

А.А.Аристов, Е.В. Носова, А.Н.Солдатов

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ФОТОМЕТРИИ ЛЕЖАЩИХ КАПЕЛЬ ДЛЯ ЗАДАЧ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Аннотация

В статье представлены теоретические обоснования и экспериментальные исследования, посвященные разработке метода диагностики жидких сред на основе фотометрии образцов проб в виде лежащих капель. Приведены обоснования механизмов влияния протекающих в капельных пробах процессов на их оптические свойства. Представлены результаты апробация метода фотометрии капель для оценки динамики оседания эритроцитов и процесса образования фибринового сгустка при проведении клоттинговых тестов.

Введение

Принцип работы большинства медицинских анализаторов состава и свойств биологических сред основан на регистрации оптических свойств конечного “продукта”, полученного в результате преобразования исходной пробы. И, соответственно, все манипуляции с пробой перед фотометрическим измерением направлены на то, чтобы вызвать максимальное изменение величины того или иного фотометрического показателя от изменения концентрации анализируемого компонента или в зависимости от активности протекающих процессов. В связи с этим, данные исследования всегда сопровождаются многоэтапной пробоподготовкой, что неизбежно влечет появление и накопление ошибок в ходе анализа. Причем эта ошибка будет возрастать с уменьшением объемов жидкостей, с которыми производят манипуляции. Следовательно, при работе с малыми объемами проб необходимо оптимизировать сами измерительные оптические методики с целью повышения их чувствительности к исследуемому процессу.

Как показал анализ существующих научных работ, на сегодняшний день направление создания диагностических систем для исследования биологических и химических проб с использованием малого объема анализируемого вещества является актуальным и интенсивно развивающимся.

С нашей точки зрения, интересным направлением в аналитических исследованиях является разработка “открытых” кювет, где объем и форма исследуемой области задается силами поверхностного натяжения жидкости и межфазными взаимодействиями с подложкой, т.е. исследования проводятся с образцами в виде капель. Это позволяет сократить объемы проб до нескольких микролитров или даже сотен нанолитров. Кроме этого, появляется возможность помимо оценки оптических свойств среды исследовать энергетические характеристики образца, которые меняются в ходе химических и физико-химических преобразований вещества.

Достаточно полный анализ применения капельных методик на период до 2000г. приведен в обзоре К.Е. Miller и Synovec R.E. и др. [1]. В нем приводится анализ работ по исследованию химических и физических явлений связанных с каплями и микрожидкостными системами, а также рассматриваются вопросы технологий, связанных с капельными анализаторами химического вещества. В области медицинских лабораторных исследований также достаточно активно изучают возможности этих методов, но их применение в области массовых анализов ограничивает как отсутствие простой аппаратуры для их проведения так и соответствующих методик, разработанных под конкретные виды медицинского анализа.

Нами также изучается вопрос применения капельных образцов для проведения клинических лабораторных тестов. Анализ и результаты апробации предлагаемой нами методики представлены в данной статье.

Метод фотометрии капельных образцов. Теоретические аспекты

В основном, исследование жидкостей с использованием капель основаны на оценке их геометрических параметров, для чего используются системы фото и видео регистрации боковой проекции капли с дальнейшей обработкой. Оценка же оптических свойств образца при этом обычно не производится. В большинстве известных разработок, основанных на оценке энергетических характеристик пробы и использующих для этого методы фотометрии, чаще всего в роли объектов выступают висящие капли. Так McMillan N.D. и его

сотрудниками разработан волоконный капельный анализатор [2] принцип работы которого заключается в следующем. На конце волоконного датчика формируется висящая капля. Свет вводится через оптоволокно на определенный участок поверхности капли и переотражаясь от её внутренней поверхности, собирается во второе волокно. Фотометрирование производят в течение всего процесса образования, роста и отрыва капли от подложки. Полученный с фотоприемника сигнал связан с поверхностным натяжением, вязкостью и коэффициентом преломления исследуемого раствора. Однако, аппаратура, для получения висящих капель, весьма сложна, поскольку требуется точный контроль давления в системе. Кроме того, не смотря на малые объемы самой капли, объем пробы, в связи с необходимостью заполнения всей гидродинамической системы, будет все равно весьма значителен. И анализировать в данной системе возможно только достаточно прозрачные жидкости. Биологические же жидкости это мутные, гетерогенные среды и поэтому применение многих подобных методик для них ограничено.

