

На правах рукописи

Аристов Александр Александрович

БИОТЕХНИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ
ПРОЦЕССА ОСЕДАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ В МИКРООБЪЕМАХ

Специальность 05.11.17 – приборы, системы и изделия
медицинского назначения

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Томск – 2006

Работа выполнена в ГОУ ВПО “Томский политехнический университет” и ГОУ ВПО “Сибирский государственный медицинский университет Росздрава”

Научный руководитель	- кандидат технических наук, доцент Пеккер Яков Семенович
Научный консультант	- доктор медицинских наук Рязанцева Наталья Владимировна
Официальные оппоненты:	- доктор технических наук Градобоев Александр Васильевич - кандидат технических наук Уманский Олег Семенович
Ведущая организация:	- ГОУВПО “Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет “ЛЭТИ” им. В.И.Ульянова (Ленина)”

Защита диссертации состоится “ 19 “ сентября 2006 г. в 15⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д212.269.09 в Томском политехническом университете по адресу: 634028, г.Томск, ул.Савиных, 7, библиотека НИИ интроскопии.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Томского политехнического университета по адресу: г. Томск, ул. Белинского, 53.

Автореферат разослан “ 30 “ Июня 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.269.09

доцент, к.т.н.

Б.Б. Винокуров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Измерение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) является одним из наиболее часто проводимых в клинике исследований крови. Анализ СОЭ широко используется как в нашей стране, так и в зарубежной медицинской практике. Актуальность вопроса оптимизации и автоматизации процесса оценки седиментационных характеристик эритроцитов определяется высокой клинической ценностью показателя СОЭ, по которому можно судить о наличии патологических процессов в организме, отслеживать течение болезни и эффективность проводимой терапии, и в то же время, значительными временными затратами на его постановку и необходимостью забора достаточно большого объема крови от пациента для проведения этого исследования.

Существующие современные методы оптимизации анализа СОЭ, в том числе реализованные в конкретных приборах, позволяют снизить время его проведения до 15–20 мин (стандартный метод занимает 1–2 ч), повысить чувствительность и снизить ошибку оператора. Однако одной из основных задач в плане оптимизации анализа все еще остается проблема снижения объема необходимой для исследования пробы. Так, стандартный принятый в зарубежной практике метод Вестергрена требует забора 2 мл венозной крови. Для используемого в России микрометода Панченкова необходимо около 0,2 мл крови. Но так как в последнем случае используют капиллярную кровь, которую обычно получают путем прокола мягких тканей пальца, нужный для анализа объем крови набрать достаточно сложно. Кровь приходится выжимать из пальца с определенным усилием, что чревато травматизацией клеток, перемешиванием крови с лимфой и приводит к искажению величины СОЭ. Кроме того, сложность получения требуемого объема крови приводит к неточности при разведении образца, что также ведет к ошибке анализа. В случае проведения данного анализа у детей вопрос минимизации объема исследуемого образца становится еще более актуальным.

Существующие зарубежные автоматизированные приборы по измерению СОЭ пока не разрешены к применению в клинической практике Российских лабораторий, так как не удовлетворяют Российским стандартам (основаны на методе Вестергрена). Российскими производителями медицинской аппаратуры, по имеющимся у нас данным, серийно такие приборы не выпускаются.

В связи с вышеизложенным актуальным остается вопрос разработки высокоэффективной, автоматизированной лабораторной диагностической аппаратуры для контроля за состоянием системы крови и, в частности, позволяющей производить оценку седиментационных характеристик эритроцитов крови в микропробе за короткий промежуток времени.

Цель работы и задачи исследования. Целью работы является обоснование и разработка экспресс-метода, а также соответствующих технических средств, для оценки процесса оседания эритроцитов в микропробе крови без специальной пробоподготовки и модификации объекта исследования.

В работе решались следующие основные задачи:

1. Изучение возможности применения физико-химических методов и технических средств для оценки процесса оседания эритроцитов в микропробе без специальной пробоподготовки и модификации объекта исследования.
2. Анализ физических процессов, происходящих в лежащей капельной пробе (ЛКП) исследуемой крови в ходе оседания клеток.
3. Оценка влияния различных биофизических и физико-химических факторов на процессы поглощения и рассеяния светового монохроматического излучения, проходящего вертикально через ЛКП крови.
4. Разработка приближенной модели прохождения светового излучения через капельную пробу крови при протекании в ней процесса оседания клеток.
5. Обоснование и экспериментальное исследование методов получения количественной информации о характере течения процесса оседания эритроцитов крови по динамике изменения показателя светопропускания ЛКП.
6. Создание и испытание действующего макета технической системы оценки седиментационных свойств крови и экспериментальное подтверждение эффективности разработанного метода.

Методы исследования. Поставленные задачи решались в соответствии с основными принципами поэтапного моделирования биотехнических систем путем сочетания теоретических и экспериментальных методов исследования.

При решении поставленных задач использовались методы физического и математического моделирования. Экспериментальные исследования проводились с использованием разработанных нами исследовательских измерительных приборов. Получаемые данные сравнивались со стандартными, принятыми в клинической лабораторной практике методами.

