

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОДХОД ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНО-ТКАНЕВОЙ СИСТЕМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАЗЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ТЕМПЕРАТУРНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПРОБЫ

**В.В. Сидоров**, ген. директор ООО НПП «ЛАЗМА», *victor.v.sidorov@gmail.com*  
**Ю.Л. Рыбаков**, дир. центра, ФГБНУ НИИ РИНКЦЭ, д-р биол. наук, *rybakov@extech.ru*  
**В.М. Гукасов**, гл. науч. сотр. ФГБНУ НИИ РИНКЦЭ, д-р биол. наук,  
*v\_m\_gukasov@mail.ru*

*Разработан метод диагностики микроциркуляторно-тканевой системы, включающей микроциркуляцию кровотока, лимфотока и окислительный метаболизм, с применением функциональных температурных проб: охлаждением и нагревом. Метод направлен на изучение адаптации ткани при температурных тестах для оценки энергетического обеспечения метаболизма. Метод может быть применен для разных задач, так как основывается на общих физиологических процессах в ткани.*

**Ключевые слова:** микроциркуляция, коферменты окислительного метаболизма, лазерная доплеровская флоуметрия, лазерная флуоресцентная спектроскопия, функциональная температурная проба.

## DIAGNOSTIC APPROACH FOR ESTIMATION OF THE STATE OF MICROCIRCULATOR-TISSUE SYSTEM USING LASER TECHNOLOGIES AND TEMPERATURE FUNCTIONAL SAMPLE

**V.V. Sidorov**, General Director, SPE «LAZMA», Ltd, *victor.v.sidorov@gmail.com*  
**Y.L. Rybakov**, Director of Centre, SRI FRCEC, Ph.D. of Biology, *rybakov@extech.ru*  
**V.M. Gukasov**, Chief Scientific Officer, SRI FRCEC, Ph.D. of Biology, *v\_m\_gukasov@mail.ru*

*A method has been developed for diagnosis the microcirculatory-tissue system: microcirculation of blood flow, lymph flow and oxidative metabolism with using functional temperature probes: cooling and heating. The method is reserved at studying the adaptation of tissue at temperature tests to assess the energy supply of metabolism. The method can be used for different tasks, since it is based on general physiological processes in the tissue.*

**Keywords:** microcirculation, coenzymes of oxidative metabolism, laser Doppler flowmetry, laser fluorescence spectroscopy, functional temperature test, diabetes mellitus.

### Введение

Разработана технология неинвазивной оценки компарментов микроциркуляторно-тканевой системы (МТС) (синоним – функциональный элемент органа [1]): микроциркуляции кровотока, лимфотока и окислительного метаболизма биоткани с использованием лазерной доплеровской флоуметрии, лазерной флуоресцентной спектроскопии и функциональной температурной пробы. Указанные методы диагностики являются неинвазивными и противопоказаний для использования не имеют. В качестве объекта исследования в данной работе используется кожа большого пальца ноги. Указанная область наиболее нагружена в физиологическом плане по сравнению с другими областями, поэтому для неинвазивных исследований палец ноги наилучшим образом может отражать общее состояние МТС человека.

При исследовании *in vivo* принципиальным является получение диагностической информации из одной и той же области биоткани в реальном масштабе времени в связи с изменением биофизических характеристик ткани в процессе жизнедеятельности.

Метаболические процессы клеточных структур ткани энергозависимы. Изменение энергетического обмена лежит в основе большинства функциональных и энергетических нарушений в тканях. Все энергетические нарушения реализуются на молекулярном уровне [2]. Развитие патологии связано с энергетическим дисбалансом, с нарушением тканевого адекватного энергообразования в результате дефицита аэробного окисления глюкозы.

