

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

Спекл-контрастная визуализация сосудистой системы в условиях
развития экспериментальной модели диабета 1 типа

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 4082 группы
направления 12.03.04 Биотехнические системы и технологии
код и наименование направления (специальности)

Института физики

наименование факультета, института, колледжа

Сырова Михаила Владимировича

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель (руководитель)

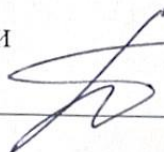
Доцент, к.ф.-м.н.



П.А. Тимошина

Зав. кафедрой оптики и биофотоники

Проф. д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН



В.В. Тучин

Саратов 2025 г

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет 1 типа (СД1) сопровождается серьезными нарушениями микроциркуляции, приводящими к ангиопатиям, ретинопатии, нефропатии и другим осложнениям. В последние годы интерес исследователей привлекает спекл-контрастная визуализация (СКВ), позволяющая неинвазивно оценивать состояние микроциркуляторного русла.

Для решения этой проблемы используются оптические просветляющие агенты (ОПА), временно уменьшающие рассеяние света. Их сочетание с СКВ открывает новые возможности для изучения микроциркуляторных изменений при экспериментальном СД1, улучшая качество изображения и позволяя анализировать сосудистые изменения на ранних стадиях заболевания.

Актуальность исследования обусловлена высокой значимостью СД1 как фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний, ограниченностью существующих методов оптической визуализации и перспективностью комбинированного подхода с использованием ОПА для ранней диагностики сосудистых осложнений.

Целью работы стало изучение эффективности применения МРТ- и рентгеноконтрастных агентов, а также Полиэтиленгликоля-300 (ПЭГ-300®) в качестве ОПА для СКВ ушей крыс с экспериментальным СД1. Для этого были поставлены следующие **задачи**:

- Анализ принципов оптического просветления и СКВ.
- Проведение экспериментального исследования эффективности СКВ для анализа динамики кровотока ушей крыс *in vivo* при диабете и воздействии ОПА.
- Обработка и анализ результатов для выявления наиболее эффективного ОПА.

Структура и объем работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения, основной части, состоящей из теоретического и

экспериментального раздела, включающих в себя 2 главы, заключения и списка используемой литературы. Всего в работе 54 страницы

Глава 1. Теоретические основы исследования микроциркуляции

1.1 Обзор современных методов оптической диагностики

Обзор анализирует влияние оптических просветляющих агентов (ОПА) на микроциркуляцию *in vivo* с помощью спекл-контрастной визуализации, оценивающей динамические характеристики кровотока в мельчайших сосудах.

В статье [1] Дьяченко П.А. и др. исследовали микроциркуляцию подкожного кровотока при злокачественной опухоли с помощью LSCI и 70% раствора глицерина. У контрольной группы скорость кровотока снизилась в 2 раза, у патологических групп — в 2,8 и 4 раза через 14 и 28 дней после прививки опухоли соответственно.

В главе книги [2] рассмотрены неинвазивные оптические методы оценки кровотока и лимфотока, включая лазерную спекл-визуализацию, фотоакустическую проточную цитометрию и ОКТ. Описаны исследования по повышению пространственного разрешения и глубины зондирования.

В работе [3] изучены возможности и ограничения ЛСКВ для функциональной визуализации кровотока. Исследовано влияние статических рассеивателей на спекл-контраст и предложен коэффициент динамики спеклов (CSD) для коррекции данных. Разработан метод коррекции контраста на основе ЛСКВ и флуоресцентной микроскопии. Также предложен подход с гиперспектральной камерой и многодлинноволновым источником света для глубинного разрешения кровотока.

В статье [12] представлен обзор развития ЛСКВ для измерения кровотока. Метод основан на флуктуациях спекл-паттернов при движении рассеивающих частиц. ЛСКВ применяется для мониторинга мозгового кровотока, изучения микроциркуляции и диагностики заболеваний благодаря простоте, неинвазивности и низкой стоимости. Ограничения включают

умеренное пространственное разрешение и необходимость калибровки. Перспективы развития метода включают уточнение теоретических моделей и расширение областей применения.

