медико–биологических исследований является использование методов оптической диагностики. Преимущество таких методов связано с их неинвазивностью, хорошей разрешающей способностью, низкой себестоимостью процедуры, высокой производительностью. Перспективным направлением развития оптической диагностики является создание научных и инструментальных основ для создания методов *in vivo* анализа биологической ткани с целью оперативного определения ее жизнеспособности [1–7].

Одним из возможных приложений данных методов может быть диагностика нарушений, происходящих при осложнениях в нижних конечностях больных сахарным диабетом 2–го типа (СД). В настоящее время согласно Международной диабетической федерации (International Diabetes Federation – IDF) проблема диагностики на ранних стадиях и контроль эффективности лечения СД является одной из самых острых в современном здравоохранении. Медицинская, социальная и экономическая значимость СД в первую очередь определяется высокой распространенностью этого заболевания, а также частотой развития у пациентов инвалидизирующих и снижающих качество жизни осложнений. По данным IDF, в 2015 г. насчитывалось 415 млн больных СД и эта цифра вырастет до 642 млн к 2040 г.

В связи с этим предлагается объединение часто используемого на сегодняшний день метода лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с методом флуоресцентной спектроскопии (ФС), что может позволить комплексно анализировать жизнеспособность тканей у больных СД, что потенциально увеличит информативность и достоверность получаемых диагностических результатов и позволит выявлять нарушения в системе микроциркуляции крови и метаболических процессах биоткани стоп конечностей на более ранних стадиях.

Метаболическая активность является важным параметром жизнеспособности ткани. Одной из оценок метаболической активности является соотношение коферментов NADH и FAD, определяемое по интенсивности их эндогенной флуоресценции. Известно, что одним из последствий нарушений в функционировании клеток при различных патологиях являются изменения в дыхательной цепи митохондрий. При этом наиболее вероятны изменения в

накоплении таких коферментов как NADH (восстановленная форма) и FAD (окисленная форма). Выявление таких изменений методами флуоресцентной спектроскопии является одним из многообещающих направлений *in vivo* диагностики [8, 9].

Таким образом, целью данной работы явилась попытка экспериментально изучить и проанализировать потенциальные возможности сочетанной регистрации параметров кровотока и флуоресценции кожных коферментов для диагностики нарушений в нижних конечностях больных сахарным диабетом 2 типа.

В комплексных экспериментальных исследованиях оценивались перфузия ткани кровью методом ЛДФ и содержание коферментов NADH и FAD методом ФС. Регистрация параметров перфузии и амплитуд флуоресценции коферментов обеспечивалась комплексом «ЛАЗМА МЦ» (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия) одновременно и в одном объеме ткани. В доплеровском канале применялся лазерный модуль с длиной волны излучения 1064 нм, для возбуждения флуоресценции NADH и FAD использовались источники на длинах волн излучения 365 нм и 450 нм соответственно. Доставка зондирующего излучения и прием обратно отраженного от ткани вторичного излучения осуществлялась одним оптическим волоконным зондом одновременно двумя каналами (рисунок 1).

