

ГЕОМЕТРИЧЕСКАЯ
И ПРИКЛАДНАЯ ОПТИКА

УДК 535.372+616-079.5

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К НЕИНВАЗИВНОЙ ОЦЕНКЕ
МИКРОЦИРКУЛЯТОРНО-ТКАНЕВЫХ НАРУШЕНИЙ В СТОПАХ
ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ МЕТОДАМИ
СПЕКТРОСКОПИИ

© 2017 г. Е. В. Потапова^{a,*}, В. В. Дремин^a, Е. А. Жеребцов^{a,b}, И. Н. Маковик^a, Е. В. Жарких^a,
А. В. Дунаев^a, О. В. Пилипенко^a, В. В. Сидоров^c, А. И. Крупаткин^d

^aОрловский государственный университет им. И.С. Тургенева, 302026 Орел, Россия

^bAston University, Aston Institute of Photonic Technologies, School of Engineering and Applied Sciences,
B4 7ET Birmingham, United Kingdom

^cНаучно производственное предприятие “ЛАЗМА”, 123458 Москва, Россия

^dЦентральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова,
127299 Москва, Россия

*E-mail: potapova_ev_ogu@mail.ru

Поступила в редакцию 06.06.2017 г.

В окончательной редакции 18.07.2017 г.

Оценена возможность комплексного подхода для исследования изменений в системе микроциркуляции крови и метаболических процессах биоткани нижних конечностей с помощью оптических неинвазивных методов – лазерной доплеровской флоуметрии, флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии диффузного отражения в сочетании с различными режимами тепловых проб. Исследовано 76 больных сахарным диабетом 2-го типа, из которых 14 имели видимые трофические нарушения на стопах ног, и 48 условно здоровых добровольцев. Проанализированы параметры сигналов ЛДФ, спектров интенсивности флуоресценции и диффузного отражения кожных покровов стоп. Получены статистически значимые различия в регистрируемых параметрах между обследуемыми группами. Сделаны выводы о том, что сочетанное применение неинвазивных методов спектроскопии может быть использовано для диагностики осложнений как при проявлении первичных признаков диабета, когда патологические изменения еще обратимы, так и при наличии уже имеющих нарушений для предотвращения усугубления течения болезни и подбора адекватной коррекции лечения.

DOI: 10.7868/S0030403417120145

ВВЕДЕНИЕ

По данным, опубликованным Международной Федерацией Диабета (IDF), в настоящее время в мире 415 миллионов людей страдают сахарным диабетом, еще более 300 миллионов с нарушением толерантности к глюкозе входят в группу высокого риска. По прогнозам количество людей с диагнозом “сахарный диабет” (СД) к 2040 г. вырастет до 642 миллионов. Высокий уровень гликемии при СД может привести к серьезным заболеваниям, поражающим сердце и кровеносные сосуды, глаза, почки, нервы, вызывая ряд осложнений, которые приводят к высокому риску развития инвалидности и угрожают жизни.

Одним из серьезных осложнений СД, значительно снижающим качество жизни, является синдром диабетической стопы (СДС). СДС объединяет ряд поражений стоп вследствие повре-

ждения нервов и кровеносных сосудов. Это может стать причиной инфекций и язв, что увеличивает риск ампутации нижних конечностей и приводит к ранней инвалидизации и высоким экономическим затратам на лечение и медико-социальную реабилитацию. Как правило, хирургическим вмешательствам длительно предшествуют трофические нарушения в форме язв стоп [1]. Исследования последних лет отмечают, что своевременная диагностика и лечение, включающее повышение уровня контроля за пациентами, уменьшают проявления осложнений, а на ранних доклинических стадиях делают возможным их обратное развитие.

Все это определяет чрезвычайную актуальность проблемы ранней диагностики поражений нижних конечностей при СД. В связи с этим предлагается использовать методы спектроскопии: метод лазерной доплеровской флоуметрии

(ЛДФ), флуоресцентной спектроскопии (ФС) и спектроскопии диффузного отражения (СДО), которые обладают рядом преимуществ: безболезненность процедур, быстрое получение результатов, отсутствие дорогостоящих реактивов и расходных материалов, минимальное влияние на объект и его свойства [2, 3].

Одной из причин ангиопатий нижних конечностей при СД (диабетических ангиопатий) и, как следствие, трофических нарушений при СДС является нарушение микроциркуляции. Клинические исследования показывают, что у пациентов с диагнозом СД наблюдается снижение доставки кислорода в области нижних конечностей [4]. Синдромы гипоксии, связанные даже с минимальной артериальной недостаточностью, в различные сроки приводят к необратимому прогрессированию расстройств тканевого метаболизма, что особенно ярко проявляется у пациентов с язвами ног при СД.

Несмотря на то, что вопросы нарушений микроциркуляции крови в нижних конечностях при СД изучены достаточно подробно, их вклад в формирование СДС продолжает быть предметом исследований. По мнению авторов [5], особое значение в этом плане должно придаваться оценке нарушений микроциркуляции крови в области трофических язв в сравнении с кожей того же региона стопы, где расположена язва. Это необходимо для мониторинга состояния местного кровотока в процессе заживления трофического дефекта. Также в тяжелых случаях определение тяжести ишемии пораженной конечности при диабетической ангиопатии играет важную роль в хирургической тактике врача при лечении нижних конечностей с наличием гнойно-некротических поражений [6].

Для оценки состояния периферического кровотока у больных СД чаще всего используются методы доплерометрии, доплерографии, оцениваются показатели лодыжечно-плечевого индекса (соотношение величины систолического давления в артерии голени и систолического давления в плечевой артерии), которые отражают степень снижения артериального кровотока [7]. Определение насыщения тканей кислородом проводится методом транскутанной оксиметрии (TrpO_2), однако, хотя этот метод и считают “золотым стандартом” определения кислородного статуса тканей, из-за физиологических, методологических и технических препятствий он не получил широкого распространения в поликлинической диагностике. Вместе с этим остается открытым вопрос об информативности данного метода и возможности его использования при наличии инфекционного воспаления на стопе, периферических отеков и других сопутствующих

патологических состояний, влияющих на результаты исследования [4].

Предложенные оптические неинвазивные методы – ЛДФ, ФС и СДО – позволяют получить информацию о кровенаполнении кровеносных сосудов, концентрации хромофоров и флуорофоров кожи и интенсивности происходящих в коже метаболических процессов [2, 3, 8] в том числе и у больных эндокринологомического профиля.