Научная новизна работы:

1. Доказана принципиальная возможность создания лабораторно-диагностических методов и систем оценки динамических показателей биологических жидкостей без специальной пробоподготовки в основе которых лежит фотометрия ЛКП исследуемого образца.
2. Разработана приближенная физико-математическая модель изменения интенсивности оптического излучения, проходящего через ЛКП крови, от протекающего в пробе процесса оседания эритроцитов, учитывающая оптические и геометрические свойства пробы.
3. Экспериментально подтверждены основные положения предложенной модели прохождения излучения через ЛКП в ходе оседания в ней частиц.
4. Определены основные режимы проведения фотометрических измерений исследуемой биопробы, обеспечивающие соблюдение принципов адекватности и идентификации информационной среды.
5. Разработан принцип построения аппаратных средств для осуществления экспресс-метода оценки динамики оседания эритроцитов крови в микрообъеме.
6. Разработан оригинальный экспресс-метод оценки скорости оседания эритроцитов в микрообъеме крови, результаты которого хорошо согласуются со стандартной методикой Панченкова.

Практическая ценность и реализация результатов работы. Предложен и исследован новый подход к оценке динамических характеристик биологических дисперсных сред, в частности, скорости оседания эритроцитов, основанный на фотометрировании проб, имеющих форму лежащей капли.

Разработана и сконструирована установка, позволяющая реализовать предложенный метод исследования. Конструкция устройства защищена патентом на полезную модель РФ (2005г). Прибор прошел экспериментальную клиническую апробацию в центральной научно-исследовательской лаборатории и клиниках ГОУВПО “СибГМУ Росздрави”, клиниках Военно-медицинского института, отделении пульмонологии Томской областной клинической больницы.

Разработанный метод анализа малых объемов проб использован при выполнении г/б НИОКР по созданию прибора для оценки фагоцитарной активности нейтрофилов крови (программа “Конверсия и высокие технологии”, 1994–1996 гг.), автоматизации метода диагностики онкологических заболеваний (грант Министерства образования и науки РФ, 2005г), а также инициативных НИР по исследованию оптических свойств биологических сред малых объемов, выполняемых на кафедре “Промышленной и медицинской электроники” ГОУВПО “ТПУ”.

Результаты диссертации внедрены в научный и учебный процесс кафедры “Промышленной и медицинской электроники” ГОУВПО “ТПУ”, “Биологической и медицинской кибернетики” ГОУВПО “СибГМУ Росздрави”.

Положения, выносимые на защиту:

1 Фотометрирование пробы крови, сформированной в виде лежащей капли, позволяет произвести оценку скорости оседания эритроцитов и динамики процесса. При этом регистрируется изменение величины светопропускания в осевой части капельного образца в спектральном диапазоне 750–950 нм (оптимум – 805 нм).

2 Разработанная математическая модель светопропускания капельной пробой позволяет определить количественную связь между параметрами фотометрирования и физическими параметрами крови (концентрацией эритроцитов, размером клеточных агрегатов, процессом оседания, геометрией пробы и др.) и показывает в сочетании с экспериментом, что процесс перераспределения клеток по объему капельной пробы является основным фактом при обосновании зависимости между динамикой изменения светового потока, проходящего через капельную пробу, и скоростью оседания клеток.

3 Результаты оценки СОЭ с помощью капельной методики имеют высокую повторяемость, хорошо согласуются (имеют прямую корреляционную зависимость, $r > 0,9$) с принятым стандартным методом Панченкова, а также имеют самостоятельную диагностическую значимость. При этом время анализа СОЭ уменьшается до 15 минут, объем используемой крови до 25 мкл, существует возможность отслеживать динамику процесса оседания.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы докладывались на научных семинарах кафедры “Промышленной и медицинской электроники” ТПУ, на отчетных конференциях при выполнении г/б НИОКР,

проводимой в рамках программы “Конверсия и высокие технологии” (Томск, 1996), на 3-ей и 4-ой Междунар. науч.-технич. конференциях “Актуальные проблемы электронного приборостроения” (Новосибирск, 1996, 1998), региональной конференции “Медико-биологические аспекты нейрогуморальной регуляции”, посвященной 35-летию ЦНИЛ (Томск, 1997), 2-ой, 3-ей, 4-ой областных науч.-практич. конференциях молодых ученых студентов и аспирантов (Томск, 1996, 1997, 1998), 6-ой, 8-ой, 11-ой, 12-ой Междунар. науч.-практич. конференциях молодых ученых студентов и аспирантов (Томск, 2000, 2002, 2005, 2006), Всероссийской НПК “Электронные средства и системы управления (Томск, 2003).

Опытные образцы разработанного прибора для оценки фагоцитарной реакции экспонировались на Междунар. выставке-ярмарке в Ганновере (Германия, Ганновер, 1997), Всероссийской выставке-ярмарке “Медицинское оборудование” (Томск, 1998).