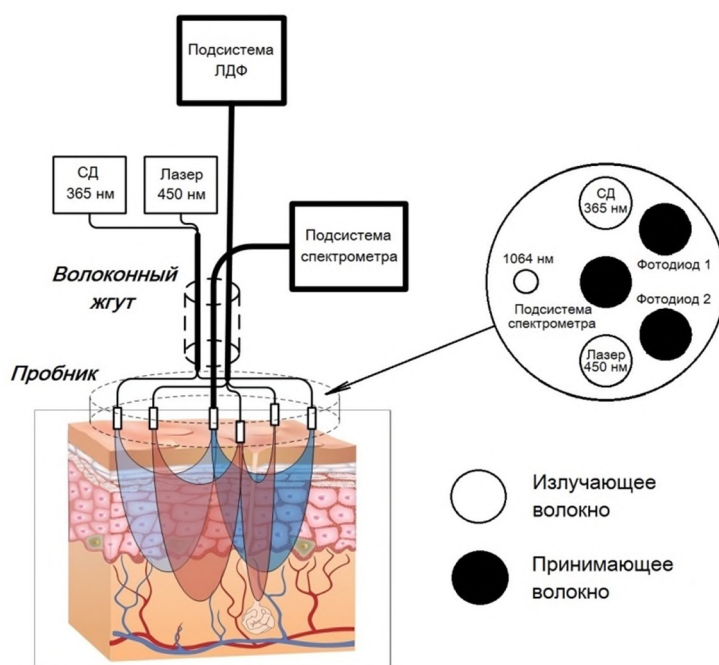


Рисунок 1 – Общая схема диагностического комплекса «ЛАЗМА МЦ»

В экспериментальных исследованиях приняли участие 15 пациентов с сахарным диабетом 2-ого типа в возрасте  $63 \pm 7$  лет эндокринологического отделения БУЗ Орловской области «Орловская областная клиническая больница». В исследование включали пациентов с длительным периодом заболевания и высоким уровнем гликированного гемоглобина (средний уровень –  $8,9 \pm 2,4\%$ ) и находящихся в зоне риска развития диабетической стопы. Контрольную группу составили 15 условно здоровых добровольцев схожего возраста (средний возраст  $53 \pm 5$  лет). Участники подписывали информированное согласие с указанием их готовности к участию в исследовании.

Производились фоновые записи (по 5 мин) в 2-х точках тыльной стороны стопы (1-я верхняя точка на медиальной линии стопы вверху, 2-я нижняя точка на линии между 1-й и 2-й плюсневыми костями) на 2-х ногах (схема расположения волокон представлена на рисунке 2). Причём, комплексом «ЛАЗМА МЦ» пара спектров регистрировалась за время записи перфузии в 30 с, таким образом за время диагностической процедуры всего было зарегистрировано 10 пар спектров.

Анализируемыми параметрами были амплитуды флуоресценции  $I_{NADH}$  и  $I_{FAD}$ , нормированные на интенсивность обратноотраженного излучения возбуждения  $I_{365}$  и  $I_{450}$  соответственно, редокс-отношение  $[Redox]$ , средняя перфузия ткани кровью  $I_m$ , а также предложенный комплексный параметр, характеризующий интенсивность метаболических процессов – показатель метаболизма  $MR$ :

$$[Redox] = \frac{I_{NADH}}{I_{FAD}} \cdot \frac{I_{450}}{I_{365}}, \quad (1)$$

$$MR = \frac{[Redox]}{I_m}. \quad (2)$$



Рисунок 2 – Схема расположения волокон при проведении исследований

Для каждого исследования длительностью 5 мин все диагностические параметры усреднялись за 10 измерений.

Так как заранее известно разделение экспериментальных данных на классы (пациенты и контрольная группа), то был использован метод линейного дискриминантного анализа для определения дискриминантной функции, позволяющей синтезировать искомое решающее правило, которое позволит вновь появляющийся объект отнести к одному из этих классов на основании значений измеренных параметров (переменных). Основная идея заключается в том, чтобы определить, отличаются ли разные совокупности по среднему какой-либо переменной (или линейной комбинации переменных), и затем использовать эту переменную, чтобы предсказать для новых членов их принадлежность к той или иной группе [10, 11]. Оценка качества дискриминантного анализа была проведена с использованием ROC-кривой.

На первой стадии анализа экспериментальных данных было проведено сравнение результатов, полученных во всех точках двух ног отдельно для группы пациентов и отдельно для контрольной группы. Статистических различий (по критерию Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ) для двух групп выявлено не было. Учитывая тот факт, что нарушения на начальных стадиях при диабете зачастую имеют зональный (гетерогенный) характер, можно говорить о высокой степени нарушений в биотканях пациентов, что согласуется с априорной информацией об их состоянии. Таким образом, было решено анализировать совокупности из 60 экспериментов (4x15) как для группы пациентов, так и для контрольной группы. Также была проверена и подтверждена по критерию Колмогорова-Смирнова гипотеза о нормальности распределения исследуемых выборок.