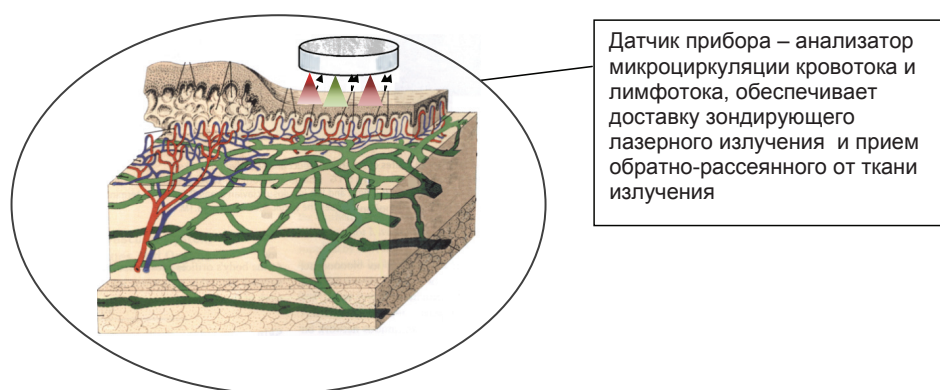
### Материал и методы

Диагностика основана на одновременной оценке активности тканевых коферментов: восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и окисленного флавинадениндинуклеотида (ФАД), участников окислительного метаболизма, способом лазерной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС) [3, 4] и показателей микроциркуляции кровотока и лимфотока методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) [5] в трех состояниях ткани: покой, охлаждение при 10°C (снижение активности микроциркуляции и метаболизма) и нагрев при 35°C (повышение активности микроциркуляции и метаболизма) при проведении температурной функциональной пробы. Метод реализован в Аппарате «ЛАЗМА СТ», состоящем из анализатора «ЛАЗМА-Д» для контроля периферического кровотока и лимфотока и коферментов окислительного метаболизма и блока «ЛАЗМА-ТЕСТ» для проведения функциональных температурных проб (регистрационное удостоверение Росздравнадзора № РЗН 2017/5844 от 08.06.2017 г.).

### Результаты

#### *Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови и лимфы*

Для диагностики применяется зондирование ткани лазерным излучением; обработка отраженного от ткани излучения основана на выделении из зарегистрированного сигнала доплеровского сдвига частоты отраженного сигнала, пропорционального скорости движения частиц в микроциркуляторном русле; в ходе проводимых исследований обеспечивается регистрация изменения потока крови или лимфы в микроциркуляторном русле – флоуметрия (рис. 1).



**Рис. 1. Схема зондирования ткани в методе лазерной доплеровской флоуметрии**

Результат флоуметрии может быть представлен выражением:

$$ПМ = K \cdot N_{эр} \cdot V_{ср}, \quad (1)$$

где: ПМ – показатель микроциркуляции (амплитуда сигнала в вольтах),  $K$  – коэффициент пропорциональности ( $K = 1$ ),  $N_{эр}$  – число рассеивателей в зондируемом объеме ткани,  $V_{ср}$  – средняя

скорость рассеивателей в зондируемом объеме. Основные рассеивающие частицы в микрососудах крови – эритроциты, в микролимфососудах – рассеиватели из интерстиции, попадающие в лимфатические микрососуды в процессе лимфообразования.

Таким образом, в неинвазивном методе ЛДФ результирующий параметр определяет динамическую характеристику микроциркуляции потока частиц – изменение потока в единицу времени в зондируемом объеме.

ЛДФ-сигнал имеет постоянную и переменную от времени составляющие, поэтому показатель микроциркуляции можно представить следующим выражением:

$$ПМ(t) = M + \delta ПМ(t), \quad (2)$$

где:  $M$  – постоянная составляющая потока и  $\delta ПМ(t)$  – переменная составляющая потока.

*Постоянная составляющая  $M$*  – это средний поток в микроциркуляторном русле за определенный промежуток времени исследований или за выбранный временной интервал анализа ЛДФ-граммы. Именно постоянная составляющая потока  $M$  является тем параметром, который сравнивают, когда диагностика основана только на анализе средней величины потока или в ходе исследований оцениваются реакции микроциркуляторного русла на функциональные пробы.

*Переменная составляющая ЛДФ-сигнала  $\delta ПМ(t)$*  обусловлена факторами, влияющими на постоянство потока частиц в микроциркуляторном русле, то есть связана с обстоятельствами, изменяющие величину скорости  $V_{cp}$  и концентрацию  $N_{cp}$  частиц. Характер изменения величины  $\delta ПМ(t)$  определяется вариациями во времени как просвета сосудов, их внутренних диаметров, так и скорости потока, которые контролируются регуляторными факторами в системе микроциркуляции.