1.2 Оптические свойства крови

Кровь рассеивает свет в видимой и ближней ИК областях из-за различий показателей преломления эритроцитов и плазмы. Оптическое просветление улучшает визуализацию, снижая рассеяние с помощью агентов, таких как декстраны, глицерин и глюкоза. Эти агенты изменяют морфологию и агрегацию эритроцитов, приближая показатели преломления плазмы и эритроцитов.

Оптическое просветление крови успешно применяется для улучшения визуализации *in vivo*. Исследование влияния оптических агентов на сосуды важно для разработки методов лечения сердечно-сосудистых заболеваний. [5-13]

1.3 Спекл-контрастная визуализация: принцип работы и применение

Спекл-контрастная визуализация (СКВ) — это метод визуализации, основанный на использовании естественных флуктуаций интенсивности рассеянного света в ткани для получения изображений кровотока в поверхностных сосудах.

СКВ использует алгоритмы обработки изображений для отслеживания этих изменений в спекл-узоре и выделения информации о кровотоке.

Метод спекл-контрастной визуализации обладает следующими существенными достоинствами:

- Метод полностью неинвазивен, что исключает необходимость применения контрастных веществ для инъекций и исключает любое хирургическое вмешательство в организм пациента.
- Технология характеризуется высокой скоростью получения изображений, позволяющей осуществлять непрерывный мониторинг микроциркуляции крови в режиме реального времени.

- Метод обеспечивает возможность длительного наблюдения за состоянием микроциркуляторного русла, что дает возможность фиксировать и анализировать изменения показателей кровотока на протяжении длительного периода времени.

1.4 Особенности микроциркуляции при сахарном диабете

При сахарном диабете в организме формируется особая метаболическая среда, которая вызывает комплекс патологических изменений в сосудистой системе. На ранних стадиях заболевания развивается повышенная эндотелиальная дисфункция, сопровождающаяся окислительным стрессом, легким воспалением и гиперактивностью тромбоцитов. [12]

В результате этих нарушений происходит значительное ухудшение функционирования сосудистой стенки. Диабет вызывает эндотелиальную дисфункцию — состояние, при котором внутренняя оболочка сосудов начинает работать неправильно. В результате этого клетки, выстилающие сосуды, начинают вырабатывать больше веществ, которые помогают клеткам крови прикрепляться к стенкам сосудов.

Сосудистые изменения проявляются в виде повышенной жесткости сосудистой стенки и нарушения проницаемости клеточного слоя. [12, 13].

1.4.1 Модель экспериментального диабета

Основной причиной развития сахарного диабета является дефицит инсулина в организме, который запускает цепочку патологических изменений, приводящих к повышенному содержанию сахара в крови (гипергликемии).

В современной эндокринологии особое место занимает модель аллоксанового диабета, которая активно используется в экспериментальных исследованиях. Суть метода заключается в том, что животным вводят специальное вещество — аллоксан, которое целенаправленно воздействует на β -клетки островков поджелудочной железы, вызывая различную степень недостаточности инсулина.

Глава 2. Экспериментальное исследование

В данном исследовании лабораторных животных разделили на здоровую и диабетическую группы. Развитие модельного диабета 1 типа у крыс диабетической группы вызвали однократной внутримышечной инъекцией аллоксана (Acros Organic, Бельгия), растворенного в физиологическом растворе, из расчета 22 мг аллоксана на 100 г массы тела крысы. Средние значения уровня свободной глюкозы в крови крыс, взятой из хвостовой вены, измеренные натощак до введения аллоксана и через 2 недели после инъекции в день эксперимента составили 4,2 и 25 mmol/литр соответственно. Таким образом, уровень глюкозы в крови животных увеличился в 6 раз. Контрольной группе крыс аллоксан не вводился.

2.1 Методы и материалы

В методе спекл-визуализации проводится оценка контраста усредняемых по времени динамических спеклов в зависимости от времени усреднения спекл-модулированных изображений. Расчет пространственного контраста K производился по регистрируемому изображению спекл-поля по области, размер которой составлял 5×5 пикселей [14]:

$$K_k = \frac{\sigma_{I_k}}{\bar{I}_k} \quad (1),$$

где k — число кадров в последовательности спекл-модулированных изображений, $\bar{I}_k$ и σ_{I_k} усредненная по интенсивности рассеянного света анализируемого кадра и среднеквадратичное значение флуктуационной составляющей яркости пикселя, соответственно:

Связь между контрастом K и временем корреляции τ_c зависит от того, предполагается ли распределение скоростей рассеивателей нормальным (Гауссовым) или Лоренцевым [15, 16]. Если время корреляции τ_c равно времени экспозиции, то обе модели распределения скоростей приводят к соотношению между K и τ_c [15], а именно:

$$\tau_c = 2TK^2 \quad (2)$$

Ранние работы [17–18] демонстрируют связь времени корреляции с характерной скоростью потока (CFR), без учета влияния эффектов множественного рассеяния, в связи с этим можно внести такой параметр как поправочный коэффициент, зависящий от рассеивающих свойств биологической ткани или фантома, и зависимость CFR от времени корреляции примет следующий вид

$$v_c = \frac{\lambda}{2\pi a \tau_c} \quad (3),$$

где λ – длина волны источника, a – поправочный коэффициент, зависящий от рассеивающих свойств биологической ткани или фантома.

Для изучения микрогемодинамики использовалось оборудование с методом спекл-визуализации, позволяющее детально отслеживать кровоток в микрососудах.

Изображения поверхности изучаемой области, полученные с помощью спекл-модуляции, были зафиксированы монохромной КМОП-камерой. (Thorlabs CS235MU серии Kiralux, количество пикселей в матрице 1920x1200 пикселей (2.3 мегапикселя), размер пикселя 5.86x5.86 мкм; 12 бит/пиксель), со временем экспозиции T 10-15 мс, количество кадров (снимков) в секунду 39.7 кадров/сек. Камера оснащена микро-объективом ЛОМО с кратностью увеличения 3.7×. Лазерный луч от He-Ne лазера с длиной волны 633 нм направляется по оптоволокну на коллимирующее зеркало, далее на исследуемый объект, расположенный на специальном стеклянном столике.

В качестве зон исследования рассматривали области ушей лабораторных крыс. Далее регистрировали спекл-изображения в лазерном излучении, направленном через ткань. Регистрировали изображения сосудов исследуемой области уха крыс до и после нанесения просветляющих агентов на исследуемую область в течение 16 мин с момента первой аппликации.

2.2 Оптические просветляющие агенты.

Биологические ткани имеют сложную гетерогенную структуру, которая вызывает интенсивное рассеяние света, что затрудняет применение оптических методов для диагностики заболеваний. Использование техники оптического просветления тканей помогает снизить уровень рассеяния.

Для этого применяются Оптические просветляющие агенты (ОПА) — вещества, которые используют для увеличения глубины проникновения света в исследуемые биологические ткани и органы, а также для улучшения их визуализации.

В данном исследовании рассматриваются следующие оптические просветляющие агенты:

1. Гадовист® (Gadobutrol) – парамагнитный МРТ-контрастный препарат (мол. масса 604,72 г/моль, концентрация 1,0 ммоль/мл, производство Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Германия).
2. Магневист® (Gadopentetate dimeglumine) – еще один МРТ-контрастный агент (мол. масса 938,02 г/моль, концентрация 0,5 ммоль/мл, Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Германия).
3. Аккупак-300® (Iohexol) – рентгеноконтрастное вещество (647 мг/мл, GE Healthcare Buchler GmbH & Co.KG, Германия), содержащее йод.
4. ПЭГ-300® (НорПэг 300, полиэтиленгликоль) – биосовместимый полимер (производство ООО «НОРКЕМ», Россия), широко используемый в биомедицинских исследованиях.

Показатели преломления на длине волны 633 нм составляли 1,41 для Гадовиста®, 1,3997 для Магневиста®, 1,43 для Аккупак-300® и 1,46 для ПЭГ-300® [19].

В качестве объекта исследования в проводимом эксперименте выступали участки кожи ушей лабораторных крыс. Использованный объем для каждого ОПА составлял 100 мкл.

2.3 Результаты и обсуждение проведенных экспериментов

На представленных графиках наблюдается изменение контрастности в динамических областях, под воздействием оптических агентов. В частности, выявлены существенные различия в контрасте между диабетической и контрольной группами лабораторных крыс при использовании ПЭГ-300®, Магневиста® и Гадовиста®.

