

Локтионова Кристина Валерьевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КОЖИ ДЛЯ ОЦЕНКИ
НАКОПЛЕНИЯ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ**

Направление 12.04.04 – Биотехнические системы и технологии
Направленность «Биомедицинская фотоника и электроника»

АВТОРЕФЕРАТ

Магистерской выпускной квалификационной работы

Работа выполнена на кафедре «Приборостроение, метрология и сертификация»
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»

Научный руководитель: кандидат технических наук, доцент,
старший научный сотрудник
научно-технологического центра
биомедицинской фотоники
Потапова Елена Владимировна

Официальный рецензент: старший преподаватель факультета
Прикладной оптики ФГАОУ ВО
«Санкт-Петербургский национальный
исследовательский университет
информационных технологий, механики
и оптики (Университет ИТМО)»,
кандидат технических наук
Маргарянц Никита Борисович

Защита состоится 16 июля 2020 года в 10⁰⁰ часов на заседании Государственной
экзаменационной комиссии по адресу: 302020, РФ, г.Орел Наугорское шоссе, 29

С выпускной квалификационной работой можно ознакомиться на кафедре ПМиС
ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Старение – это сложный биологический процесс постепенного нарушения функций клеток, тканей и органов, связанный с накоплением в организме тех или иных повреждений, в том числе различного рода химических веществ.

Практически все популярные теории старения сходятся в том, что оно проявляется как накопление повреждений, в том числе различного рода химических веществ, которые не могут быть переработаны организмом. К таким веществам относят конечные продукты гликирования (КПГ).

КПГ – это белки или липиды, которые становятся гликированными в результате воздействия сахаров. Они также известны как гликотоксины из-за вреда, который они могут нанести организму. Образование КПГ является частью нормального метаболизма, но если в тканях или кровотоке достигается чрезмерно высокий уровень КПГ, то они могут стать патогенными. Патологические эффекты КПГ связаны с их способностью стимулировать окислительный стресс и воспаление путем связывания с рецепторами поверхности клеток или сшивки с белками организма, изменяющей их структуру и функцию. Известно, что КПГ способствуют усилению окислительного стресса и воспаления и играют ключевую роль в патогенезе многих возрастных заболеваний.

Своевременный и достоверный гликемический контроль позволит снизить образование КПГ и избежать осложнений хронических и возрастных заболеваний.

В связи с вышесказанным становятся актуальными задачи поиска новых методов оценки накопления КПГ в биологических тканях и разработки устройств, реализующих эти методы.

Для этих задач наиболее оптимальным и перспективным является применение методов оптической диагностики, так как они обладают рядом преимуществ: неинвазивность, относительная простота применения и интерпретации полученных данных, быстрота диагностики, хорошая воспроизводимость результатов. К таким методам относится флуоресцентная спектроскопия (ФС).

Цели и задачи исследования.

Целью настоящей работы является повышение качества диагностики функционального состояния биологических тканей человека на основе оценки уровня накопления КПГ методом ФС.

Задачами исследования являются:

- 1) обзор и анализ существующих инструментальных методов оценки накопления КПГ в биологических тканях человека;
- 2) обоснование принципа получения диагностической информации об уровне накопления КПГ, основанного на применении метода ФС;
- 3) проведение теоретических и экспериментальных исследований с целью выявления информативных признаков, отражающих уровень накопления КПГ;
- 4) разработка метода оптической неинвазивной диагностики для

оценки уровня накопления КППГ;

5) разработка устройства оптической неинвазивной диагностики для исследования автофлуоресценции кожи с целью оценки уровня накопления КППГ.

Объектом исследования является биологические ткани организма человека. **Предметом исследования** являются метод и устройство оптической неинвазивной диагностики для оценки уровня накопления КППГ, основанный на флуоресцентной спектроскопии.

Методы исследования. Результаты работы получены на основе прикладной математической статистики, спектрального анализа, методов экспериментальных исследований.

