# ОЦЕНКА ДИНАМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ КРОВИ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ПРОБ

[1*]Жарких Е.В., [1]Локтионова Ю.И., [1]Козлов И.О., [1]Жеребцов Е.А., [1]Жеребцова А.И., [1]Дунаев А.В., [2]Сидоров В.В., [3]Крупаткин А.И.
[1]Орловский Государственный Университет имени И.С. Тургенева, г. Орел, *e.zharkikh@oreluniver.ru,
[2]ООО НПП «ЛАЗМА», г. Москва,
[3]Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова, г. Москва

Ключевые слова: неинвазивная диагностика, лазерная допплеровская флоуметрия, флуоресцентная спектроскопия, микроциркуляция, сахарный диабет

Аннотация. В статье представлены результаты оценки динамических изменений перфузии и состояния окислительного метаболизма биологических тканей у пациентов с сахарным диабетом с использованием локальных температурных воздействий (охлаждение и нагрев). Показано, что предлагаемый подход в виде совместного применения лазерной доплеровской флоуметрии и флуоресцентной спектроскопии с использованием локальных температурных тестов имеет перспективы в анализе функционального состояния биологических тканей. Зарегистрированное увеличение микроциркуляции и окислительного метаболизма при использовании локальной тепловой пробы значительно менее выражено у пациентов с диабетом по сравнению со здоровым контролем.

Осложнения сахарного диабета (СД) в настоящее время рассматриваются как одни из наиболее серьезных проблем современного здравоохранения, поскольку распространенность данного заболевания увеличивается с каждым годом и в настоящий момент насчитывает порядка полумиллиона людей по всему миру. СД является хроническим заболеванием, приводящим с течением времени к нарушениям во всех частях организма при отсутствии адекватной терапии. Осложнения СД разделяют на острые и хронические. Продолжительность и качество жизни пациентов с СД зависит в первую очередь от своевременной диагностики и правильной терапии его хронических осложнений [1]. Отсутствие этих условий может вести к угрожающим для организма последствиям, таким как потеря зрения, развитие сердечно-сосудистых заболеваний, почечной недостаточности, необходимость в гемодиализе или трансплантации почки, ампутация нижних конечностей и даже к смертельному исходу.

Развитие диабетических осложнений характеризуется прежде всего сосудистыми и метаболическими нарушениями. Микроциркуляция играет важную роль в развитии осложнений СД, поскольку изменения в микрососудистой стенке, механизмах регуляции гемодинамики и перераспределение кровотока приводят к снижению метаболизма капилляров и, следовательно, к нарушению питания тканей. Диагностика нарушений микроциркуляции и метаболических процессов при СД может быть осуществлена посредством различных оптических неинвазивных методов, поскольку оптические свойства биологических тканей подвержены значительным изменениям при развитии патологических состояний [2].

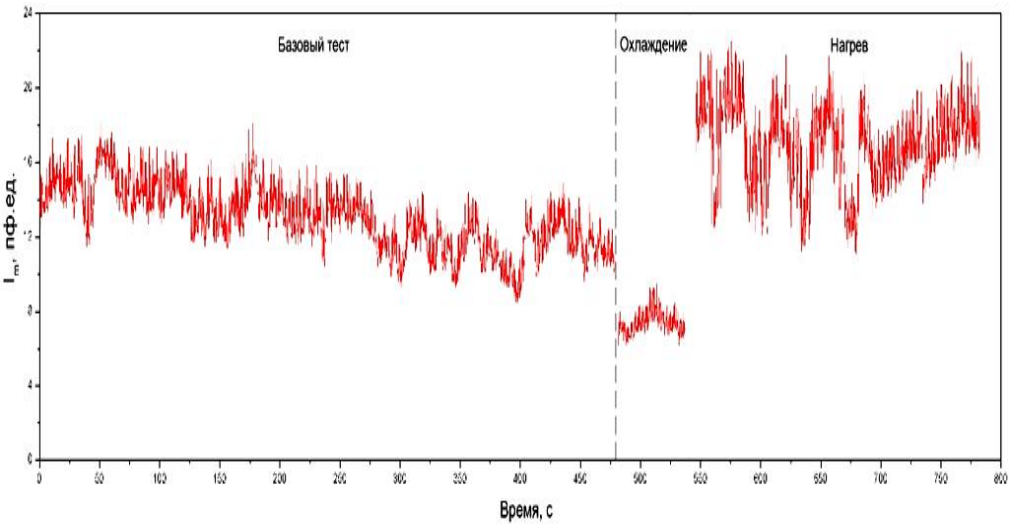
Одним из наиболее перспективных методов оптической неинвазивной диагностики состояния микроциркуляции крови является метод лазерной допплеровской флоуметрии (ЛДФ). ЛДФ позволяет оценить функциональное состояние микроциркуляции крови и ее патологические изменения, а также диагностировать механизмы регуляции гемомикроциркуляции. ЛДФ имеет значительную историю применения в клинической практике различных патологических состояний, связанных с нарушениями состояния микроциркуляции крови, в том числе в практике СД. Принцип метода основан на эффекте Доплера, возникающем при рассеянии зондирующего лазерного излучения с поверхности эритроцитов, движущихся в биологической ткани. Колебательный процесс, регистрируемый этим методом является наложением колебаний, обусловленных активными и пассивными факторами. В настоящее время выделяют несколько частотных диапазонов колебаний кровотока, регистрируемых методом ЛДФ: диапазон 0,005–0,02 Гц – осцилляции, обусловленные влиянием эндотелия; 0,02–0,046 Гц – осцилляции, вызванные низкочастотной ритмикой импульсации нервных волокон, непосредственно иннервирующих микрососуды кожи; 0,05–0,069 Гц – колебания, зависящие от влияния сенсорных пептидергических нервных волокон; 0,07–0,15 Гц – осцилляции, обусловленные собственной миогенной активностью миоцитов микрососудов; 0,16–0,18 Гц – осцилляции, вызванные парасимпатическими или симпатическими холинергическими влияниями; 0,2–0,4 Гц – дыхательные волны; 0,8–1,6 Гц – пульсовые волны [3]. Для более качественной оценки состояния регуляторных механизмов применяют различные функциональные нагрузочные пробы. В качестве функциональных проб может применяться оказание локальных тепловых (локальная тепловая проба) и холодовых (локальная холодовая проба) воздействий, так как они позволяют оценивать состояние местных регуляторных механизмов микроциркуляции по степени прироста или снижения перфузии, соответственно.