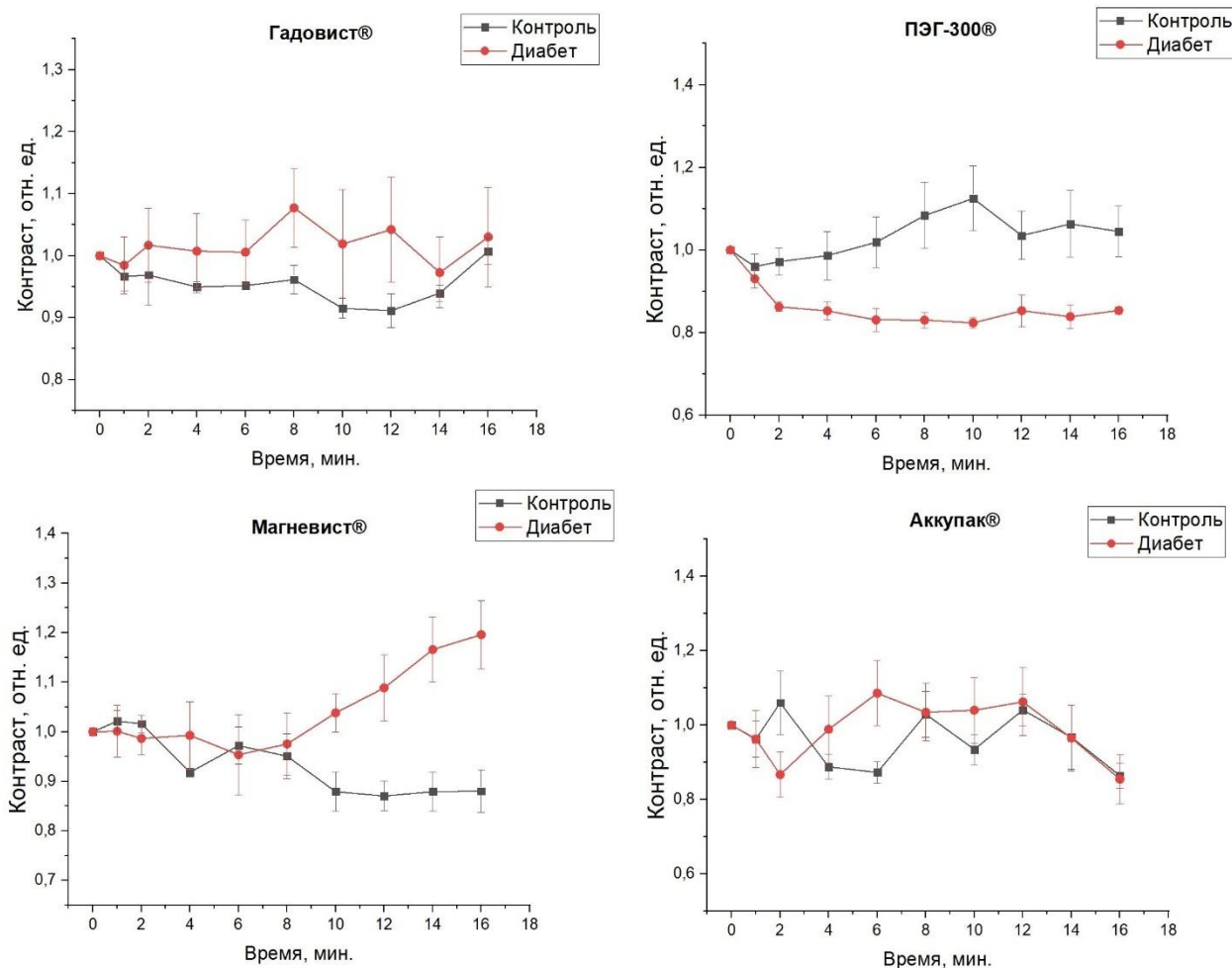


Рисунок 1 - Значение контраста в динамической области уха крысы под влиянием ОПА

2.3.1 Анализ изменений контраста

На представленных качественных графиках наблюдается изменение контраста спеклов в сосудах под влиянием оптических агентов.

Магневист продемонстрировал результаты с увеличением контраста спеклов на 30% в диабетической группе и уменьшением на 12% в

контрольной. Гадовист показал незначительное уменьшение в здоровой группе и до 10% в диабетической.

ПЭГ-300 продемонстрировал до 12% увеличения контраста в здоровой группе и уменьшение на 17% в диабетической.