Первый этап экспериментальных исследований показал, что у больных СД наблюдаются повышенные значения нормированных амплитуд NADH и FAD. Подтверждена статистическая значимость различий (таблица 1, рисунок 3).

Для синтеза решающего правила в качестве анализируемых параметров предлагается использовать нормированные амплитуды флуоресценции коферментов (с позиций максимальной чувствительности к изменению физиологических показателей в сравнении с редокс-отношением) и перфузию. Предварительно было установлено, что эти параметры удовлетворяют принципам статистической независимости.

Таблица 1 – Результаты исследований

Параметр	Контроль	Диабет
Нормированная амплитуда $I_{NADH}$ , отн.ед.	3,1±0,6	3,6±1,2*
Нормированная амплитуда $I_{FAD}$ , отн.ед.	1,1±0,2	1,8±0,6*
Перфузия $I_m$ , пф.ед.	6,0±2,6	6,6±2,4
[Redox], отн.ед.	3,1±0,6	2,1±0,4*
Показатель метаболизма $MR$ , отн.ед.	0,6±0,3	0,4±0,1*

\* – Статистическая значимость различий подтверждена по критерию Манна–Уитни ( $p < 0.05$ )

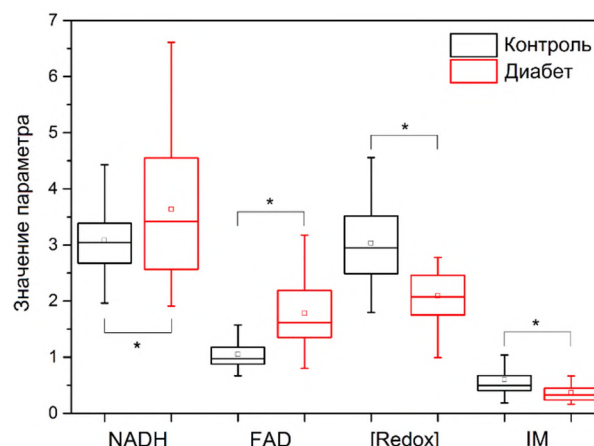


Рисунок 3 – Диаграмма размаха полученных параметров для двух групп. Центральная линия является медианой, края бокса – нижняя и верхняя квартили (25-я и 75-я)

На рисунке 4 представлены результаты проведенного линейного дискриминантного анализа. Средний уровень ошибки (среднее между ошибкой первого и второго рода) составил 15 %.

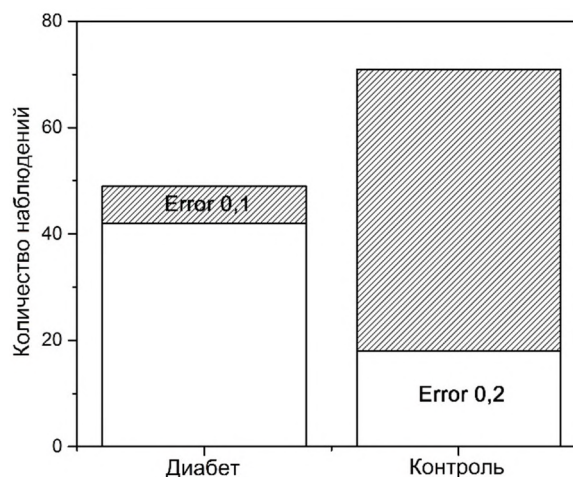
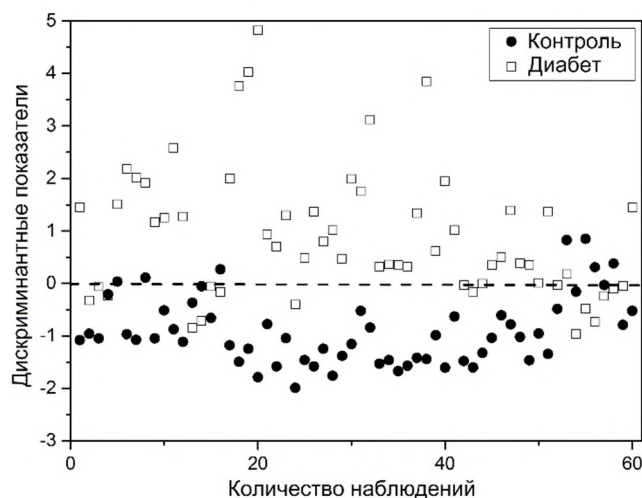