В англоязычных публикациях встречаются разные названия измеряемого параметра при ЛДФ кровотока – это red (blood) cell flux, blood flux (flow), volume flux. В 1992 г. в Лондоне European Laser Doppler User Group (ELDUG) было рекомендовано применять при исследованиях единый термин «Laser Doppler Perfusion» (перфузия) для описания выходного сигнала, определяемый как произведение линейной скорости эритроцитов на их концентрацию.

Амплитуда сигнала, пропорциональная произведению (1), измеряется в относительных или перфузионных единицах (пф.ед. или п.е.).

Активные факторы контроля микроциркуляции (тонус-формирующие факторы, непосредственно воздействующие на микрососуды) – это эндотелиальный, миогенный и нейрогенный механизмы регуляции просвета сосудов. Эти факторы модулируют поток крови со стороны сосудистой стенки и реализуются через ее мышечно-тонический компонент. Исполнительным объектом или «мишенью» активных факторов контроля является мышечный компонент сосудистой стенки. В физиологических условиях мишенью нейрогенной регуляции являются артериолы и артериоло-веноулярные анастомозы, собственно миогенный компонент регуляции в чистом виде локализован на прекапиллярах и сфинктерах, эндотелиальная регуляция диаметра сосудов затрагивает преимущественно более проксимальные сосуды (мелкие артерии, крупные артериолы).

Пассивные факторы (факторы, формирующиеся вне системы микроциркуляции) – это пульсовая волна со стороны артерий и присасывающее действие «дыхательного насоса» со стороны вен. Эти колебания проникают с кровотоком в зондируемую область, так как микроциркуляторное русло, являющееся составной частью общей системы кровообращения, топографически расположено между артериями и венами.

Влияние активных и пассивных факторов на поток крови приводит к изменению скорости и концентрации потока эритроцитов. Эти изменения вызывают модуляцию перфузии, регистрируются в виде сложного колебательного процесса.

Активные механизмы создают поперечные колебания кровотока в результате чередования сокращения и расслабления мышц сосудов (сменяющие друг друга эпизоды вазоконстрикции и вазодилатации). Пассивные факторы организуют продольные колебания кровотока, выражающие в периодическом изменении давления и объема крови в сосуде. В артериях характер этих изменений определяется пульсовой волной, в венах — колебаниями «дыхательного насоса».

В переменной составляющей  $\delta\text{ПМк}(t)$  содержится ценная информация о модуляции кровотока. Ее расшифровка, анализ и интерпретация позволяет диагностировать состояние сосудистого тонуса и механизмов регуляции кровотоком в микроциркуляторном русле. Если постоянная составляющая ЛДФ-сигнала  $\text{Мк}$  характеризует величину перфузии, то  $\delta\text{ПМк}(t)$  — механизмы контроля за перфузией. Таким образом, для диагностики функционального состояния микроциркуляторного русла крови анализируются обе составляющие.

Кровеносные капилляры служат главным источником поступления жидкости в ткань, а вены — протеинов. 5–10% капиллярно-венулярного фильтрата транспортируется из ткани в лимфу и примерно 2–4 литра лимфы в день возвращается в циркуляцию. Лимфатические капилляры (ЛК) являются слепыми сосудистыми трубками диаметром 20–200 мкм, чаще 10–60 мкм (для сравнения диаметр у кровеносных капилляров 4–8 мкм). В англоязычной литературе их называют первичными или терминальными лимфатическими сосудами (initial or terminal lymphatics). Если гидростатическое давление интерстиция выше, чем в ЛК, растягиваются межэндотелиальные соединения, формируются своеобразные поры (первичные клапаны) диаметром около 2 мкм и происходит резорбция. Когда давление уравнивается, клетки эндотелия смыкаются и поступление жидкости в ЛК прекращается. Из ЛК лимфа попадает в лимфатический посткапилляр (ЛП), который имеет базальную мембрану и в нем появляются клапаны для ориентации движения лимфы, а также единичные миоциты, в том числе в зоне клапанов. Следующий отрезок лимфатического русла составляют лимфатические сосуды (ЛС), обладающие 3-х слойной стенкой с гладкими мышцами (contractile or collecting lymphatics). В каждом лимфангионе имеется свой водитель ритма (пейсмейкер), располагающийся на участке ближе к клапану. Фактически генерируемая ими активность — основная движущая сила лимфы (внутренний механизм транспорта лимфы). Основным механизмом, запускающим работу пейсмейкера, считается повышение внутрисосудистого давления и растяжение сосудистых гладких мышц. Лимфатическая система функционирует как дренажный отдел сердечно-сосудистой системы, который не связан с сердцем и специализируется на всасывании из межклеточных пространств и транспорте белков и их комплексов с другими веществами.

Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции лимфы реализована для диапазона скоростей кожного лимфотока, полученных у человека [6] 5–30 мкм/с. Показатель лимфотока оценивается в относительных единицах.

С помощью спектрального анализа записи лимфотока выявлены следующие частотные диапазоны осцилляций лимфотока в коже человека — эндотелиальные (0,005–0,015 Гц), пейсмейкерные фазные осцилляции (0,016–0,042 Гц), миогенные осцилляции (0,05–0,145 Гц) и дыхательные осцилляции (0,2–0,4 Гц) [7]. Лимфатические микрососуды чередуются и переплетаются с кровеносными микрососудами. Происходит механическое давление на микролимфососуды со стороны приносящих (артериолы) и отводящих (вены) кровеносных сосудов. Осцилляции в дыхательном диапазоне 0,2–0,4 Гц выявлялись непостоянно, связаны с механическим давлением со стороны венул. Вследствие высокого гидродинамического сопротивления лимфатических узлов дыхательные ритмы вряд ли могут проникать в периферические лимфатические сосуды и микрососуды, в связи с чем генез дыхательных осцил-

лений – передача на тонкостенные лимфатические сосуды дыхательных ритмов рядом расположенных венул и вен.

Режимы колебаний потока лимфы в микрососудах кожи человека реализуются в двух вариантах – мультистабильном, когда представлены осцилляции разных диапазонов частот и резонансном, когда отчетливо доминируют пейсмекерные фазные осцилляции, передающиеся, вероятно, из более глубоких подкожных мышечно-содержащих лимфатических сосудов.

#### **Лазерная флуоресцентная спектроскопия окислительных коферментов**

В качестве индикаторов окислительного метаболизма используются данные о флуоресценции коферментов: восстановленный никотинамидадениндинуклеотид и окисленный флавинадениндинуклеотид, содержащиеся в ткани. НАДН и ФАД концентрируются, главным образом в митохондриях.

Для возбуждения флуоресценции НАДН применяется излучение на длине волны 365 нм, длина волны флуоресценции НАДН – около 460–470 нм. Для возбуждения ФАД применяется излучение на длине волны 450 нм, а длина волны флуоресценции ФАД – около 510–520 нм.

Исследование реакции ткани при охлаждении до 10°C и нагреве до 35°C позволяет оценить изменения как микроциркуляции, так и концентрации коферментов относительно исходного состояния. Метаболические процессы клеточных структур организма энергезависимы. При охлаждении снижается скорость химических реакций субстрата и коферментов, при нагревании активируется утилизация субстрата и коферментов. Чем более выражены изменения в концентрациях НАДН и ФАД при пробе с нагревом по сравнению с контролем, тем меньше утилизировано субстрата и коферментов в исходном состоянии ткани, значительнее снижение окислительного метаболизма у пациента. Нормализация окислительного метаболизма связана с восстановлением утилизации субстрата и коферментов. Концентрация коферментов должна быть в пределах контрольных значений.