Исследование оксигенации тканей методом СДО основано на различии в спектрах поглощения основных тканевых хромофоров – оксигемоглобина (HbO_2) и дезоксигемоглобина (Hb). Регистрируя спектр диффузного отражения, по его виду (наклон спектров, площади под кривыми спектров) на основе математических моделей связи коэффициента отражения с концентрацией указанных хромофоров, судят об уровне насыщения тканей кислородом [9], в том числе и при диабетических нарушениях [10, 11]. При этом метод СДО в отличие от упомянутого метода транскутанной оксиметрии можно применять для исследования процессов, протекающих непосредственно в местах серьезных метаболических нарушений, таких как трофические язвы при диабете [12].

Метод ЛДФ, основанный на зондировании ткани лазерным излучением и анализе отраженного и рассеянного излучения от движущихся в тканях эритроцитов, позволяет *in vivo* оценить перфузию в микроциркуляторном звене кровеносного русла у больных СД [13, 14]. Дополнительные возможности в оценке изменений, происходящих в системе микроциркуляции крови, дает проведение спектрального анализа регистрируемого сигнала [15, 16]. Применение данного математического аппарата делает возможным анализ различных механизмов регуляции в широком диапазоне частот (0.0095–1.6 Гц). Повышению информативности диагностики способствует применение совместно с методом ЛДФ различных функциональных нагрузочных проб. Это позволяет расширить диагностические возможности метода и дает возможность оценивать не только общее функциональное состояние микроциркуляторного русла, но и его резервные и адаптивные возможности [17].

Известно, что изменения в активности ферментов дыхательной цепи признаны одним из последствий нарушений функции клетки, наблюдаемых при сахарном диабете [18–20]. В настоящее время проводится множество исследований, направленных на изучение метаболизма эпителиальных тканей, включая кожу, с использованием флуоресцентной спектроскопии и методов визуализации. При различных патологиях наиболее вероятными являются изменения в накоплении коферментов NADH (восстановленная форма) и

FAD (окисленная форма). Обнаружение таких изменений с помощью флуоресцентной спектроскопии является одним из наиболее перспективных направлений *in vivo* диагностики.

Недавний обзор [21, 22] и некоторые другие исследования показывают, что изменения во флуоресценции *NADH* оценивались в отдельных клетках [23, 24], в срезах тканей [25] и органах [26, 27]. Несмотря на то, что исследования флуоресценции *NADH* и *FAD* были успешно проведены в течение последних 50 лет, относительно небольшое их количество проводится на уровне органов. Между тем результаты экспериментов на конкретном органе или участке организма имеют большие шансы быть успешно применены в клинической практике по сравнению с исследованиями на клеточном и субклеточном уровне.

В последние годы показано, что при СД при длительно существующей гипергликемии наблюдается повышение гликирования белков, что сопровождается увеличением так называемых конечных продуктов гликирования (КПГ), которые участвуют в гликировании коллагена и других белков капиллярной мембраны и кожи [28–31]. Среди ряда конечных продуктов гликирования (например, *Nε*-карбоксиметиллизин, *Nε*-карбоксиизлизин, пирралин) к имеющим собственную флуоресценцию относится пентозидин, отвечающий за формирование спаек между волокнами коллагена [32–34].

Таким образом, с точки зрения флуоресцентного анализа логично рассматривать комплексный параметр, описывающий окислительные метаболические процессы (изменение содержания *NADH* и *FAD*) и углеводный обмен (накопление КПГ) в ткани.

Предлагаемое совместное применение методов ЛДФ, ФС и СДО в диагностике может позволить комплексно анализировать патологические изменения в тканях 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.

Целью настоящей работы было экспериментальное изучение и анализ потенциальных возможностей сочетанной регистрации параметров кровотока, флуоресценции и спектров отражения кожи методами спектроскопии для оценки микроциркуляторно-тканевых нарушений в нижних конечностях больных сахарным диабетом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментальных исследованиях приняли участие 76 пациентов (28 мужчин и 48 женщин) с сахарным диабетом эндокринологического отде-

ления БУЗ Орловской области “Орловская областная клиническая больница”. В исследование включали пациентов с СД 2 типа с длительным периодом заболевания и высоким уровнем гликированного гемоглобина, находящихся в зоне риска развития диабетической стопы. Все пациенты были разделены на две группы: группа пациентов с видимыми трофическими нарушениями на ногах (8 мужчин и 6 женщин, средний возраст 53 ± 13 лет) и группа пациентов без видимых трофических нарушений (20 мужчин и 42 женщины, средний возраст 54 ± 10 лет). Кроме видимых трофических язв первая группа пациентов имела более длительную продолжительность диабета, более высокие значения креатинина и мочевины (которые могут указывать на нарушение в функции почек) и более высокий процент диагностированных осложнений (диабетическая полинейропатия, диабетическая ретинопатия, диабетическая нефропатия, диабетическая микроангиопатия нижних конечностей). Критериями исключения при проведении экспериментальных исследований являлись: острый период заболеваний сердечно-сосудистой, бронхолегочной систем, желудочно-кишечного тракта, печени, почек, крови, диагностированные отеки, варикозное расширение вен, тромбофлебит, т.е. состояния, которые могли оказывать влияние на диагностический результат. Контрольную группу составили 48 условно здоровых добровольцев (16 женщин, 32 мужчины) со средним возрастом 46 ± 6 лет.

Экспериментальные исследования были проведены в соответствии с разработанным протоколом исследования, утвержденным на заседании этического комитета при ФГБОУ ВО “Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева” от 03.11.2015 (протокол заседания № 7). Все участники экспериментальных исследований были ознакомлены с содержанием исследования и подписывали бланк информированного согласия с указанием их готовности к участию в измерениях.

В комплексных экспериментальных исследованиях оценивались флуоресценция биоткани (методом ФС), перфузия ткани кровью (методом ЛДФ), коэффициент диффузного отражения кожи в спектральном диапазоне от 500 до 600 нм (методом СДО). Все исследования проводились в положении лежа через 2 ч после приема пищи. Испытуемый адаптировался к условиям окружающей среды не менее 10 мин. Исследования проводились в два этапа на двух экспериментальных установках, при этом положение пациента не изменялось.