Исчерпывающая информация о функциональном состоянии биологических тканей может быть получена путем применения мультимодального подхода, реализованного в форме одновременного измерения нескольких диагностических параметров разными оптическими неинвазивными диагностическими методами [4, 5]. Известно, что при развитии микрососудистых осложнений у пациентов с СД также поражается дыхательная

цепь митохондрий. Оценить эти нарушения возможно, регистрируя изменения коферментов NADH и FAD. Возможностью регистрации данных изменений обладает метод флуоресцентной спектроскопии (ФС). Оценивая интенсивность флуоресценции ткани, можно судить о ее жизнеспособности, оценивая функцию митохондрий. Значительный вклад в общую флуоресценцию кожи также вносят конечные продукты гликирования (КПГ), которые, как известно, накапливаются в тканях при диабете. Накопление КПГ считается маркером развития и тяжести диабетических осложнений [6].

Целью данной работы является оценить изменения интенсивности флуоресценции и показателя микроциркуляции крови у пациентов с СД с использованием локальных температурных тестов.

Экспериментальные исследования проводились с участием 20 пациентов с СД 2 типа и 20 здоровых людей, входящих в контрольную группу. В исследовании использовался лазерный многофункциональный комплекс «ЛАЗМА-СТ» (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия). В состав комплекса входят каналы регистрации ЛДФ с одномодовым лазером ближнего инфракрасного диапазона (1064 нм) и канал флуоресцентной спектроскопии с источниками УФ (365 нм) и синего (450 нм) излучения. Прибор «ЛАЗМА-ТЕСТ», предназначенный для функционального нагрева, использовался для обеспечения температурного воздействия. Пациенты находились в положении лежа на спине с зондом устройства, расположенным на подошвенной поверхности большого пальца ноги. Исследование включало 3 последовательных этапа: запись базового сигнала в течение 8 минут (БТ), локальное охлаждение ткани до 10 °С и запись сигнала в течение 1 минуты и локальное нагревание до 35 °С с регистрацией сигнала в течение 4 минут. Пара спектров флуоресценции регистрировалась на каждой стадии экспериментального исследования. На рисунке 1 приведена схема изменения сигнала ЛДФ в процессе проведения экспериментального исследования и расположение датчика на стопе пациента.



а) б)

**Рисунок 1** – Типовой пример динамических изменений сигнала ЛДФ во время проведения эксперимента (а) и расположение датчика на стопе во время исследования (б)

В ходе исследования регистрировался показатель микроциркуляции ($I_m$) и амплитуды флуоресценции, возбуждаемой на длинах волн 365 нм ($A_{365}$) и 450 нм ($A_{450}$), нормированные на интенсивность обратно отраженного света. Для анализа механизмов регуляции микроциркуляторного кровотока полученные сигналы ЛДФ были подвергнуты вейвлет-анализу с помощью вейвлета Морле. Были проанализированы амплитуды эндотелиальных, нейрогенных, миогенных, дыхательных и сердечных колебаний. Впоследствии по полученным данным рассчитывали показатель шунтирования (ПШ) и нутритивный кровоток ($I_{mn}$) по известным формулам [7, 8].