Аккупак-300 практически не повлиял на контрастность: менее 5% в здоровой группе и всего 2% в диабетической, что является статистически незначимым результатом.

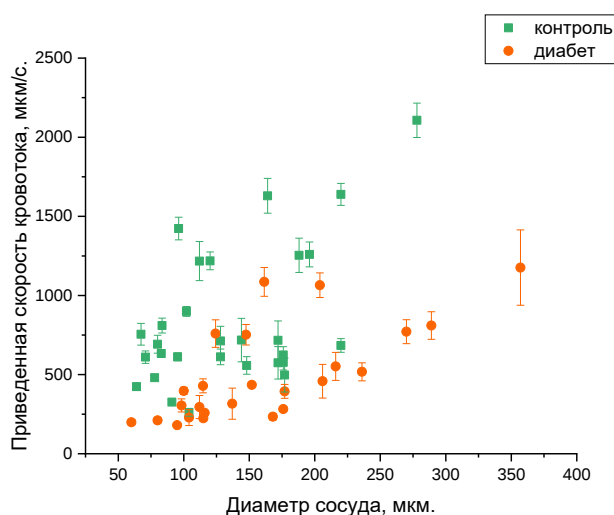


Рисунок 2 - Изменение микрогемодинамики в сосудах ушей лабораторных крыс диабетической и здоровой группы.

Данные о скорости кровотока в сосудах ушей лабораторных крыс, полученные в группе больных диабетом, демонстрируют сниженные показатели, относительно группы здоровых животных.

При сахарном диабете наблюдается значительное снижение скорости кровотока.

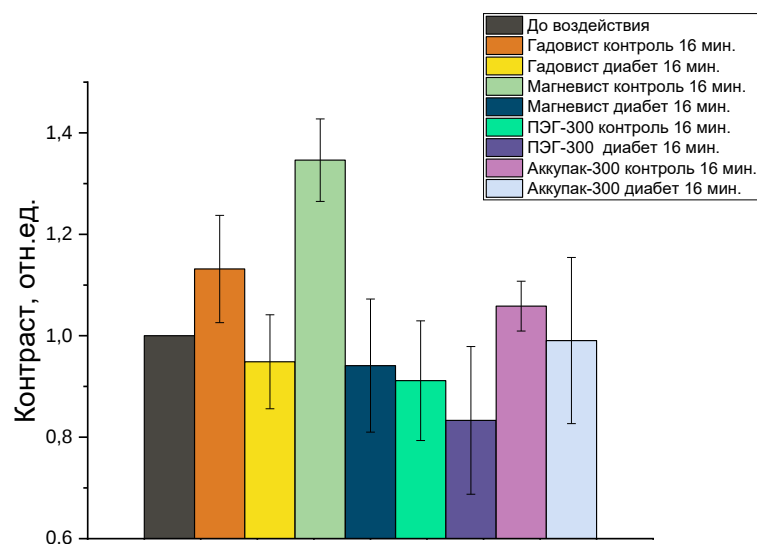


Рисунок 3 - Значение контраста в статичных областях уха крысы под влиянием ОПА.

Результат, полученный на статичных областях, демонстрирует увеличение контраста статической площади к 16-й минуте оптического просветления здоровой группы животных на 13% при использовании Гадовиста, на 34% при использовании Магневиста и снижение на 9% при использовании ПЭГ-300, У Аккупака не произошло изменений в контрасте. В группе больных диабетом произошло уменьшение контрастности статической площади: 6% у Гадовиста и Магневиста, 17% у ПЭГ-300.

Чтобы понять характер изменения контраста, был проведен эксперимент на фантомах, который показал зависимость концентрации вещества и контраста (при увеличении концентрации рассеивателя TiO_2 уменьшается контраст, соответственно рассеяние увеличилось)