На первом этапе исследований регистрировались спектры диффузного отражения кожи ног пациентов с помощью установки, схема которой приведена на рис. 1. Она включает в себя



Рис. 1. Схема экспериментальной установки для исследования спектров диффузного отражения кожи.

осветительное устройство – широкополосный вольфрамовый галогенный источник излучения (HL-2000-HP-232R, “Ocean Optics”, США). Доставка излучения от лампы и сбор отраженного сигнала осуществляется с помощью волоконно-оптического зонда (R400-7, “Ocean Optics”, США), имеющего 7 волокон: шесть осветительных, расположенных вокруг одного считывающего. Диагностический объем и глубина зондирования данного зонда в спектральной области Q -полос поглощения гемоглобина (540–580 нм) составляют соответственно 1.0–1.3 мм³ и 0.4–0.5 мм, как было показано в работе [35]. При этом в области исследования оказываются эпидермис и папиллярная дерма. Собранный оптоволоконном отраженный свет направляется на ПЗС малогабаритного спектрометра (FLAME, “Ocean Optics”, США). Для управления системой использовался персональный компьютер, в котором хранение и воспроизведение данных производилось с помощью специализированного программного обеспечения “Ocean View” (“Ocean Optics”), поставляемого вместе со спектрометром.

Для регистрации спектров отражения предварительно проводилась начальная калибровка. Спектры отражения вычислялись по следующей формуле:

$$R(\lambda) = \frac{R_t(\lambda) - R_b(\lambda)}{R_{PTFE}(\lambda) - R_b(\lambda)},$$

где $R_t(\lambda)$ – измеренный коэффициент диффузного отражения (КДО) биологической ткани, $R_{PTFE}(\lambda)$ – измеренный КДО эталона диффузного отражения WS-1, $R_b(\lambda)$ – фоновый спектр, полученный при выключенном источнике света.

Такое нормирование позволяет исключить влияние на измерения спектральных зависимостей интенсивности излучения источника и чувствительности приемника. Расстояние от волоконно-оптического зонда до исследуемой по-

верхности выдерживалось одинаковым при калибровке и проведении измерений.

В исследованиях производились записи спектров диффузного отражения в контрольной точке на линии между 1-й и 2-й плюсневными костями на ноге (схема расположения волокон представлена на рис. 1). Кроме того, для пациентов с видимыми трофическими нарушениями в виде язв дополнительно регистрировались спектры диффузного отражения непосредственно в язве и в одном сантиметре от язвы (так называемой интактной области).

На этапе обработки рассчитывался и анализировался индекс гемоглобина H и степень его оксигенации Y по методике, предложенной J.W. Feather и др. [36, 37], построенной на основе измерений градиента спектра оптической плотности в области 535–575 нм:

$$H = 100 \left(\frac{OD_{544} - OD_{527.5}}{16.5} - \frac{OD_{573} - OD_{544}}{29} \right);$$

$$Y = \frac{5.1 \times 10^3}{H} \times \left(\frac{OD_{573} - OD_{558.5}}{14.5} - \frac{OD_{558.5} - OD_{544}}{14.5} \right) + 42,$$

где $OD = \log(1/R)$ – оптическая плотность, которая служит количественной характеристикой поглощения кожи, а нижние индексы обозначают длину волны в нанометрах, на которой измеряется оптическая плотность.

Такой подход к расчету индекса гемоглобина позволяет количественно оценить содержание гемоглобина в кожной ткани независимо от степени его оксигенации и применяется, в частности, в работах по изучению кровенаполненности кожной ткани под влиянием механической компрессии [38].

На втором этапе комплексных экспериментальных исследований оценивались флуоресценция биоткани методом ФС и перфузия ткани

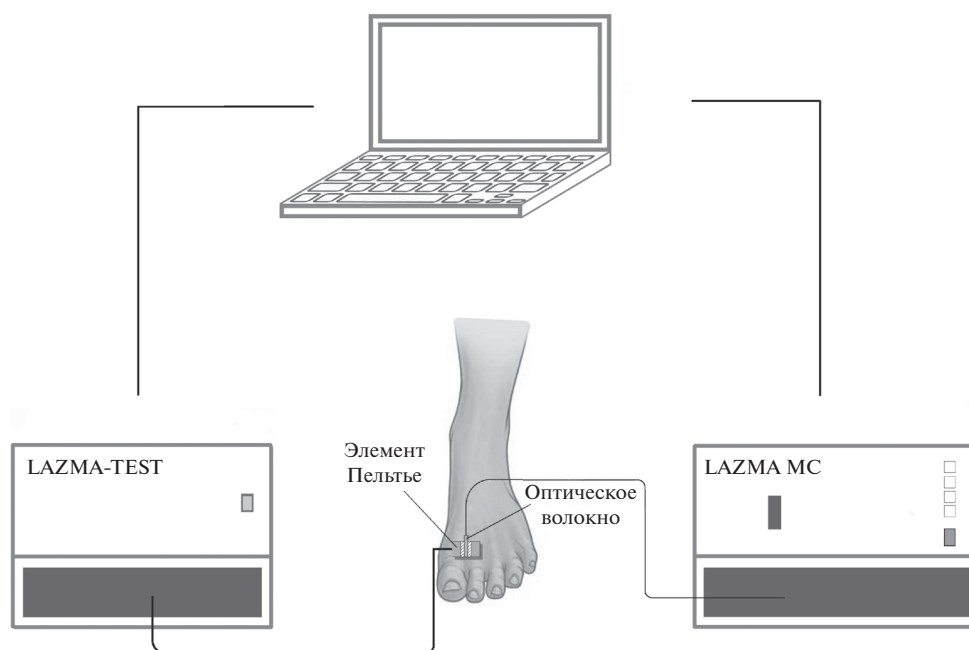


Рис. 2. Схема экспериментальной установки для исследования гемодинамических параметров спектров флуоресценции кожи.