Нами рассматривается метод фотометрирования, когда исследуемый образец размещается в форме свободно лежащей капли, на прозрачной кювете, между соосно расположенными источником и приемником оптического излучения (*рис.1*). В наших исследованиях для размещения капельных образцов мы использовали самостоятельно изготовленные кюветы из органического стекла, ограничивающие диаметр основания капли и не позволяющие ей растекаться.

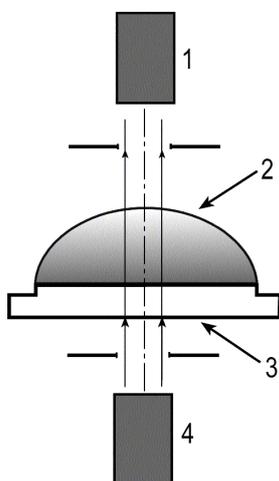


Рис. 1. Схема реализации метода фотометрии капельной пробы: 1 – приемник излучения; 2 – капельная проба; 3 – прозрачная гидрофобная подложка; 4 – источник излучения.

Описание конструкции экспериментальной установки, на которой мы проводили исследования, содержится в патенте РФ на полезную модель [3]. Согласно предложенной нами схемы исследования (*рис.1*) интенсивность светового потока, попадающего на фотоприемник, будет определяться как оптическими свойствами среды, так и геометрией капли, которая зависит от объема образца и его внутренней энергией. Пробы жидкости одного объема и одинаковой оптической плотности, но имеющие разное поверхностное натяжение (при фиксированном диаметре основания), будут формировать капли разной высоты, соответственно, толщина просвечиваемого слоя также будет различна, что значительно скажется на проходящем через каплю световом потоке. Причем, для сильно поглощающих сред эта разница будет в большей степени ощутима. При исследовании прозрачных сред, дополнительным фактором, влияющим на интенсивность светового потока, попадающего на фотоприемник, будет являться фокусировка излучения капель. Фокусирующие свойства капли-линзы будут меняться как от ее геометрии, так и оптических свойств среды. Также важными факторами, влияющим на форму и оптические свойства капли, являются процессы перераспределения компонентов среды в объеме капельного образца под действием сил тяжести, поверхностных сил и микропотоков, возникающих в каплях [4].

Таким образом, при фотометрировании проб в виде лежащих капель, мы учитываем целый ряд физических параметров капельного образца, которые связаны с составом и свойствами изучаемой среды. Соответственно, при надлежащей методике проведения эксперимента, правильном подборе параметров оптической измерительной системы (с учетом изучаемого процесса) и соответствующей аналитической обработке данных возможно повышение чувствительности и информативности исследования без каких либо технических усложнений оптического измерительного устройства.

Проведенные нами исследования по постановке некоторых медицинских лабораторных анализов в образцах в виде лежащих капель и оценке их результатов на основе метода фотометрии, показал возможность применения

данной методики исследования к целому ряду изучаемых в медицинской практике процессов.

Результаты применения метода фотометрии капельных проб

Нами были проведены экспериментальные исследования по применению метода фотометрии капель для оценки процессов агрегации и седиментации эритроцитов, а также образования фибринового сгустка при клоттинговых тестах.

Исследование процесса оседания эритроцитов

Тест по определению скорости оседания эритроцитов (СОЭ) применяется как в российской (метод Панченкова), так и зарубежной (метод Вестергрена) медицинской практике. В российской практике СОЭ входит в число тестов общего анализа крови. Однако, несмотря на наличие гематологических анализаторов, которые позволяют автоматизировать процесс проведения общего анализа, данный тест они не выполняют и определение СОЭ приходится проводить отдельно. Причем, объем крови необходимый для данного анализа (до 500 мкл по методу Панченкова и до 2 мл по методу Вестергрена), значительно превышает объем необходимый для теста на гематологическом анализаторе (около 20 мкл).