Научная новизна работы заключается в том, что при решении поставленных задач исследования предложены:

1) метод оценки уровня накопления КППГ, основанный на регистрации интенсивности автофлуоресценции биомаркеров кожи, позволяющий получать диагностическую информацию об уровне накопления КППГ в режиме реального времени;

2) диагностический критерий оценки уровня накопления КППГ, основанный на анализе изменения автофлуоресценции кожи у разных возрастных групп.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

1) предложен принцип построения устройства оптической неинвазивной диагностики для оценки уровня накопления КППГ в тканях;

2) сформирована начальная база данных автофлуоресценции кожи у разных возрастных групп.

Результаты исследования использованы в научно-технологическом центре биомедицинской фотоники «ОГУ имени И.С. Тургенева» и включены в учебный процесс ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева» в качестве выполнения лабораторной работы по дисциплине «Неинвазивные диагностические методы исследования системы микроциркуляции крови» магистрами, обучающимися по направлению 12.04.04 «Биотехнические системы и технологии» направленность «Биомедицинская фотоника и электроника»).

Личный вклад автора заключается в проведении обзора текущего состояния вопросов оценки КППГ, планировании и проведении экспериментальных исследований, формулировке требований к разрабатываемому методу и устройству для исследования автофлуоресценции кожи для оценки КППГ.

Положения, выносимые на защиту:

1) метод оценки уровня накопления КППГ, основанный на регистрации интенсивности автофлуоресценции биомаркеров кожи с последующей математической обработкой данных;

2) выявленная зависимость интенсивности автофлуоресценции кожи от возраста человека;

3) принцип построения устройства исследования автофлуоресценции кожи

для определения уровня накопления конечных продуктов гликирования.

Степень достоверности и апробация результатов:

Достоверность результатов обоснована использованием апробированных и подтвержденных методов и методик обработки результатов измерений.

Апробация результатов. Основные результаты доложены на внутривузовской конференции «Неделя науки» в 2019 году.

Публикации:

По теме диссертации опубликованы 2 работы:

- статья в сборнике всероссийской научно-технической конференции;
- тезисы доклада на конференции международного уровня.

Структура и объем выпускной квалификационной работы:

Работа состоит из введения, трех глав, заключения, списка использованных источников, включающего 67 наименований, 13 приложений и изложена на 113 страницах машинописного текста, содержит 44 рисунка, 11 таблиц.

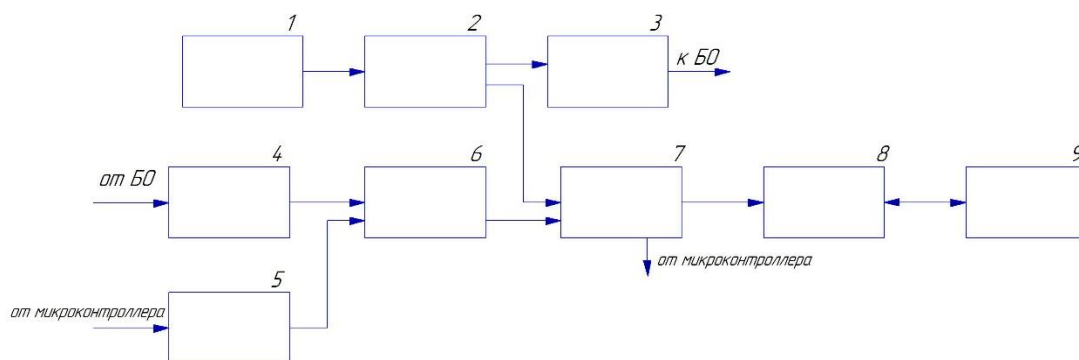
СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цели и задачи исследования, а также научная новизна и практическая значимость работы, определен объект исследования.