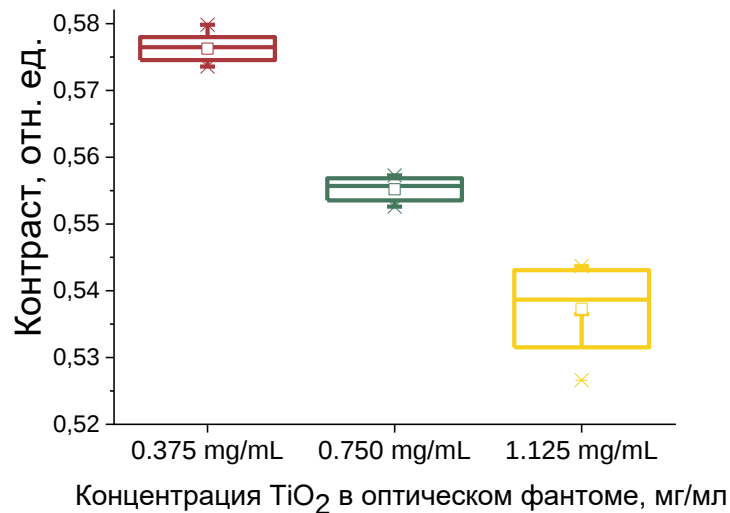


Рисунок 4 - Влияние различных концентраций рассеивателя в фантоме на значение контраста.

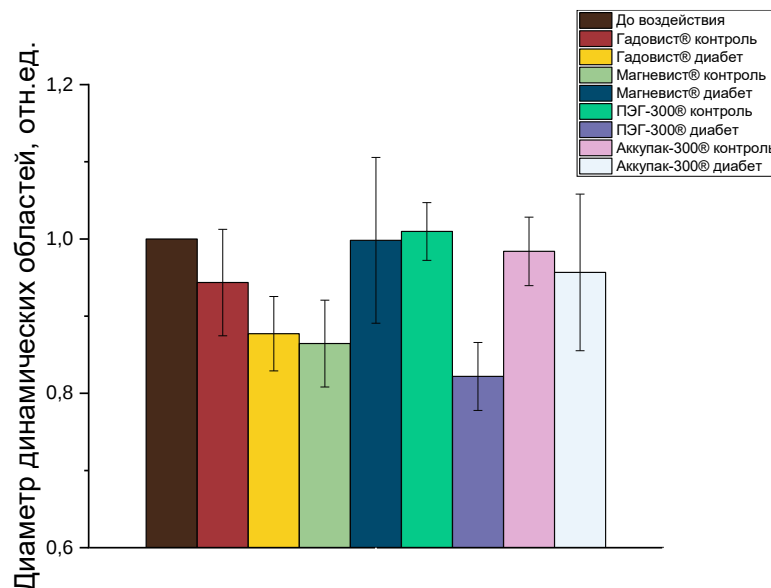


Рисунок 5 - Изменение диаметра сосудов под влиянием ОПА

На графике представлены нормированные изменения диаметров сосудов у здоровых и диабетических крыс под воздействием оптических агентов. В здоровой группе Гадовист и Магневист уменьшают диаметр сосудов на 6 и 14% соответственно, на представленных ранее графиках контраст так же уменьшился что свидетельствует о увеличении скорости кровотока. В группе больных диабетом Гадовист уменьшает диаметр на 13%, Магневист не влияет на диаметр,

ПЭГ-300® вызывает незначительное увеличение диаметра сосудов у здоровых крыс, а у диабетических — диаметр уменьшается на 17%. Аккупак-300® практически не влияет на сосуды в обеих группах.

Можно отметить, что в группах с уменьшенным диаметром, уменьшился контраст, а значит увеличивается скорость кровотока.

В **заключении** дан перечень основных выводов, полученных в результате проведенных исследований, приводится краткая оценка основных результатов, полученных при выполнении работы.

ВЫВОДЫ

Спекл-контрастная визуализация — неинвазивный метод, обеспечивающий оценку микроциркуляции в реальном времени. Он позволяет дифференцировать здоровые и патологические ткани, а также анализировать функциональное состояние сосудов. Применение оптических просветляющих агентов повышает эффективность спекл-визуализации, улучшая контраст спеклов и расширяя возможности метода. Это открывает перспективы для доклинических и клинических исследований, включая мониторинг структурных и функциональных изменений в сосудистых тканях.