Рассмотрим явления, которые происходят при оседании эритроцитов в образце крови в виде капли и как это отражается на ее оптических свойствах. Предшествующий оседанию процесс образования клеточных агрегатов ведет к уменьшению рассеивающих свойства среды и увеличению прозрачности образца. Оседание эритроцитарных агрегатов в капле будет несколько отлочно от оседания в цилиндрических сосудах. Так, несмотря на то, что поверхность капли на границе раздела кровь-воздух близка к сферической, верхняя граница оседающего слоя клеток в капле – практически плоская (*рис.2*). Следовательно, происходит перераспределение клеток, оседающих в центральной осевой области капли по всему объему оседающего слоя. Это приводит к уменьшению числа клеток в осевой области и, соответственно, увеличению прозрачности этой области капли [5]. Кроме этого, над слоем осевших клеток образуется

надосадочный слой плазмы крови, которая выполняет роль фокусирующей линзы [6]. Нами экспериментально показано, что изменение интенсивности светового потока, прошедшего через каплю при оседании эритроцитов, практически линейно связано с толщиной осевшего слоя клеток [5] и может быть использовано для анализа данного процесса [7].

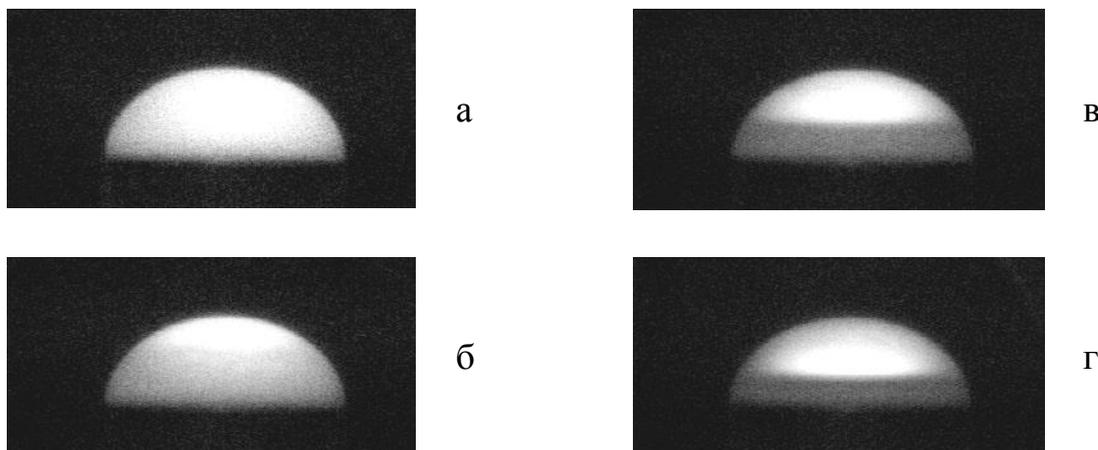


Рис. 2. Кинограмма оседания эритроцитов в капле: а) – 0 мин, б) – 3 мин, в) – 7 мин, г) – 13 мин. Диаметр основания капли – 5,3 мм, объем – 25 мкл, высота – 1,95 мм, СОЭ образца крови (по методу Панченкова) – 60 мм/ч.

Чтобы показать преимущества метода фотометрии капель, мы провели сравнительные исследования изменения оптических свойств одних и тех же образцов крови помещенных в плоскую горизонтальную кювету, относительно образцов сформированных в виде капли. Толщина слоя крови в плоской кювете соответствовала высоте капельного образца (2 мм), чтобы обеспечить одинаковую величину просвечиваемого слоя клеток. Экспериментальные фотометрические кривые, отражающие величину светопропускания, для капельного образца и плоской кюветы, в процессе оседания эритроцитов, представлены на *рис. 3*. Изменение интенсивности светового излучения оценивалось по величине напряжения с выхода фотоэлектрического преобразователя (ФЭП), усиливающего сигналы с приемников излучения. Из графика видно, что скорость нарастания кривых для капельной пробы значительно выше по-сравнению с плоской кюветой при одинаковых значениях СОЭ. А также, более заметна разница между кривыми для образцов с высоким

и низким СОЭ, что говорит о большей чувствительности метода фотометрии капли к процессам, происходящим в образце, по-сравнению с фотометрией в плоской кювете, в которой таких явлений, как перераспределение клеток и фокусировка не наблюдается. Кроме того на фотометрической кривой для капель (рис. 3) можно различить два участка: начальный - отражающий процесс агрегации эритроцитов и следующий за ним – связанный уже с процессом оседания клеточных агрегатов, что повышает диагностическую ценность данного исследования.