кровью методом ЛДФ. Регистрация параметров перфузии и амплитуд флуоресценции биоткани проводилась диагностическим комплексом “ЛАЗМА МЦ” (ООО НПП “ЛАЗМА”, Москва, Россия) одновременно и в практически одном объеме ткани [39]. В доплеровском канале применялся лазерный модуль с длиной волны излучения 1064 нм, для возбуждения флуоресценции использовались источники на длинах волн излучения 365 и 450 нм. Доставка зондирующего излучения и прием обратно отраженного от ткани вторичного излучения осуществлялись одним оптическим волоконным зондом с диаметром 3 мм. Зондирующее волокно канала ЛДФ имело диаметр 6 мкм, принимающее – 400 мкм. Расстояние источник–приемник для канала ЛДФ составляло 1.5 мм. В канале ФС диаметры всех зондирующих и принимающих волокон составляли 400 мкм. Расстояние между источником и приемником равнялось 1 мм. Числовая апертура волокон – 0.22. При проведении исследований с учетом данных, полученных в работе [40], отдельное внимание уделялось минимизации механического давления, оказываемого зондом на кожу.

Тепловые пробы осуществлялись при помощи аппарата, входящего в комплекс, “ЛАЗМА-ТЕСТ” (ООО НПП “ЛАЗМА”, Москва, Россия). В процессе экспериментальных исследований оптический зонд устанавливался на дорсальной поверхности стопы в точке, расположенной на плато между 1-й и 2-й плюсневых костями (контрольная точка, показанная на рис. 1). Схема экспери-

ментальной установки для исследования гемодинамических параметров и флуоресценции биоткани, а также расположение оптического зонда комплекса “ЛАЗМА МЦ” и теплового пробника “ЛАЗМА-ТЕСТ” во время проведения экспериментальных исследований, приведены на рис. 2.

Каждое исследование второго этапа включало в себя 4 периода: базовый тест в течение 4 мин, охлаждение до 25°C – 4 мин и локальные тепловые пробы с температурами 35 и 42°C по 4 мин каждая. Таким образом, общая длительность измерения составляла 16 мин (схема проведения исследования приведена на рис. 2). Применение охлаждения до 25°C было обусловлено различиями исходной температуры в исследуемой зоне и необходимостью приведения температуры кожи в зоне обследования у всех испытуемых к одинаковым начальным условиям. Последовательность проведения экспериментальных исследований представлена в табл. 1.

Анализируемыми параметрами были амплитуды флуоресценции AF_{365} и AF_{450} , нормированные на интенсивность обратно отраженного излучения возбуждения, и средняя перфузия ткани кровью I_m в каждом этапе проведения функциональной пробы.

Все сравниваемые параметры, полученные в результате обработки данных первого и второго этапа исследований, были проверены на нормальность распределения по критерию Колмогорова–Смирнова и гомогенность дисперсий с использованием теста Левена. Значимость стати-

Таблица 1. Методика исследования с применением температурных проб

№	Этап	Температура, °С	Время, мин
1	Базовый тест	Не нормировалась	4
2	Локальное охлаждение	25	4
3	Локальный нагрев	35	4
4	Локальный нагрев	42	4

стических различий выборок была оценена с помощью однофакторного дисперсионного анализа (*One-way ANOVA*). Значение $p < 0.01$ считалось существенным.

Для второго этапа исследований, который включал в себя анализ сигналов ЛДФ и спектров флуоресценции пациентов, был использован метод линейного дискриминантного анализа для определения дискриминантной функции, позволяющей синтезировать искомое решающее правило, которое позволит вновь появляющийся объект отнести к одной из трех анализируемых групп на основании значений измеренных параметров. 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. Оценка качества дискриминантного анализа была проведена с использованием *ROC*-кривой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первый этап экспериментальных исследований показал, что у больных СД, имеющих трофические нарушения в области стоп, наблюдаются повышенные значения индекса гемоглобина. Подтверждена статистическая значимость разли-

чий (табл. 2) этого параметра при обработке данных по спектрам, полученным в контрольной точке, по сравнению с индексом гемоглобина контрольной группы. Индекс гемоглобина в контрольной точке стоп пациентов без язв не имеет статистически значимых различий с этим же параметром, зарегистрированным для добровольцев из контрольной группы. Также видно, что значение индекса гемоглобина, рассчитанного по спектрам, полученным непосредственно в месте язв, превышает значение, полученное по спектрам в интактной области, однако статистической значимости эти различия не достигли.

Кроме этого, для первого этапа исследований методом СДО в работе рассчитана степень оксигенации кожного гемоглобина. Статистически значимых различий параметра для исследованных групп не зарегистрировано. Результаты расчетов степени оксигенации для пациентов эндокринологического профиля и условно здоровых добровольцев представлены в табл. 2. Статистическая обработка проводилась аналогично обработке данных для индекса гемоглобина.

Экспериментальные исследования второго этапа методами ЛДФ и ФС показали, что у больных СД наблюдаются повышенные значения нормированных амплитуд флуоресценции, а также более низкий отклик перфузии при локальном нагреве до 35° и 42°С. При этом у выделенной группы с наличием выраженных осложнений эти параметры также достоверно отличаются от контроля и общей группы пациентов с диабетом (табл. 3, рис. 3).

Результаты расчетов индекса гемоглобина в контрольной точке показывают, что высокое кровенаполнение наблюдается у пациентов с очаговыми нарушениями тканевого метаболизма стоп. На этот параметр может влиять то, что в группах с трофическими нарушениями исследовались пациенты с более длительным течением диабета и высокими значениями гликированного гемоглобина, оптические свойства которого могут вносить вклад в полученные спектры диффузного отражения. Индекс гемоглобина напрямую

Таблица 2. Результаты расчета индекса гемоглобина и степени его оксигенации для различных точек стопы для обследованных групп

Место исследования	Область язв	Точка в одном сантиметре от язвы	Контрольная точка на линии между 1-й и 2-й плюсневыми костями у больных с язвами	Контрольная точка на линии между 1-й и 2-й плюсневыми костями у больных без язв	Контрольная точка у добровольцев из контрольной группы
<i>H</i>	0.47 ± 0.40	0.15 ± 0.08	0.17 ± 0.10*	0.09 ± 0.08	0.07 ± 0.06
<i>У, %</i>	41.6 ± 4.6	42.0 ± 1.1	41.7 ± 1.4	41.8 ± 6.6	42.5 ± 5.4

* Статистическая значимость различий значений индекса гемоглобина по отношению к значению индекса гемоглобина для контрольной группы с $p < 0.01$.