Для комплексной оценки взаимосвязи между состоянием микроциркуляторного русла и окислительного метаболизма в ткани, рассчитывали показатель окислительного метаболизма (ПОМ) по следующей формуле:

$$\text{ПОМ} = \frac{I_{mn}}{A_{365}+A_{450}}. \quad (1)$$

Параметр ПОМ позволяет оценить взаимосвязь между поступлением оксигенированной крови в капиллярное русло и ее утилизацией в тканях.

Для оценки динамических изменений изучаемых параметров при применении локальных температурных тестов рассчитывался их относительные изменения (прирост или уменьшение) по сравнению с данными базового теста. Результаты расчета показателя микроциркуляции и показателя окислительного метаболизма представлены на рисунке 2.

а) б)

**Рисунок 2** – Диаграммы размаха относительного прироста показателя микроциркуляции (а) и показателя окислительного метаболизма (б) при применении локальных температурных тестов; *- статистическая значимость различий значений параметров контрольной группы по отношению к группе пациентов с СД с $p<0,05$ по критерию Манна-Уитни

В базовом тесте в группе пациентов наблюдались немного более высокие значения показателя микроциркуляции и температуры ног. Локальное охлаждение тканей в обеих группах вызывало значительное снижение показателя микроциркуляции. При этом более выраженное снижение этого параметра наблюдалось в группе пациентов, возможно, из-за более высоких начальных значений.

На стадии применения локального теплового теста сигнал ЛДФ значительно увеличивался при нагреве как в группе пациентов, так и в контрольной группе, превышая значения, полученные при базовом тесте. Такое изменение параметра может быть объяснено вазодилатацией, вызванной локальным нагревом тканей. Стоит отметить тот факт, что среди пациентов в 20% случаев не наблюдалось восстановления исходного уровня индекса микроциркуляции. В контрольной группе при локальном тепловом тесте показатель микроциркуляции увеличился в среднем в 2 раза по сравнению с исходным уровнем. У пациентов увеличение перфузии в течение этой стадии исследования было значительно менее выраженным. При СД происходит обеднение микрососудистого русла, уменьшение числа микрососудов, в том числе капилляров. Таким образом, при локальном нагревании тканей преимущественно реагируют более крупные сосуды (например, мелкие артерии и артериолы), а перфузия микрососудов не изменяется или даже уменьшается.

Оценка ПОМ показала аналогичные анализу изменения перфузии результаты. Значения параметра значительно уменьшились во время стадии локального охлаждения с более значимыми изменениями в группе пациентов с СД. Увеличение параметра во время применения локального теплового теста наблюдалось в обеих группах, однако данное увеличение было значительно более выраженным в контрольной группе по сравнению с пациентами. Более того, в группе пациентов наблюдалось отсутствие роста или снижение этого показателя в 30% случаев.

Исследование показало, что предлагаемый подход в виде применения локальных температурных тестов с последовательными стадиями охлаждения и нагрева и одновременной регистрации сигналов ЛДФ и ФС имеет перспективы применения для анализа состояния окислительного метаболизма биологических тканей. Было показано, что увеличение показателя микроциркуляции и ПОМ при применении локального теплового теста значительно менее выражено у пациентов с СД по сравнению со здоровым контролем.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-79-00237), И.О. Козлов и А.В. Дунаев (сбор и обработка данных) благодарят РФФИ (грант №19-32-90253) за финансовую поддержку.

**Библиографический список:**

1. Wexler D.J. et al. Correlates of health-related quality of life in type 2 diabetes // Diabetologia. – 2006. – Т. 49. – №. 7. – С. 1489-1497.

2. Тучин, В.В. Оптическая биомедицинская диагностика: в 2 т.: учебное издание/ В.В. Тучин. – М.: Физматлит, 2007.

3. Крупаткин, А.И. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: колебания, информация, нелинейность: руководство для врачей. – М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2013. – 496 с.

4. Потапова Е.В. и др. Комплексный подход к неинвазивной оценке микроциркуляторно-тканевых нарушений в стопах пациентов с сахарным диабетом методами спектроскопии //Оптика и спектроскопия. – 2017. – Т. 123. – №. 6. – С. 946-956.

5. Жарких Е.В. и др. Оптическая неинвазивная диагностика функционального состояния микроциркуляторного русла пациентов с нарушением периферической микрогемодинамики //Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2018. – Т. 17. – №. 3. – С. 23-32.