Рисунок 4 – Результаты линейного дискриминантного анализа. Пунктирная линия обозначает пороговое значение, представляющее собой средневзвешенное двух центроидов для каждой из групп

Тот факт, что экспериментальные данные могут быть сгруппированы, означает, что вариации показателей нарушения биоткани ткани от контрольной группы достаточно воспроизводимы и аналогичны у всех пациентов.

На рисунке 5 представлена ROC-кривая, вычисленная для полученной дискриминантной функции.

ROC-анализ предусматривает сравнение таких операционных характеристик правила, как чувствительность (доля волонтеров, которые верно отнесены правилом к первой группе) и специфичность (доля волонтеров, которые верно отнесены правилом ко второй группе).

Для сравнения качества различных классифицирующих правил удобно использовать интегральную характеристику AUC (Area Under Curve) – площадь под ROC-кривой.

Ситуация, при которой ROC–кривая совпадает с диагональю (в этом случае  $AUC=0,5$ ), соответствует случайному угадыванию, а решающее правило с такими характеристиками является бесполезным. Для идеального правила величина  $AUC=1$ , поэтому считается, что чем ближе  $AUC$  к единице, тем качественнее правило. В нашем случае  $AUC=0,93$ , что говорит о хорошем качестве модели классификации.

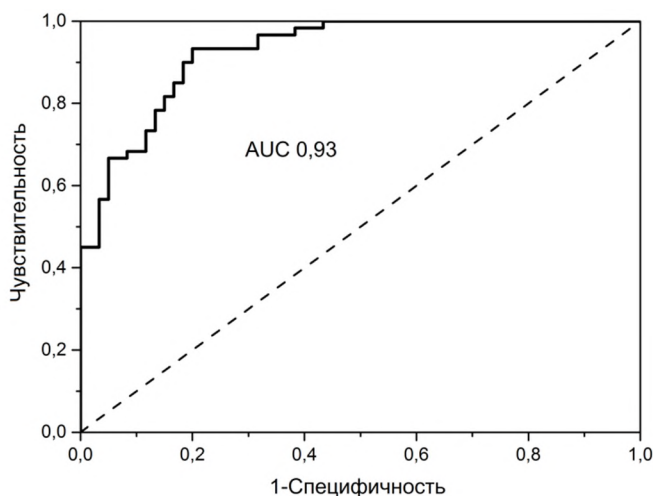


Рисунок 5 – ROC–кривая оценки эффективности дискриминантного анализа

Для уменьшения ошибки классификации видится перспективным проведение исследований с применением функциональных тестов для получения более достоверных различий и уменьшения ошибки. Так, тепловое локальное воздействие может помочь с большей точностью проводить дифференциацию наличия или отсутствия микроциркуляторно–тканевых нарушений.

Для практического применения при фоновых записях возможно использовать комплексный параметр  $MR$ , позволяющий дифференцировать состояние микроциркуляторного русла и метаболизма биоткани. При его применении появляется возможность анализировать кровоток и метаболические процессы, тесно взаимосвязанные друг с другом. Выбор данного параметра связан с фундаментальным принципом «доставки–потребления кислорода». Предложенный параметр представляет собой оценку баланса доставки крови (уровень перфузии) и потребления кислорода (амплитуды  $NADH$  и  $FAD$ ). Так, средний уровень  $MR$  для исследованной группы пациентов составил  $0,4 \pm 0,1$  отн.ед., для контроля –  $0,6 \pm 0,3$  отн.ед.