В первой главе приводится медико-биологическое описание объекта исследования, проводится обзор, краткое описание и классификация методов оценки КПП. Сформулированы основные требования, предъявляемые к методам оценки КПП, проведен анализ соответствия рассмотренных методов предъявленным требованиям. Проведенный анализ показал, что существующие методы оценки уровня КПП являются косвенными, субъективными, инвазивными и сложными к исполнению, либо дорогостоящими. В этой связи особую актуальность приобретает разработка метода и реализующего его устройства, позволяющего проводить неинвазивную оценку КПП. По результатам проведенного обзора установлена перспективность применения для поставленной цели метода флуоресцентной спектроскопии.

Метод флуоресцентной спектроскопии позволяет регистрировать спектры флуоресценции эндогенных и экзогенных флуорофоров кожи и оценивать накопление КПП.

На основании сформулированных медико-технических требований разработано устройство оптической неинвазивной диагностики для оценки КПП и описан принцип его работы. Была предложена структурная (рисунок 1), на основании которой была разработана электрическая принципиальная, произведен выбор и расчет элементов, рассчитаны конструктивные параметры печатной платы разрабатываемого устройства, рассчитаны толщина проводников и другие параметры.



- 1 – блок ручного управления; 3 – драйвер излучателя; 3 – источник УФ-излучения;
 4 – поляризатор; 5 – драйвер ПЗС-матрицы; 6 – ПЗС-матрица;
 7 – микроконтроллер; 8 – Bluetooth-канал; 9 – ПК

Рисунок 21 – Структурная схема устройства исследования автофлуоресценции кожи для оценки КПП

Во второй главе разработан технологический процесс изготовления двусторонней печатной платы и технологический процесс сборки печатного блока устройства, обоснован выбор технологических режимов, оборудования и оснастки.

В третьей главе представлены экспериментальные исследования автофлуоресценции кожи для оценки КПП.

На базе научно-технологического центра биомедицинской фотоники были проведены экспериментальные исследования с участием представителей разных возрастных групп, а также пациентов эндокринологического отделения Орловской областной клинической больницы. Для проведения исследований был использован канал флуоресцентной спектроскопии многофункционального лазерного диагностического комплекса «ЛАКК-МЦ» производства ООО НПП «ЛАЗМА».

Исследование представляло собой регистрацию спектра флуоресценции при возбуждении УФ светом (365 нм) и обратно-отраженного излучения биоткани. Анализируемыми параметрами являются амплитуды флуоресценции, амплитуды обратно-отраженного излучения и рассчитываемый нормированный спектр флуоресценции.

Исследования проводились в три этапа. На первом этапе проведено исследование автофлуоресценции кожи стоп, в котором приняли участие 2 группы условно здоровых добровольцев. В первую группу вошло 15 человек, средний возраст которых составил 20 ± 1 год. Во вторую группу вошло 15 человек, средний возраст которых составил 50 ± 5 лет.

Волоконно-оптический зонд устанавливался на тыльной стороне стопы в точке, расположенной на плато между 1-ым и 2-ым пальцем (рисунок 2).

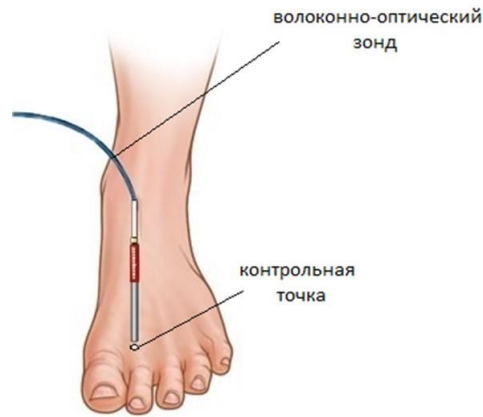


Рисунок 2 – Установка волоконно-оптического зонда при проведении исследования

Нормированная интенсивность АФ кожи стоп оказалась достоверно более высокой в старшей возрастной группе (рисунок 3).