6. Gerrits E.G. et al. Skin autofluorescence: a tool to identify type 2 diabetic patients at risk for developing microvascular complications // Diabetes care. – 2008. – Т. 31. – №. 3. – С. 517-521.

7. Dunaev A.V. et al. Investigating tissue respiration and skin microhaemocirculation under adaptive changes and the synchronization of blood flow and oxygen saturation rhythms // Physiological Measurement. – 2014. – Т. 35. – № 4. – С. 607-621.

8. Филина М.А. и др. Функциональные изменения микроциркуляции крови в коже стопы при тепловых пробах у пациентов с сахарным диабетом //Физиология человека. – 2017. – Т. 43. – №. 6. – С. 95-102.

## ESTIMATION OF DYNAMIC CHANGES IN BLOOD MICROCIRCULATION AND OXIDATIVE METABOLISM IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS USING TEMPERATURE TESTS

[1*]Zharkikh E.V., [1]Loktionova Y.I., [1]Kozlov I.O., [1]Zherebtsov E.A., [1]Zherebtsova A.I., [1]Dunaev A.V., [2]Sidorov V.V., [3]Krupatkin A.I.

[1]Orel State University named after I.S. Turgenev, Orel, *e.zharkikh@oreluniver.ru,

[2]SPE «LAZMA» Ltd, Moscow,

[3]National Medical Research Center of Traumatology and Orthopaedics, Moscow

Keywords: non-invasive diagnostics, laser Doppler flowmetry, fluorescence spectroscopy, microcirculation, diabetes mellitus

Annotation. The article presents the results of evaluating dynamic changes in perfusion and the state of oxidative metabolism of biological tissues in patients with diabetes mellitus using local temperature influences (cooling and heating). It is shown that the proposed approach in the form of joint application of laser Doppler flowmetry and fluorescence spectroscopy using local temperature tests has prospects in the analysis of the functional state of biological tissues. The registered increase in microcirculation and oxidative metabolism when using a local heat sample is significantly less pronounced in patients with diabetes compared to healthy controls.

## АНАЛИЗ И ДЕКОМПОЗИЦИЯ ЛАЗЕРНОГО ДОППЛЕРОВСКОГО СПЕКТРА ДЛЯ ОЦЕНКИ МИКРОСОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ВТОРОГО ТИПА

[1]Козлов И.О., [1,2]Жеребцов Е.А., [1]Жеребцова А.И., [1]Дунаев А.В.

[1] Научно-технологический центр биомедицинской фотоники, ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», г. Орел, *igor_57_orel@mail.ru,

[2] Optoelectronics and Measurement Techniques, University of Oulu, Oulu

Ключевые слова: лазерная допплеровская флоуметрия, неинвазивная диагностика, сахарный диабет 2 типа

Аннотация. Статья описывает новый подход к анализу допплеровский спектров, зарегистрированных от кожи пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Для обработки зарегистрированных данных было применено вычисление кривых кумулятивных сумм, записанных в течение базовой записи и реакции на нагрев. Результатом данной работы является введение нового параметра – значения площади между кривыми кумулятивных сумм. Данный подход показал свою эффективность в выявлении различий между пациентами и здоровыми добровольцами при проведении теплового теста.

Проблема растущей заболеваемости сахарным диабетом второго типа является вызовом для мировой системы здравоохранения и, по некоторым оценкам, затронет около 17 процентов населения к 2030 году [1]. На сегодняшний день разработано множество подходов к диагностике сосудистых осложнений при сахарном диабете [2][3]. В области диагностики микрокровотока хорошо зарекомендовали себя методы из области биофотоники: флуоресцентная спектроскопия [4], фотоплетизмография [5], видеокапилляроскопия [6], а также методы регистрации рассеянного в коже лазерного излучения [7]. Методы флуоресцентной спектроскопии направлены на анализ параметров клеточного дыхания с помощью анализа эндогенных флуорофоров NADH/FAD, регистрации уровня гликированного гемоглобина и гликированного коллагена. Методы, основанные на регистрации расссеянного света, часто используются для регистрации динамических параметров кровотока кожи: объёма крови в диагностическом объёме (фотоплетизмография), а также перфузии (спекл-контрастная визуализация и лазерная допплеровская флоуметрия (ЛДФ)). Данная работа посвящена развитию метода ЛДФ в области обработки регистрируемого сигнала и его применения в работе эндокринологического отделения городской больницы для анализа состояния микроциркуляции в коже верхней части стоп пациентов с сахарным диабетом 2 типа.

Метод ЛДФ основан на регистрации обратно рассеянного в коже рук лазерного излучения, претерпевшего допплеровский сдвиг [8]:

$$I_m = \int_{f_1}^{f_2} f \cdot S(f) df, \quad (1)$$