Проведенные пилотные экспериментальные исследования позволяют выявлять нарушения нижних конечностей у пациентов с СД. Показана высокая чувствительность оптических неинвазивных методов (лазерной доплеровской флоуметрии и флуоресцентной спектроскопии) при их сочетанном применении для выявления нарушений в гемодинамических и метаболических процессах биоткани при СД.

Исследования на пациентах эндокринологического профиля показывают, что предложенный оригинальный подход может быть использован для диагностики нарушений микроциркуляторного русла и тканевого метаболизма в нижних конечностях пациентов на ранних стадиях, в том числе для уточнения патогенеза «диабетической стопы».

*Работа выполнена в рамках базовой части государственного задания Минобрнауки РФ для ФГБОУ ВПО «Государственный университет–УНПК» (№310).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крупаткин, А.И. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно–тканевых систем: колебания, информация, нелинейность: руководство для врачей / А.И. Крупаткин, В.В. Сидоров. – М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2013. – 496 с.
2. Dunaev, A.V. Individual variability analysis of fluorescence parameters measured in skin with different levels of nutritive blood flow / A.V. Dunaev, V.V. Dremin, E.A. Zherebtsov, I.E. Rafailov, K.S. Litvinova, S.G. Palmer, N. A. Stewart, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // Journal Medical Engineering & Physics. – 2015. – 37 (6). – P. 574–583.

3. Rafailov, I.E. Computational model of bladder tissue based on its measured optical properties / I.E. Rafailov, V.V. Dremmin, K.S. Litvinova, A.V. Dunaev, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // Journal of Biomedical Optics. – 2016. – 21 (2). – P. 025006–025006.
4. Дунаев, А.В. Анализ индивидуальной вариабельности параметров в лазерной флуоресцентной диагностике / А.В. Дунаев, В.В. Дрёмин, Е.А. Жеребцов, С.Г. Палмер, С.Г. Соколовский, Э.У. Рафаилов // Биотехносфера. – 2013. – № 2 (26). – С. 39–47.
5. Оптическая биомедицинская диагностика: в 2 т. Т. 2 / Пер. с англ. под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. – 368 с.
6. Dunaev, A.V. Investigating tissue respiration and skin microhaemocirculation under adaptive changes and the synchronization of blood flow and oxygen saturation rhythms / A.V. Dunaev, V.V. Sidorov, A.I. Krupatkin, I.E. Rafailov, S.G. Palmer, N.A. Stewart, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // Physiological Measurement. – 2014. – 35 (4). – P. 607–621.
7. Дрёмин, В.В. Влияние содержания меланина в коже на формирование сигнала флуоресцентной спектроскопии / В.В. Дрёмин, А.В. Дунаев // Оптический журнал. – 2016. – № 1 (83). – С. 57–64.
8. Bartolome, F. Measurement of mitochondrial NADH and FAD autofluorescence in live cells / F. Bartolome, A.Y. Abramov // Methods Mol Biol. – 2015. – 1264. – P. 263–270.
9. Mayevsky, A. Oxidation–reduction states of NADH in vivo: From animals to clinical use / A. Mayevsky, B. Chance // Mitochondrion. – 2007. – 7 (5). – P. 330–339.
10. Klecka, W.R. Discriminant Analysis // Sage University Paper Series on Quantitative Applications in the Social Sciences. – 1980. – P. 07–019.
11. Lachenbruch, P.A. Discriminant Analysis // Biometrics. – 1979. – 35. – P. 69–85.

**Дрёмин Виктор Владимирович**  
ФГБОУ ВО «ПГУ», г. Орёл, Россия  
Аспирант кафедры  
«Приборостроение, метрология и сертификация» учебно–научно–исследовательского института информационных технологий, стажер–исследователь научно–образовательного центра «Биомедицинская инженерия»  
Тел.: +7–4862–41–98–76  
E–mail: dremmin\_viktor@mail.ru

**Потапова Елена Владимировна**  
ФГБОУ ВО «ПГУ», г. Орёл, Россия  
Доцент кафедры  
«Приборостроение, метрология и сертификация» учебно–научно–исследовательского института информационных технологий, кандидат технических наук  
Тел.: +7–4862–41–98–76  
E–mail: elenasweet2007@gmail.com