Таблица 3. Результаты экспериментальных исследований

Параметр	Больные с язвами	Больные без язв	Контрольная группа
Нормированная амплитуда AF_{365} , отн. ед.	$3.8 \pm 0.7^{**}$	$2.7 \pm 0.8^*$	2.1 ± 0.8
Нормированная амплитуда AF_{450} , отн. ед.	$2.5 \pm 0.6^{**}$	$1.8 \pm 0.7^*$	1.2 ± 0.4
Перфузия I_m , пф. ед.	3.8 ± 1.6	5.3 ± 2.2	5.0 ± 1.9
Перфузия I_m , пф. ед. при 25°C	3.6 ± 1.4	4.7 ± 2.0	4.4 ± 1.6
Перфузия I_m , пф. ед. при 35°C	$5.0 \pm 1.4^{**}$	$6.6 \pm 2.4^*$	8.7 ± 3.1
Перфузия I_m , пф. ед. при 42°C	$9.2 \pm 4.6^{**}$	$12.3 \pm 3.5^*$	19.9 ± 4.6

* Статистическая значимость различий по отношению к условно-здоровым добровольцам с вероятностью $p < 0.01$.

** Статистическая значимость различий по отношению к группе пациентов эндокринологического профиля без язв с вероятностью $p < 0.01$.

характеризует кровенаполнение кожи, и его повышенные значения, непосредственно измеренные в области язв, можно объяснить притоком крови в эти области вследствие протекающих процессов воспаления и заживления, что и наблюдается у больных с осложнениями СД. Большой разброс этого параметра можно объяснить различными типами и стадиями развития исследуемых трофических язв. Изучение изменения индекса гемоглобина у диабетических больных может быть в дальнейшем положено в развитие подхода оценки заживления язв и мониторинга реакции кожи в процессе лечения диабетических больных.

Статистически значимые различия флуоресцентных сигналов для обследованных групп находят следующее объяснение. Как было сказано, КППГ участвуют в механизмах развития осложненной диабета. Быстрое образование внутриклеточных КППГ способствует нарушению функции бел-

ков, и их накопление может служить объективным маркером конечного гликозилирования в тканях. При этом общепринятый показатель гликозилирования в тканях $HbA1c$ характеризует процессы гликирования, произошедшие за короткий период (около трех месяцев), изменения же в накоплении КППГ в коже характеризуют более длительный период. Учитывая большую продолжительность жизни молекул коллагена и стабильность КППГ, возможно использовать флуоресценцию кожи как показатель суммарного воздействия гипергликемии в течение жизни.

Известно, что диабет может приводить к тканевой гипоксии [41–43]. В случае гипоксии аэробный путь дыхания клеток нарушается, а митохондриальное окисление коферментов замедляется. В этой связи накопление $NADH$ и FAD может служить признаком тканевой гипоксии с его вкладом в общий сигнал флуоресценции, и служить маркером общей недостаточности кис-

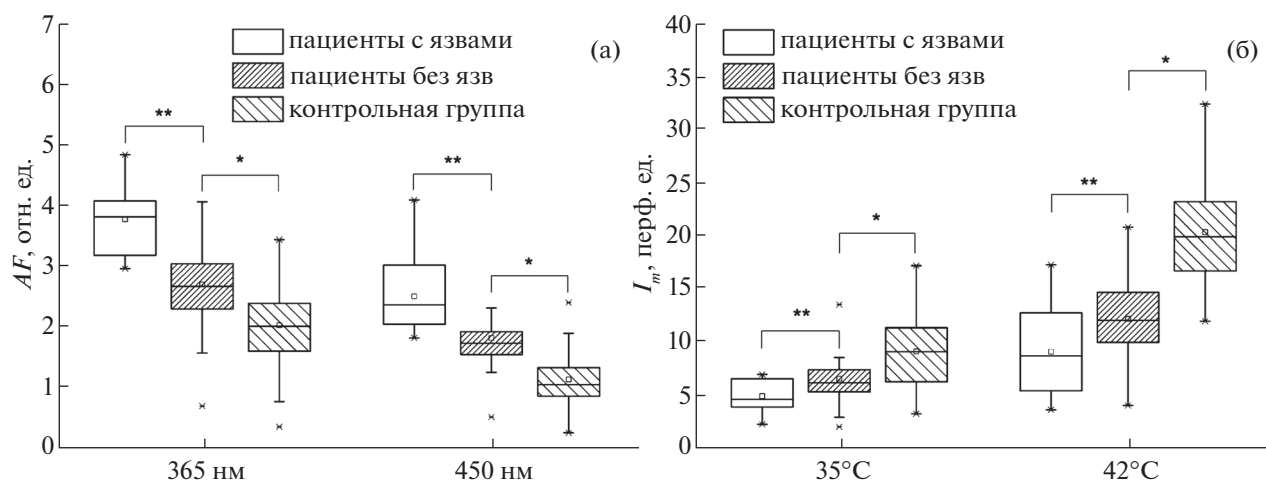


Рис. 3. Результаты экспериментальных исследований: (а) нормированные амплитуды флуоресценции и (б) средняя перфузия в этапах с нагревом до 35 и 42°C. * Статистическая значимость различий по отношению к условно здоровым добровольцам с вероятностью $p < 0.01$; ** статистическая значимость различий по отношению к группе пациентов эндокринологического профиля без язв с вероятностью $p < 0.01$.

лорода в тканях. Между тем в процессах окислительного фосфорилирования наблюдаемые изменения в концентрациях *NADH* и *FAD* могут быть очень сложными, и динамика этих изменений может быть нелинейной на протяжении всей жизни клетки. Это следует учитывать при интерпретации получаемых данных и дальнейших исследованиях в этой области.

Также показано [44–46], что накопление КПП может подавлять синтез *NO* в эндотелиальных клетках. В том числе этим можно объяснить различия ответа перфузии на стимуляционное воздействие. При локальной тепловой пробе прирост перфузии происходит преимущественно за счет двух механизмов. При нагреве кожи до 34–35°C происходит активация сенсорных пептидергических нервных волокон. Это обусловлено активацией термочувствительных ваниллоидных рецепторов сенсорных волокон типа 1 (TRPV-1) [47]. При нагреве кожи до 42°C вазодилатация связана с освобождением *NO* из эндотелия сосудов [48, 49]. Топографически в регуляторном ответе на локальный нагрев участвуют как артериолы, так и капилляры. При СД закономерно происходит дисфункция всех звеньев микроциркуляторного русла и тканевых систем, в том числе эндотелия сосудов и периваскулярных нервных волокон. Поэтому тепловая проба патогенетически обоснована для диагностики этих расстройств при СД. Снижение прироста перфузии при нагреве кожи до 35°C – объективный критерий дисфункции сенсорных нервных волокон как компонента диабетической невропатии. Снижение прироста перфузии при нагреве кожи до 42°C отражает дефицит эндотелийзависимых механизмов вазодилатации.