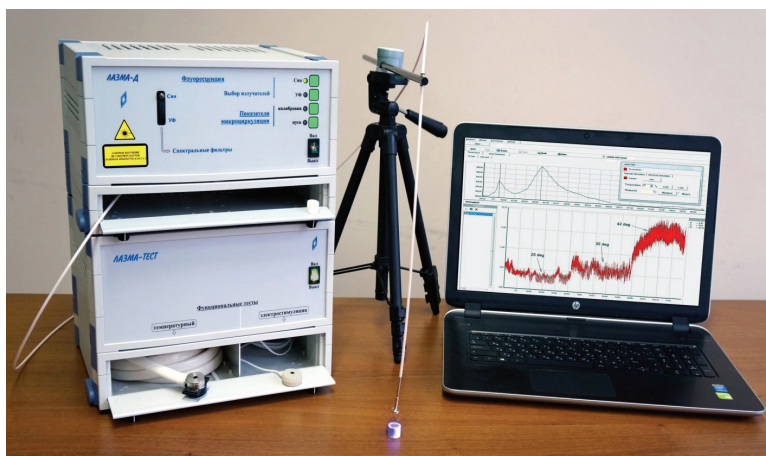
Для снижения оптической помехи при регистрации амплитуд флуоресценции коферментов НАДН и ФАД, обусловленной вкладом флуоресценции флуорофоров на длинах волн флуоресценции указанных коферментов, целесообразно оценивать состояние окислительного метаболизма на основе регистрации изменений ответов флуоресценции при температурном функциональном тесте. В величины приращения (при охлаждении) или уменьшения (при нагреве) амплитуд флуоресценции коферментов не входит флуоресценция коллагена, как одного из доминирующих флуорофоров в коже [6]. Нагрев и охлаждение при указанных температурах не изменяет содержание коллагена в ткани. При расчете величин изменения амплитуд флуоресценции НАДН и ФАД добавка от коллагена как постоянная величина, константа, вычитается.

Выбор температуры нагрева 35°C обусловлено несколькими обстоятельствами. Первое – при 35°C не происходит денатурации белка, в том числе коллагена [1]. Второе – эта температура находится вблизи диапазона 38–40°C, при которой наибольшая скорость ферментативных реакций [1]. Также при 35°C возрастает активность местных регуляторных механизмов кожного кровотока [5], приводящая к увеличению функционирующих капилляров микроциркуляторного русла кровотока.

При охлаждении, как известно, в ткани происходит холодовая вазодилатация, которая не позволяет однозначно зарегистрировать реакции замедления метаболизма из-за увеличения кровотока, как источника нагрева ткани. Охлаждение при 10°C обусловлено методикой оценки реакции ткани, именно при такой температуре время до наступления холодовой вазодилатации около 1 минуты, в течение которой возможно корректно получить данные по ослаблению утилизации субстрата и коферментов.

### Совмещение методов лазерной диагностики и температурного теста

Для обеспечения исследований *in vivo* одного объема биоткани рассмотренными методами в реальном масштабе времени создан аппарат «ЛАЗМА СТ», состоящий из анализатора «ЛАЗМА-Д» для контроля периферического кровотока и лимфотока и коферментов окислительного метаболизма и блока «ЛАЗМА-ТЕСТ» для проведения функциональных температурных проб (рис. 2).



**Рис. 2. Аппарат «ЛАЗМА СТ» совместно с ноутбуком, на котором установлено программное обеспечение для регистрации и обработки информации**

Оптический волоконный зонд, обеспечивающий доставку излучения лазерных источников и прием отраженного от ткани излучения, анализатора «ЛАЗМА-Д», совмещенный с температурным пробником блока «ЛАЗМА-ТЕСТ» фиксируется на большом пальце ноги, как показано на рис. 3.



**Рис. 3. Фиксация оптического волоконного зонда**

В работах по оценки окислительного метаболизма методом флуоресцентной спектроскопии применяются разные соотношения между амплитудами флуоресценции НАДН и ФАД. В данной методике регистрируются изменения амплитуд флуоресценции  $\Delta$  ФАД и  $\Delta$  НАДН

при температурной пробе относительно амплитуд флуоресценции коферментов при исходной температуре кожи.

Для практического применения предлагается оценивать изменения при температурной пробе показателей микроциркуляции кровотока, лимфотока и амплитуд флуоресценции коферментов относительно исходного состояния, до проведения температурного теста. Полученные результаты сравниваются с контрольными значениями.