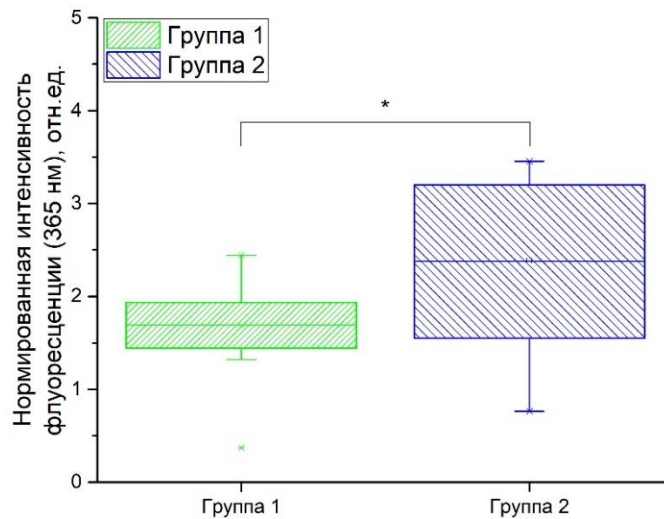


Рисунок 3 – Диаграмма размаха полученных значений нормированной интенсивности флуоресценции (365 нм) для двух возрастных групп

На втором этапе проведено сравнение интенсивности автофлуоресценции условно здоровых добровольцев и пациентов с сахарным диабетом второго типа одной возрастной группы.

В первую группу условно-здоровых добровольцев вошло 15 человек, средний возраст которых составил 50 ± 5 лет. Во вторую группу пациентов с сахарным диабетом второго типа вошло 15 человек, средний возраст которых составил 53 ± 3 года. Волоконно-оптический зонд устанавливался согласно рисунку 2.

Нормированная интенсивность АФ кожи стоп оказалась достоверно более высокой в группе пациентов с сахарным диабетом второго типа (рисунок 4). Это можно объяснить тем, что процессы гликирования коллагена при сахарном диабете происходят гораздо быстрее, чем у здоровых людей.

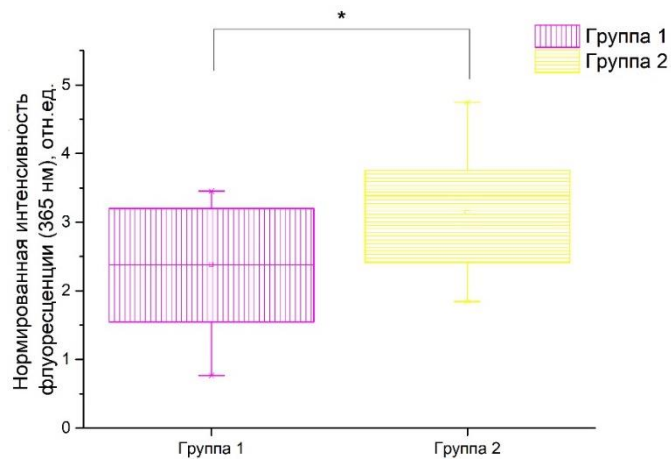


Рисунок 4 – Диаграмма размаха полученных значений нормированной интенсивности флуоресценции (365 нм) для условно здоровых добровольцев (группа 1) и пациентов с сахарным диабетом второго типа (группа 2)

На третьем этапе проведено исследование автофлуоресценции кожи рук, в котором приняли участие 2 группы условно здоровых добровольцев.

В первую группу вошло 10 человек, средний возраст которых составил 10 ± 2 года. Во вторую группу вошло 10 человек, средний возраст которых составил 25 ± 2 года.

Волоконно-оптический зонд устанавливался на волярной поверхности запястья (рисунок 5).