**Жарких Елена Валерьевна**  
ФГБОУ ВО «ПГУ», г. Орёл, Россия  
Студентка кафедры  
«Приборостроение, метрология и сертификация» учебно–научно–исследовательского института информационных технологий, сотрудник студенческого конструкторского бюро биомедицинских инженерных исследований (СКБ БМИИ) научно–образовательного центра «Биомедицинская инженерия»  
Тел. +7 (4862) 41–98–76  
E–mail: loread@mail.ru

**Дрёмина Екатерина Вячеславовна**  
ФГБОУ ВО «ПГУ», г. Орёл, Россия  
Сотрудник научно–образовательного центра «Биомедицинская инженерия»  
Тел.: +7–4862–41–98–76  
E–mail: ichiebanienko@mail.ru

**Алимичева Елена Александровна**  
БУЗ Орловской области «ООКБ», г. Орёл, Россия  
Заведующая отделением – врач–эндокринолог  
Тел.: +7–4862–46–59–50

**Масальгина Галина Ивановна**  
БУЗ Орловской области «ООКБ», г. Орёл, Россия  
Главный внештатный специалист эндокринолог  
Тел.: +7–4862–46–59–50

**Дунаев Андрей Валерьевич**  
ФГБОУ ВО «ПГУ», г. Орёл, Россия  
Ведущий научный сотрудник научно–образовательного центра «Биомедицинская инженерия», кандидат технических наук, доцент кафедры «Приборостроение, метрология и сертификация» учебно–научно–исследовательского института информационных технологий  
Тел.: +7–4862–41–98–76  
E–mail: dunaev@bmeccenter.ru

V. V. DREMIN, E. V. DREMINA, E. V. ZHARKIKH, E. V. POTAPOVA,  
E. A. ALIMICHEVA, G. I. MASALYGINA, A. V. DUNAEV

## POSSIBILITIES APPLICATION OF COMBINED METHODS OF OPTICAL NONINVASIVE DIAGNOSIS FOR TISSUE OF LOWER LIMBS VIABILITY STUDY IN PATIENTS WITH DIABETES

*The paper shows the possibility of using optical non–invasive diagnostic methods (fluorescence spectroscopy and laser Doppler flowmetry) in the study of patients with type 2 diabetes. Was held a series of experimental studies on 15 patients from the Endocrinology division, as well as*

*apparently healthy volunteers. Studies of the patients endocrinological profile show that the proposed original method can be used to diagnose disorders of the microvasculature and metabolism in the lower limbs of patients at the early stages of the disease and clarify the pathogenesis of «diabetic foot».*

**Keywords:** optical non-invasive diagnostics, fluorescence spectroscopy, laser Doppler flowmetry, system of blood microcirculation, metabolism.