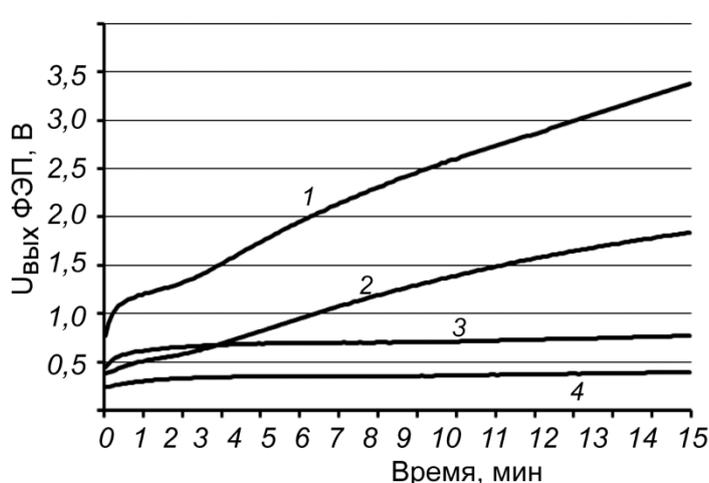


Рис. 3. Экспериментальные фотометрические кривые в процессе оседания эритроцитов в капельной пробе (графики 1 и 2) и в плоской кювете (3, 4) для образцов с разным значением СОЭ: графики 1 и 3 – 50мм/ч; 2, 4 – 8 мм/ч

Оценка процесса коагуляции крови

Мы применили метод фотометрии капельных проб к оценке образования фибринового сгустка в ходе клоттинговых тестов, используемых для исследования системы гемостаза. При данном исследовании в результате взаимодействия компонентов свертывающей системы плазмы крови с соответствующими реагентами тестовых наборов в образце формируется сгусток фибрина. Обычно для его выявления используют оптико-механические анализаторы, где фиксируется момент образования сгустка, на основе оценки вязкости среды, или изменения мутности среды (реже).

Нами были получены кривые светопропускания капельных образцов в процессе образования фибриновых нитей. В экспериментальных исследованиях

мы использовали тест для определения протромбинового времени. По методике описанной в инструкции к тестовому набору (изготовитель «Технология-Стандарт», г.Баранаул) подготавливались реагенты к анализу (техпластин и плазма крови). Затем данные реагенты смешивались непосредственно на фотометрической кювете, образуя пробы в виде капель, после чего сразу же проводилось их фотометрирование. Вид фотометрической кривой (рис.4) при просвечивании капельных проб отличается от известных кривых, получаемых в методиках определения свертывания крови оптическим способом, на которых наблюдается лишь общее помутнение образца. Кривая имеет более сложный характер. Причем, наибольшие изменения сигнала наблюдаются при установке фотоприемника в области оптического фокуса капли.

Форму типичного оптического сигнала фиксируемого в области фокуса в процессе коагуляции можно объяснить следующими физическими явлениями [8]. Сразу же после смешивания реагентов начинается процесс образования фибриновых нитей по всему объёму капли, и происходит общее помутнение среды, в результате чего амплитуда оптического сигнала уменьшается. Затем, нити фибрина формируют сгусток, который локализуется в основном в центре капли. При этом края капли освобождаются от нитей, вследствие чего просветляются, и начинают в большей степени фокусировать излучение и наблюдается рост амплитуды сигнала с фотоприемника.

Были проведены экспериментальные исследования по фотометрии образцов плазмы с разным временем свертывания. Как видно из графиков на *рис.4*, значениям времени свертывания, определенным на серийном коагулометре «АПГ4-02-П», соответствуют положения минимумов на экспериментальных фотометрических кривых для капельных образцов. Соответственно, в качестве показателя, характеризующего время свертываемости крови, может быть использовано временное положение минимума, а также скорость спада и нарастания на кривой светопропускания.

Таким образом, экспериментальные исследования показали возможность использования рассматриваемого метода для получения информации о

динамике всего процесса коагуляции, а не только фиксации момента образования сгустка.