Таким образом, флуоресценция кожи и уровень перфузии тканей кровью при тепловой пробе могут являться маркером различной степени осложнений от начала течения СД до образования трофических язв.

Для синтеза решающего правила в качестве анализируемых параметров предлагается использовать нормированные амплитуды флуоресценции кожи и перфузию, полученные во втором этапе экспериментальных исследований. Предварительно было установлено, что эти параметры удовлетворяют принципам статистической независимости, а также значимости различий их значений, вычисленных для групп пациентов и контроля.

На рис. 4а представлены результаты проведенного линейного дискриминантного анализа. Дискриминантные функции синтезированы таким образом, чтобы обеспечить высокую чувствительность при обеспечении хорошей специфичности. Наименьший уровень ошибки удается получить при комбинации интенсивности флуорес-

ценции при возбуждении длиной волны 365 нм и уровнем перфузии при стимуляции микроциркуляции при 42°C. Для первого классифицирующего правила по разделению контрольной группы и группы пациентов с диабетом без язв были получены чувствительность и специфичность, равные 0.92 и 0.90 соответственно. Для второго классифицирующего правила для группы пациентов с диабетом и группы с язвами – 0.86 и 0.85. Непосредственным диагностическим критерием являются модели классификации в виде дискриминантных функций, позволяющих классифицировать функциональное состояние диагностируемой области (представлены на рис. 4а).

Тот факт, что экспериментальные данные могут быть сгруппированы, означает, что вариации показателей нарушения биоткани (уровень флуоресценции кожи и перфузия) от контрольной группы достаточно воспроизводимы и аналогичны у всех пациентов.

На рис. 4б представлены *ROC*-кривые, вычисленные для полученных дискриминантных функций.

Для сравнения качества различных классифицирующих правил удобно использовать интегральную характеристику *AUC* (*Area Under Curve*) – площадь под *ROC*-кривой. В нашем случае и для первого классифицирующего правила (контрольная группа и общая группа пациентов с диабетом), и для второго (общая группа пациентов с диабетом и группа с осложнениями) – $AUC = 0.93$. Эти показатели говорят о высоком уровне качества предложенного классификатора.

Патологические изменения в работе микроциркуляторного русла у больных СД определяются микроангиопатиями, в развитии которых ведущую роль играет хроническая гипергликемия. Метод ФС позволяет оценивать процессы накопления продуктов гликолизирования в биотканях больных по флуоресценции КПП. В свою очередь накопление продуктов гликирования вызывает эндотелиальную дисфункцию, влияя на синтез вазодилатора *NO*, что возможно диагностировать методом ЛДФ, оценивая среднюю перфузию ткани кровью. Снижение перфузии в тканях больных, вероятно, наряду с повышенным уровнем гликированного гемоглобина у больных СД оказывает влияние на индекс гемоглобина, который возможно регистрировать методом СДО. Таким образом, результаты обработки совместных неинвазивных исследований тканей стоп методами спектроскопии позволяют осуществлять комплексный подход к оценке микроциркуляторно-тканевых нарушений у больных СД.

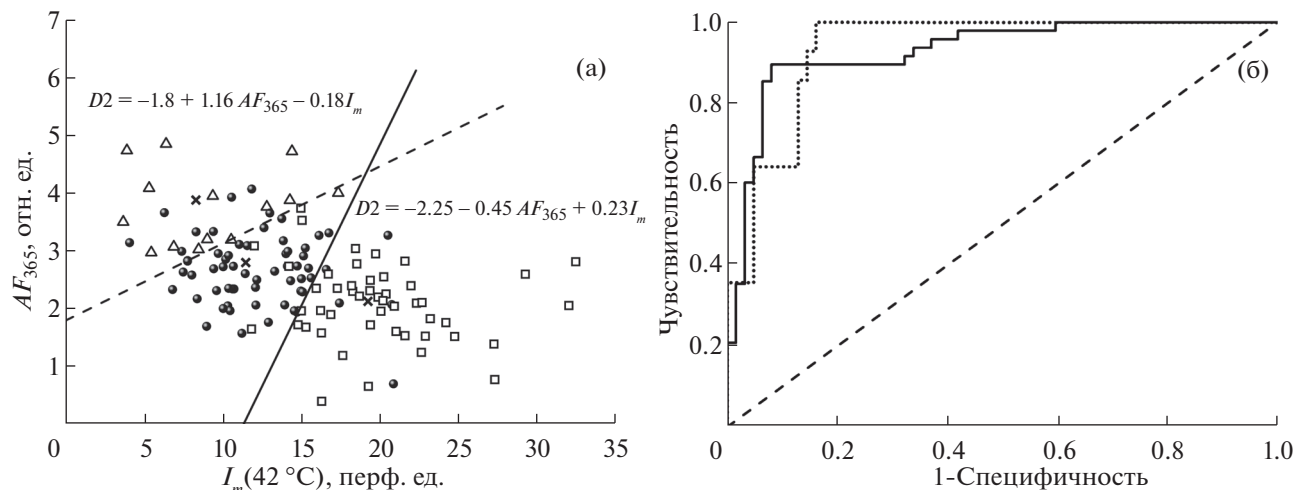


Рис. 4. (а) Результаты линейного дискриминантного анализа: $D1 = -2.55 - 0.45AF_{365} + 0.23I_m$ (сплошная линия), $D2 = -1.8 + 1.16AF_{365} - 0.18I_m$ (штриховая линия) и (б) ROC-кривые оценки эффективности дискриминантного анализа.

ВЫВОДЫ

Использование методов спектроскопии диффузного отражения, лазерной доплеровской флоуметрии и флуоресцентной спектроскопии по отдельности или совместно может иметь важные клинические применения, так как они могут помочь идентифицировать пациентов с различной степенью микроциркуляторных нарушений в нижних конечностях.