## BIBLIOGRAPHY

1. Krupatkin, A.I. Funktsionalnaya diagnostika sostoyaniya mikrotsirkulyatorno–tkanevykh sistem: kolebaniya, informatsiya, nelineynost: rukovodstvo dlya vrachey / A.I. Krupatkin, V.V. Sidorov. – M.: Knizhnyy dom «LIBROKOM», 2013. – 496 s.
2. Dunaev, A.V. Individual variability analysis of fluorescence parameters measured in skin with different levels of nutritive blood flow / A.V. Dunaev, V.V. Dremmin, E.A. Zherebtsov, I.E. Rafailov, K.S. Litvinova, S.G. Palmer, N. A. Stewart, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // Journal Medical Engineering & Physics. – 2015. – 37 (6). – P. 574–583.
3. Rafailov, I.E. Computational model of bladder tissue based on its measured optical properties / I.E. Rafailov, V.V. Dremmin, K.S. Litvinova, A.V. Dunaev, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // Journal of Biomedical Optics. – 2016. – 21 (2). – P. 025006–025006.
4. Dunayev, A.V. Analiz individualnoy variabelnosti parametrov v lazernoy fluorestsentnoy diagnostike / A.V. Dunayev, V.V. Dromin, Ye.A. Zherebtsov, S.G. Palmer, S.G. Sokolovskiy, E.U. Rafailov // Biotekhnosfera. – 2013. – № 2 (26). – S. 39–47.
5. Opticheskaya biomeditsinskaya diagnostika: v 2 t. T. 2 / Per. s angl. pod red. V. V. Tuchina. M.: Fizmatlit, 2007. – 368 s.
6. Dunaev, A.V. Investigating tissue respiration and skin microhaemocirculation under adaptive changes and the synchronization of blood flow and oxygen saturation rhythms / A.V. Dunaev, V.V. Sidorov, A.I. Krupatkin, I.E. Rafailov, S.G. Palmer, N.A. Stewart, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // Physiological Measurement. – 2014. – 35 (4). – P. 607–621.
7. Dromin, V.V. Vliyaniye soderzhaniya melanina v kozhe na formirovaniye signala fluorestsentnoy spektroskopii / V.V. Dromin, A.V. Dunayev // Opticheskyy zhurnal. – 2016. – № 1 (83). – S. 57–64.
8. Bartolome, F. Measurement of mitochondrial NADH and FAD autofluorescence in live cells / F. Bartolome, A.Y. Abramov // Methods Mol Biol. – 2015. – 1264. – P. 263–270.
9. Mayevsky, A. Oxidation–reduction states of NADH in vivo: From animals to clinical use / A. Mayevsky, B. Chance // Mitochondrion. – 2007. – 7 (5). – P. 330–339.
10. Klecka, W.R. Discriminant Analysis // Sage University Paper Series on Quantitative Applications in the Social Sciences. – 1980. – P. 07–019.
11. Lachenbruch, P.A. Discriminant Analysis // Biometrics. – 1979. – 35. – P. 69–85.

**Dremmin Victor Vladimirovich**  
Prioksky State University, Oryol,  
Russia  
Postgraduate student degree of the  
Department «Instrumentation,  
metrology and certification» of  
Educational and Research Institute of  
Information Technology, Early stage  
researcher of scientific–educational  
center «Biomedical Engineering»  
Tel.: +7–4862–41–98–76  
E–mail: dremmin\_viktor@mail.ru

**Potapova Elena Vladimirovna**  
Prioksky State University, Oryol,  
Russia  
PhD, Docent of the Department  
«Instrumentation, metrology and  
certification» of Educational and  
Research Institute of Information  
Technology  
Tel.: +7–4862–41–98–76  
E–mail: elenasweet2007@gmail.com

**Zharkikh Elena Valerievna**  
Prioksky State University, Oryol,  
Russia  
Student of the Department  
«Instrumentation, metrology and  
certification», a member of the  
Student Design Bureau of Biomedical  
Engineering Research (SDB BMER)  
scientific and educational center  
«Biomedical Engineering»  
Tel.: +7–4862–41–98–76  
E–mail: loread@mail.ru

**Dremina Ekaterina Vyacheslavovna**  
Prioksky State University, Oryol,  
Russia  
Employee of scientific–educational  
center «Biomedical Engineering»  
Tel.: +7–4862–41–98–76  
E–mail: ichiebanienko@mail.ru

**Alimicheva Elena Alexandrovna**  
Endocrinology Department «Oryol  
Regional Clinical Hospital», Oryol,  
Russia  
Head of department – Endocrinologist  
Tel.: +7–4862 46–59–50

**Masalygina Galina Ivanovna**  
Endocrinology Department «Oryol  
Regional Clinical Hospital», Oryol,  
Russia  
Head Specialist Endocrinologist  
Tel.: +7–4862 46–59–50

**Dunaev Andrey Valerievich**  
Prioksky State University, Oryol, Russia  
Leading Research Fellow of scientific–educational center «Biomedical Engineering», PhD, Docent of the Department  
«Instrumentation, metrology and certification» of Educational and Research Institute of Information Technology  
Tel.: +7–4862–41–98–76  
E–mail: dunaev@bmececenter.ru