Метод неинвазивен и даёт возможность произвести оценку важных биомедицинских параметров, что делает его ценным инструментом для мультимодальной диагностики.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Дьяченко, П. А. Анализ влияния гиперосмотического агента на микроциркуляцию крови в коже в условиях развития патологии методом лазерной спекл- контрастной визуализации / П. А. Дьяченко, А. Б. Бучарская, В. В. Тучин // Взаимодействие сверхвысокочастотного, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами : Сборник статей восьмой Всероссийской научной школы-семинара, Саратов, 24 мая 2021 года / Под редакцией Ал.В. Скрипаля. – Саратов: Издательство "Саратовский источник", 2021. – С. 175-178. – EDN IODCMB.
2. Polina A. Dyachenko (Timoshina), Arkady S. Abdurashitov, Oxana V. Semyachkina-Glushkovskaya, and Valery V. Tuchin «Blood and lymph flow imaging at optical clearing» Handbook of tissue optical clearing: new prospects in optical imaging. Boca Raton: CRC Press, 2022. P. 393-404
3. Sdobnov A., Bykov A., Popov A., Zhrebtsov E., Meglinski I. Investigation of speckle pattern dynamics by laser speckle contrast imaging // Proceedings of SPIE: Biophotonics: Photonics Solutions for Better Health Care VI. 2018. Vol. 10685. P. 1068509. DOI: 10.1117/12.2306631.
4. Briers J.D. Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow / J.D. Briers // Optica Applicata. — 2007. — Vol. XXXVII, No. 1–2. — P. 141–156.
5. R. Munker, E. Hiller, J. Glass, and R. Paquette, Eds., Modern Hematology, 2nd ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ (2007).
6. N. Bosschaart, G.J. Edelman, M.C.G. Aalders, T.G. van Leeuwen, and D.J. Faber, “A literature review and novel theoretical approach on the optical properties of whole blood.
7. V.V. Tuchin, I.L. Maksimova, D.A. Zimnyakov, I.L. Kon, A.H. Mavlyutov, and A.A. Mishin, “Light propagation in tissues with controlled optical properties,” Journal of Biomedical Optics 2(4), 401–417 (1997).

8. G. Vargas, E.K. Chan, J.K. Barton, H.G. Rylander, and A.J. Welch, "Use of an agent to reduce scattering in skin," *Lasers in Surgery and Medicine* 24(2), 133–141 (1999).
9. R.K. Wang, X. Xu, V.V. Tuchin, and J.B. Elder, "Concurrent enhancement of imaging depth and contrast for optical coherence tomography by hyperosmotic agents," *Journal of the Optical Society of America B* 18(7), 948–953 (2001).
10. A.N. Bashkatov, E.A. Genina, Y.P. Sinichkin, V.I. Kochubey, N.A. Lakodina, and V.V. Tuchin, "Glucose and mannitol diffusion in human dura mater," *Biophysical Journal* 85(5), 3310–3318 (2003).
11. E.A. Genina, A.N. Bashkatov, and V.V. Tuchin, "Tissue optical immersion clearing," *Expert Review of Medical Devices* 7(6), 825–842 (2010).
12. Cade WT. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther.* 2008;88(11):1322-1335.
13. Sena CM, Pereira AM, Seica R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2216-2231.
14. J. D. Briers Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging, *Physiol. Meas.*, V.22, 35–66 (2001); K. Basak et al., "Review of laser speckle-based analysis in medical imaging," *Med. Biol. Eng. Comput.* 50(6), 547-558 (2012).
15. K. Khaksari, and S. J. Kirkpatrick, "Laser speckle contrast imaging is sensitive to advective flux," *J. Biomed. Opt.* 21(7), 076001, doi: 10.1117/1.JBO.21.7.076001 (2016).
16. Phan T. et al. Quantitative hemodynamic imaging: a method to correct the effects of optical properties on laser speckle imaging // *Neurophotonics*. – 2023. – T. 10. – №. 4. – C. 045001-045001.
17. Briers J. D. Capillary Blood Flow Monitoring Using Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA) / J. D. Briers, G. Richards, X. W. He // *J. Biomed. Opt.* – 1999. – V. 4, №1. – P. 164-175.

18. Basak K. Review of laser speckle-based analysis in medical imaging / K. Basak, M. Manjunatha, P. K. Dutta // Med. Biol. Eng. Comput. – 2012. – V. 50, №6. – P. 547-558.

19. Tuchina DK, Meerovich IG, Sindeeva OA, et al. Magnetic resonance contrast agents in optical clearing: Prospects for multimodal tissue imaging. J Biophotonics. 2020;13(11): e201960249.