В формировании спектров диффузного отражения кожи человека в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах существенный вклад вносит гемоглобин. Изменение содержания последних при поражениях микроциркуляторного русла кожи стоп вследствие диабетической микроангиопатии проявляется в спектрах отражения как результат изменения поглощающих и рассеивающих свойств кожи.

Количественную оценку содержания крови в коже можно производить путем вычисления индекса гемоглобина, использование которого позволяет объективно оценивать цвет кожи и количественно оценить кровенаполнение в области исследования у больных СД, что возможно использовать при оценке динамики заживления язв. Предложенный оригинальный метод совместной обработки сигналов ЛДФ и спектров флуоресценции биоткани прошел успешную апробацию в клинических исследованиях и может быть использован для диагностики микроциркуляторных нарушений в стопах пациентов.

Таким образом, спектроскопия диффузного отражения, ЛДФ и флуоресценция могут быть использованы как совместно, так и по отдельности в качестве дополнительных неинвазивных методов диагностики в кабинетах диабетической сто-

пы для длительного наблюдения за больными группы высокого риска наряду с такими стандартными методами выявления осложнений СД, как осмотр ног, оценка неврологического статуса (исследование вибрационной чувствительности), определение болевой, тактильной и температурной чувствительности и др. Применение предложенного решающего правила в виде совокупности дискриминантных функций позволит исследователю или практикующему врачу не только говорить о наличии осложнений сахарного диабета, но и оценивать их степень. Представленные в работе методы могут быть маркером опасности диабетических микроциркуляторных нарушений и служить для оценки терапевтических мероприятий, направленных на предотвращение прогрессирования диабетических осложнений.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-7168.2016.8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедов И.И. // Сахарный диабет. 2010. № 3 (13). С. 6.
2. Тучин В.В. Оптическая биомедицинская диагностика: в 2-х т.: учебное издание. М.: Физматлит, 2007. 559 с.
3. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: колебания, информация, нелинейность: руководство для врачей. М.: ЛИБРОКОМ, 2013. 496 с.
4. Бондаренко О.Н., Аюбова Н.Л., Галстян Г.Р., Дедов И.И. // Сахарный диабет. 2013. № 1 (16). С. 33.
5. Бреговский В.Б., Карпова И.А., Лексеева Е.С. // Сахарный диабет. 2011. № 3 (14). С. 49.