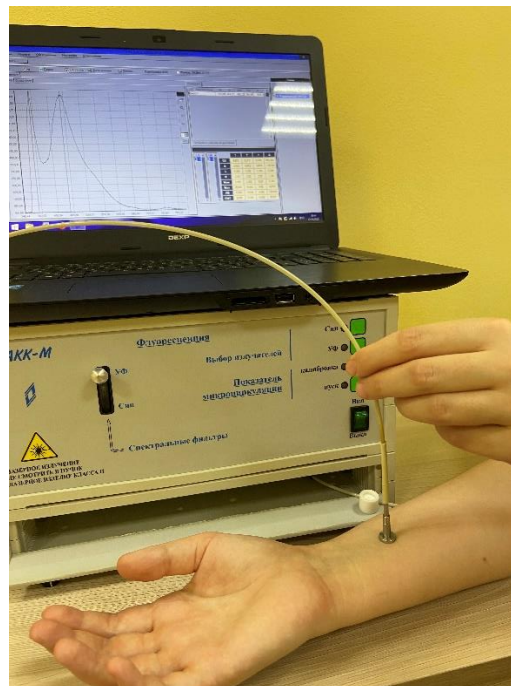


Рисунок 5 – Установка волоконно-оптического зонда на волярную поверхность запястья при проведении исследования

Примеры спектров флуоресценции представителей разных возрастных групп при возбуждении на длине волны 365 нм приведены на рисунках 6 и 7.

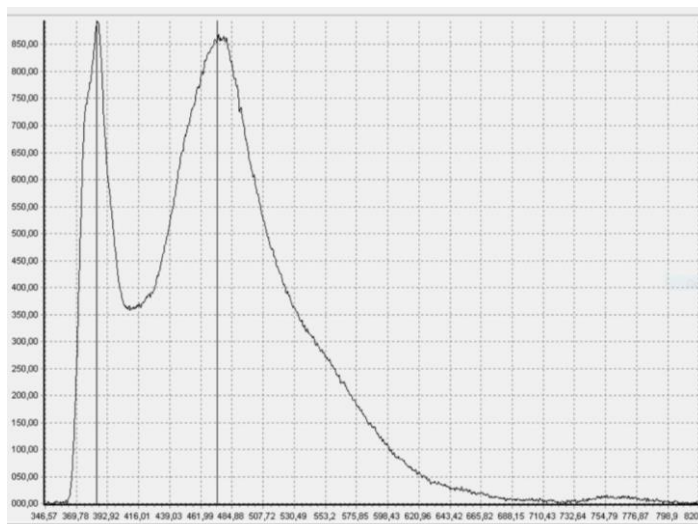


Рисунок 6 – Спектр флуоресценции кожи при возбуждении на длине волны 365 нм (пол – женский, возраст - 24 года)

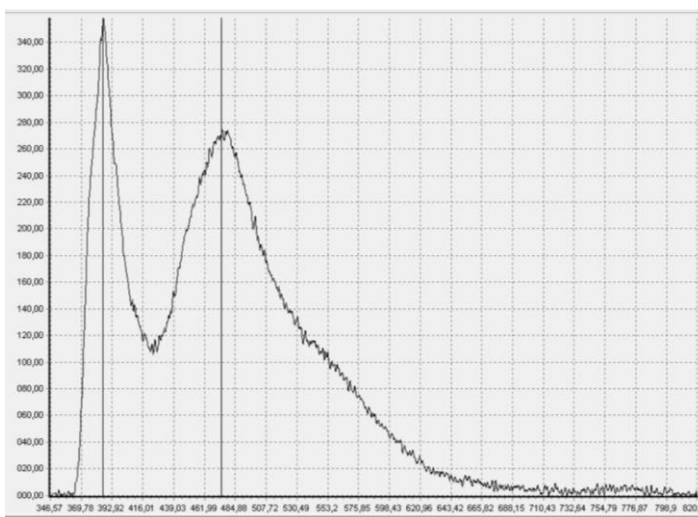


Рисунок 7 – Спектр флуоресценции кожи при возбуждении на длине волны 365 нм (пол – мужской, возраст – 8 лет)

Интенсивность АФ кожи рук оказалась достоверно более высокой в старшей возрастной группе (рисунок 8, 9).