### **Обсуждение и выводы**

Разработанный метод и диагностический Аппарат «ЛАЗМА СТ» позволяют дифференцировать состояние энергетического обеспечения метаболизма *in vivo* в зависимости от текущего физиологического состояния человека. Рассмотренный метод диагностики является неинвазивным и противопоказаний для использования не имеет. Метод может быть применен для разных задач, так как основывается на общих физиологических процессах в ткани. При исследованиях у здоровых людей, например, при тестировании спортсменов в ходе тренировочных нагрузок или при адаптационных испытаниях в ходе экстремальных нагрузок, а также при диагностике больных разной патологией. Подбор лекарственных средств для больных может осуществляться в зависимости от полученных результатов диагностики: при нарушениях только микроциркуляции и нормального состояния окислительного метаболизма (субкомпенсированные нарушения) или при стойких нарушениях как микроциркуляции, так и при замедлении химических процессов окислительного метаболизма (декомпенсированные нарушения). Указанный метод позволяет зарегистрировать улучшение энергетического обеспечения метаболизма при индивидуальном подборе терапии.

*Статья выполнена в рамках Государственного задания № 26.12599.2018/12.1 Министерства образования и науки Российской Федерации.*

### **Список литературы**

1. Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. Микроциркуляция. М., Медицина, 1975. 456 с.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. 3-е изд. стереотипное. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2008.
3. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007. Vol. 292, № 2, pp. C615–C640.
4. Mokry M., Gal P. and et al. Experimental study on predicting skin flap necrosis by fluorescence in the FAD and NADH bands during surgery// *Photochem. Photobiol.* 2007. Vol. 83, №. 5. pp. 1193–1196.
5. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: Колебания, информативность, нелинейность (Руководство для врачей) / Под ред. А.И. Крупаткина, В.В. Сидорова. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2013. 496 с.
6. Оптическая биомедицинская диагностика. В 2 т. / Пер. с англ. под ред. В.В. Тучина. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2007.
7. Krupatkin A.I. Oscillatory Processes in Lymph Microcirculation in Human Skin // *Human Physiology*, 2014, Vol. 40, No. 1, pp 52–57.

### **References**

1. Chernukh A.M., Aleksandrov P.N., Alekseev O.V. (1975) *Mikrotsirkulyatsiya* [Microcirculation] *Meditcina* [Medicine]. Moscow, p. 456.
2. Berezov T.T., Korovkin B.F. (2008) *Biologicheskaya khimiya. Uchebnik. 3-e izd.. stereotipnoe* [Biological chemistry: Textbook. 3rd Ed. Stereotyped] *OAO «Izdatel'stvo «Meditcina»* [«Medicine» Publishers]. Moscow.
3. Mayevsky A., Rogatsky G.G. (2007) Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* Vol. 292, No. 2, pp. C615–C640.

4. Mokry M., Gal P., et al. (2007) Experimental study on predicting skin flap necrosis by fluorescence in the FAD and NADH bands during surgery. *Photochem. Photobiol.* Vol. 83, No. 5, pp. 1193–1196.

5. (2013) *Funktsional'naya diagnostika sostoyaniya mikrotsirkulyatorno-tkanevykh sistem: Kolebaniya, informatsiya, nelineynost' (Rukovodstvo dlya vrachey). Pod red. A.I. Krupatkina, V.V. Sidorova* [Functional diagnostics of the state of microcirculatory-tissue systems: Oscillations, information, nonlinearity (Manual for Physicians). Ed. A.I. Krupatkin, V.V. Sidorov] *Knizhnyy dom «Librokom»* [Book House «Librokom»]. Moscow, 496 p.

6. (2007) *Opticheskaya biomeditsinskaya diagnostika* [Optical biomedical diagnostics] *V 2 t. Per. s angl. pod red. V.V. Tuchina. FIZMATLIT* [In 2 volumes Translated from English under the editorship of V.V. Toochin. FIZMATLIT]. Moscow.

7. Krupatkin A.I. (2014) Oscillatory Processes in Lymph Microcirculation in Human Skin. *Human Physiology*, Vol. 40, No. 1, pp. 52–57.