6. Шор Н.А. // Хирургия. 2001. № 6. С. 29.
7. Анциферов М.Б., Галстян Г.Р., Токмакова А.Ю., Дедов И.И. // Сахарный диабет. 2001. № 2 (4). С. 2.
8. Dremin V.V., Sidorov V.V., Krupatkin A.I., Galstyan G.R., Novikova I.N., Zherebtsova A.I., Zherebtsov E.A., Dunaev A.V., Abdulvarova Z.N., Litvinova K.S., Rafailov I.E., Sokolovski S.G., Rafailov E.U. // Proc. SPIE. V. 9698. P. 969810. doi 10.1117/12.2212758
9. Потапова Е.В., Дремин В.В., Жеребцов Е.А., Маковик И.Н., Жеребцова А.И., Дунаев А.В., Подмастерьев К.В., Сидоров В.В., Крупаткин А.И., Хахичева Л.С., Мурадян В.Ф. // Физиология человека. 2017. Т. 43. № 2. С. 116; Potarova E.V., Dremin V.V., Zherebtsov E.A., Makovik I.N., Zherebtsova A.I., Dunaev A.V., Podmasteryev K.V., Sidorov V.V., Krupatkin A.I., Khakhicheva L.S., Muradyan V.F. // Human Physiology. 2017. V. 43. № 2. P.222. doi 0.1134/S036211971702013X
10. Sujatha N., Anand B.S. Suresh, Nivetha K. Bala, Narayanamurthy V.B., Seshadri V., Poddar R. // J. Appl. Spectrosc. 2015. V. 82. № 3. P. 432. doi 10.1007/s10812-015-0125-9
11. Nouvong A., Hoogwerf B., Mohler E., Davis B., Tajaddini A., Medenilla E. // Diabetes Care. 2009. V. 32. № 11. P. 2056. doi 10.2337/dc08-2246
12. Anand B.S., Suresh, Sujatha N., Narayanamurthy V.B., Seshadri V., Poddar R. // Opt. Lasers Eng. 2014. V. 53. P. 1. doi 10.1016/j.optlaseng.2013.07.020
13. Lal C., Unni S.N. // Med. Biol. Eng. Comput. 2015. V. 53. № 6. P. 557. doi 10.1007/s11517-015-1266-y
14. Глазков А.А., Куликов Д.А., Древаль А.В., Ковалева Ю.А., Шумский В.И., Рогаткин Д.А. // Альманах клинической медицины. 2014. № 31. С. 7.
15. Dremin V.V., Zherebtsov E.A., Makovik I.N., Kozlov I.O., Sidorov V.V., Krupatkin A.I., Dunaev A.V., Rafailov I.E., Litvinova K.S., Sokolovski S.G., Rafailov E.U. // Proc. SPIE Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics XIV. 2017. № 10063. P. 1006303. doi 10.1117/12.2252427
16. Dunaev A.V., Zherebtsov E.A., Rogatkin D.A., Stewart N.A., Sokolovski S.G., Rafailov E.U. // Proc. SPIE. V. 8936. P. 89360D. doi 10.1117/12.2035651
17. Zherebtsova A.I., Zherebtsov E.A., Dunaev A.V., Podmasteryev K.V., Pilipenko O.V., Krupatkin A.I., Khakhicheva L.S., Muradyan V.F. // Proc. SPIE. 2016. V. 9917. P. 99170M. doi 10.1117/12.2229827
18. Lin S.J., Guarente L. // Curr. Opin. Cell Biol. 2003. V. 15. № 2. P. 241. doi 10.1016/S0955-0674(03)00006-1
19. Hwang J.H., Kim D.W., Jo E.J., Kim Y.K., Jo Y.S., Park J.H., Yoo S.K., Park M.K., Kwak T.H., Kho Y.L., Han J., Choi H.S., Lee S.H., Kim J.M., Lee I., Kyung T., Jang C., Chung J., Kweon G.R., Shong M. // Diabetes. 2009. V. 58. № 4. P. 965. doi 10.2337/db08-1183
20. Ido Y., Kilo C., Williamson J.R. // Diabetologia. 1997. V. 40. Suppl 2. P. S115. doi 10.1007/s001250051422
21. Mayevsky A., Chance B. // Mitochondrion. 2007. V. 7. № 5. P. 330. doi 10.1016/j.mito.2007.05.001
22. Mayevsky A., Rogatsky G.G. // AJP Cell Physiol. 2006. V. 292. № 2. P. C615. doi 10.1152/ajpcell.00249.2006
23. Obi-Tabot E.T., Hanrahan L.M., Cachecho R., Beer E.R., Hopkins S.R., Chan J.C., Shapiro J.M., LaMorte W.W. // J. Surg. Res. 1993. V. 55. № 6. P. 575. doi 10.1006/js-re.1993.1187
24. Bartolomé F., Abramov A.Y. // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2015. V. 1264. P. 263. doi 10.1007/978-1-4939-2257-4_23
25. Foster K.A., Beaver C.J., Turner D.A. // Neuroscience. 2005. V. 132. № 3. P. 645. doi 10.1016/j.neuroscience.2005.01.040
26. Rampil I.J., Litt L., Mayevsky A. // J. Clin. Monit. 1992. V. 8. № 3. P. 216. doi 10.1007/BF01616779
27. Papayan G., Petrishchev N., Galagudza M. // Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2014. V. 11. № 3. P. 400. doi 10.1016/j.pdpdt.2014.05.003
28. Gkogkolou P., Böhm M. // Dermatoendocrinol. 2012. V. 4. № 3. P. 259. doi 10.4161/derm.22028
29. Meerwaldt R., Graaff R., Oomen P.H.N., Links T.P., Jager J.J., Alderson N.L., Thorpe S.R., Baynes J.W., Gans R.O.B., Smit A.J. // Diabetologia. 2004. V. 47. № 7. P. 1324. doi 10.1007/s00125-004-1451-2
30. Tan K.C., Chow W.S., Ai V.H., Metz C., Bucala R., Lam K.S. // Diabetes Care. 2002. V. 25. № 6. P. 1055. doi 10.2337/diacare.25.6.1055
31. Gerrits E.G., Lutgers H.L., Kleefstra N., Graaff R., Groenier K.H., Smit A.J., Gans R.O., Bilo H.J. // Diabetes Care. 2008. V. 31. № 3. P. 517. doi 10.2337/dc07-1755
32. Sell D.R., Nagaraj R.H., Grandhee S.K., Odetti P., Lapolla A., Fogarty J., Monnier V.M. // Diabetes. Metab. Rev. 1991. V. 7. № 4. P. 239. doi 10.1002/dmr.5610070404
33. Sell D.R., Lapolla A., Odetti P., Fogarty J., Monnier V.M. // Diabetes. 1992. V. 41. № 10. P. 1286. doi 10.2337/di-ab.41.10.1286
34. Takahashi M., Hoshino H., Kushida K., Inoue T. // Anal. Biochem. 1995. V. 232. № 2. P. 158. doi 10.1006/abio.1995.0002
35. Zherebtsov E.A., Bykov A.V., Popov A.P., Doronin A., Meglinski I.V. // Proc. SPIE. 2017. V. 10063. P. 1006312. doi 10.1117/12.2250855
36. Feather J.W., Hajizadeh-Saffar M., Leslie G., Dawson J.B. // Phys. Med. Biol. 1989. V. 34. № 7. P. 807. doi 10.1088/0031-9155/34/7/002
37. Hajizadeh-Saffar M., Feather J.W., Dawson J.B. // Phys. Med. Biol. 1990. V. 35. № 9. P. 1301. doi 10.1088/0031-9155/35/9/009
38. Зорюкина О.А., Нахаева И.А., Мохаммед П. Мохаммед, Синичкин Ю.П. // Проблемы оптической физики и биофотоники. SFM-2013: материалы 17-й Междунар. молодежной науч. школы по оптике, лазерной физике и биофотонике. 2013. С. 9.
39. Dremin V.V., Zherebtsov E.A., Rafailov I.E., Vinokurov A.Y., Novikova I.N., Zherebtsova A.I., Litvinova K.S., Dunaev A.V. // Proc. SPIE. 2016. V. 9917. P. 99170Y. doi 10.1117/12.2229451
40. Zherebtsov E.A., Kandurova K.Y., Seryogina E.S., Kozlov I.O., Dremin V.V., Zherebtsova A.I., Dunaev A.V., Meglinski, I.V. // Proc. SPIE. 2017. № 10336. P. 1033608. doi 10.1117/12.2267957
41. Xi L., Chow C.-M., Kong X. // J. Diabetes Res. Hindawi, 2016. V. 2016. P. 1. doi 10.1155/2016/1527852
42. Thangarajah H., Yao D., Chang E.I., Shi Y., Jazayeri L., Vial I.N., Galiano R.D., Du X.L., Grogan R., Galvez M.G., Januszyk M., Brownlee M., Gurtner G.C. // Proc. Natl.

- Acad. Sci. 2009. V. 106. № 32. P. 13505. doi 10.1073/pnas.0906670106
43. *Ditzel J., Standl E.* // Acta Med. Scand. Suppl. 1975. V. 578. P. 59. doi 10.1111/j.0954-6820.1975.tb06503.x
44. *Bucala R., Tracey K.J., Cerami A.* // J. Clin. Invest. 1991. V. 87. № 2. P. 432. doi 10.1172/JCI115014
45. *Stitt A.W., He C., Friedman S., Scher L., Rossi P., Ong L., Founds H., Li Y. M., Bucala R., Vlassara H.* // Mol. Med. 1997. V. 3. № 9. P. 617.
46. *Chakravarthy U., Hayes R.G., Stitt W., McAuley E., Archer D.B.* // Diabetes. 1998. V. 47. № 6. P. 945. doi 10.2337/diabetes.47.6.945
47. *Stephens D.P., Charkoudian N., Benevento J.M., Johnson J.M., Saumet J.L.* // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2001. V. 281. № 3. P. R894.
48. *Minson C.T., Berry L.T., Joyner M.J.* // J. Appl. Physiol. 2001. V. 91. № 4. P. 1619.
49. *Kellogg D.L., Zhao J.L., Wu Y., Wu Y.* // J. Appl. Physiol. American Physiological Society. 2009. V. 107. № 5. P. 1438. doi 10.1152/jappphysiol.00690.2009