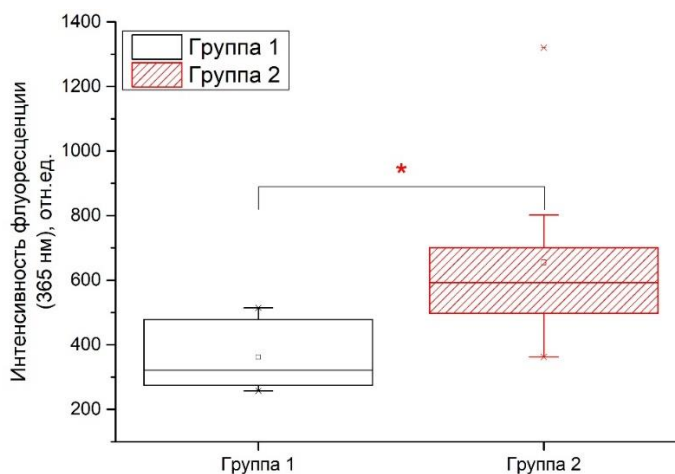


Рисунок 8 – Диаграмма размаха полученных значений интенсивности флуоресценции (365 нм) для двух возрастных групп

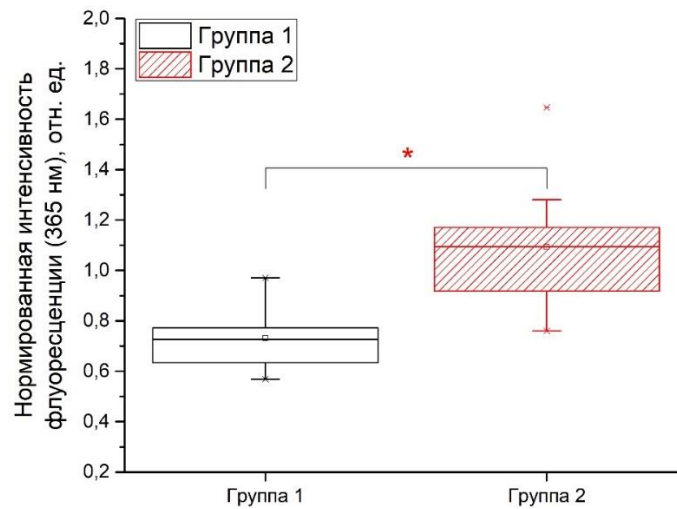


Рисунок 9 – Диаграмма размаха полученных значений нормированной интенсивности флуоресценции (365 нм) для двух возрастных групп

Полученные результаты свидетельствуют о зависимости интенсивности флуоресценции от возраста, что может указывать на более высокий уровень накопления КПП в коже у представителей старшей группы, а также более высокий уровень гликирования белков у больных диабетом.

В заключении изложены основные выводы о возможности применения метода флуоресцентной спектроскопии для оценки КПП.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

- 1) проведен обзор существующих методов оценки КПП;
- 2) предложен метод оптической неинвазивной диагностики для оценки КПП в тканях;
- 3) предложен принцип построения устройства оптической неинвазивной диагностики для оценки уровня накопления КПП в тканях;
- 4) сформирована начальная база данных автофлуоресценции кожи у разных возрастных групп.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статья в сборнике статей всероссийской научно-технической конференции:

1 **Нечушкина, К.В.** Исследование автофлуоресценции кожи в разных возрастных группах для оценки накопления конечных продуктов гликирования / **К.В. Нечушкина (Локтионова), Е.В. Жарких, Е.В. Потапова** // Биотехнические, медицинские, экологические системы и робототехнические комплексы. – Рязань.: 2018. – С. 297-300.

Тезисы доклада:

2 **Нечушкина, К.В.** Применение флуоресцентной спектроскопии для количественного анализа накопления конечных продуктов гликирования в разных возрастных группах / **К.В. Нечушкина (Локтионова), Е.В. Жарких, Е.В. Потапова** // «Проблемы автоматизации» - тезисы докладов двенадцатой международной научно-технической конференции. – Киев.: 2018. – С. 127-128.