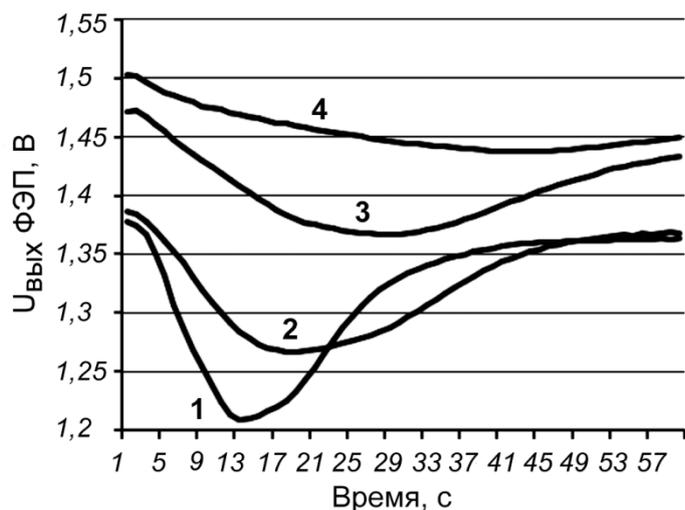


Рис. 4. Фотометрические кривые образцов плазмы с разным временем образования сгустка. Время свертывания для образцов 1, 2, 3 и 4, определенное на коагулометре АПГ4-02-П, составляет соответственно 13 - 15с, 18 - 20с, 26 - 30с, 41 - 50с.

Заклучение

Основываясь на теоретических изысканиях и полученных результатах в ходе экспериментальных исследованиях, мы полагаем, что методика фотометрирования капельных образцов может найти достаточно широкое применение в сфере медицинских диагностических технологий. Многие медико-биологические тесты основаны на физико-химическом взаимодействии компонентов исследуемой среды (агглютинация, агрегация, адсорбция и т.д.), в результате которых происходит изменение ее дисперсности и это влечет к значительным изменениям оптических и энергетических свойств среды. Конечно, в зависимости от исследуемой среды или изучаемого процесса надо подбирать параметры оптической системы (длина волны, диаметр пучка, расположение приемника, объем пробы и др.). Поэтому, каждое практическое применение методики требует дополнительных исследований, которые необходимы для создания модели поведения оптической капельной системы в зависимости от происходящих в образце процессов, чтоб можно было

использовать полученные в ходе исследования данные для проведения диагностики.

Список литературы:

1. *Miller K.E. et al.* “Review of Analytical Measurements Facilitated by Drop Formation Technology”, *Talanta*, 2000. - Vol.51 (5). - P.921-933.
 2. *McMillan N.* “Apparatus and method for measuring a property of a liquid”, US Pat. 4910402 (20.03.90).
 3. *Аристов А. А.* Устройство для оценки физических свойств биологических жидкостей. Патент РФ на ПМ № 47526 РФ. Оpubл. 2005.
 4. *Яхно Т.А., Яхно В.Г.* Основы структурной эволюции высыхающих капель биологических жидкостей // *Журнал технической физики*, 2009, том 79, вып. 8, с.133-141.
 5. *Aristov A.A., Evtushenko G.S., Ermolovich D.G.* Micromethod of an estimate of erythrocyte sedimentation rate // *Proc. SPIE 7006, Lasers for Measurements and Information Transfer 2007*, 700610 (29 April 2008); doi:10.1117/12.802305
 6. *Аристов А.А., Рафальский А.С.* Анализ процессов, происходящих при оседании клеток в капельных пробах крови и их влияние на оптические свойства образца // *Контроль. Диагностика*, 2012 - №. 13 - С. 150-153
 7. *Аристов А.А.* Способ определения динамики оседания клеток крови. Патент РФ на изобретение № 2379687 РФ. Оpubл. 2010.
 8. *Aristov A.A., Zhoglo, E.V.* Estimation of blood clotting in the drip samples using optical methods. *Proc. of 2014 International Conference on Mechanical Engineering, Automation and Control Systems, MEACS 2014*, 15 December 2014.
- Аристов Александр Александрович**, канд. тех. наук, доцент, Томский политехнический университет, кафедра “Промышленной и медицинской электроники”, aristov@tpu.ru
- Носова Екатерина Владимировна**, аспирант, Томский политехнический университет, кафедра “Промышленной и медицинской электроники”, zhogloev@gmail.com

Солдатов Анатолий Николаевич, доктор физ.-мат. наук, профессор, Томский государственный университет, факультет инновационных технологий, декан,
general@tic.tsu.ru