Личный вклад автора. Идея использования метода фотометрирования капельных проб для анализа биожидкостей была предложена проф., д.т.н., Л.М. Ананьевым. Им же была произведена и постановка задачи. Автор внес определяющий вклад в конструирование и изготовление экспериментальных установок, планирование и проведение всех экспериментов, анализ полученных результатов, создание модели светопропускания капельной пробой. Все результаты, составляющие научную новизну диссертации и выносимые на защиту, получены автором лично.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, включая 1 патент на полезную модель.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы из 287 наименований и содержит 202 страницы основного текста, включая 100 рисунков. Каждая глава начинается вводными замечаниями и заканчивается выводами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении показана актуальность темы, поставлена цель и обозначены задачи исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе на основе анализа данных литературы представлено описание объекта исследования – крови человека. Показано, что наряду с оценкой количественного состава и морфологических характеристик клеток крови важное значение имеет изучение ее функциональных свойств и, в частности, процесса агрегации клеток, играющего ключевую роль в реологическом поведении крови. Одним из самых ранних методов непрямого измерения агрегации эритроцитов крови является оценка скорости их оседания. В первой части обзора показана высокая диагностическая значимость данного показателя в различных областях медицинской практики. Приведен анализ современных представлений о механизмах процесса оседания эритроцитов в экстравазированной крови.

Основная часть первой главы посвящена анализу методов и технических средств оценки агрегационных и седиментационных характеристик эритроцитов. Определены основные направления развития методов и аппаратуры для анализа

седиментационных процессов. Показано, что современные исследования и технические разработки в основном направлены на получение результатов анализа в срок менее 60 мин; уменьшение объема крови, требуемой для анализа; повышение информативности анализа; оптимизацию этапа пробоподготовки.

Анализ существующих методов оценки СОЭ показал ограниченность методических и технических возможностей в плане минимизации объема используемой пробы при “классическом” подходе к оценке СОЭ. В большинстве случаев, в том числе и в современных автоматизированных приборах, оценка процесса оседания осуществляется в стеклянных или прозрачных пластмассовых трубках определенного диаметра и высоты где отслеживается движение границы раздела клетки/плазма относительно границы плазма/воздух. Уменьшение высоты трубки с целью минимизации объема пробы приводит к снижению динамического диапазона измеряемого параметра и менее точной его регистрации. Уменьшение диаметра трубки значительно меняет условия оседания эритроцитов, так как значительное влияние оказывает контакт оседающих агрегатов со стенкой сосуда. Нарушается “физиологичность” процесса, что ведет к ошибочным результатам.

Имеющиеся представления о морфологии клеток крови, их физико-химических свойствах, анализ методов оценки состава крови и ее свойств показали преимущества использования оптических методов для оценки процессов агрегации и оседания эритроцитов крови. Так как процесс оседания клеток связан с возникновением энергетических взаимодействий между клетками и компонентами среды, то желательно совместить измерение оседания частиц с оценкой изменения энергетических характеристик пробы, то есть учесть изменение поверхностных сил, возникающих при агрегации и структурировании частиц дисперсной фазы.

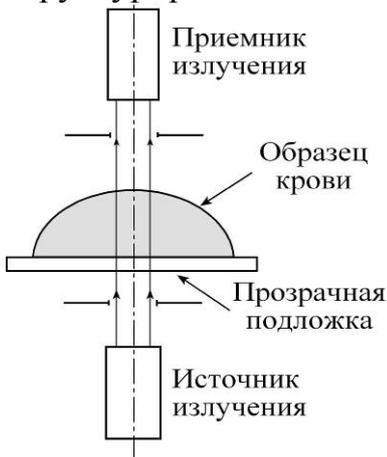


Рис. 1. Схема реализации метода фотометрирования капельной пробы

Основываясь на теоретических предположениях и собственных экспериментальных исследованиях, в качестве микрометода определения СОЭ клеток нами предложен метод фотометрирования исследуемой жидкой пробы, имеющей форму капли (рис.1), в которой протекают указанные процессы.

Вторая глава посвящена анализу процессов, происходящих в капельной пробе, при оседании в ней эритроцитов и их влияния на изменение оптических свойств пробы. На основе этого анализа синтезирована математическая модель, описывающая изменение динамики светопропускания капельного образца при протекании в пробе процесса оседания эритроцитов. Приведены результаты экспериментальных исследований, подтверждающие расчеты.

Предлагаемый метод оценки СОЭ базируется на особенностях процесса оседания клеток внутри капельной пробы и изменениях в ходе данного процесса величины ее светопропускания. Исходя из предложенной схемы исследования (рис.1), величина светопропускания пробы определяется

оптическими свойствами просвечиваемой среды и геометрией капли. Увеличение интенсивности проходящего светового потока происходит в результате уменьшения дисперсности среды при агрегации рассеивающих частиц (эритроцитов). В результате уменьшения расстояния между рассеивателями при оседании также наблюдается изменение светопропускания.

Ряд процессов являются специфичными при оседании частиц именно в капельной пробе (рис. 2).

Так, в результате перераспределения клеток, оседающих в центральной части по всему объему осевшего слоя (рис. 2, а), происходит увеличение концентрации клеток (приведенной к величине зондируемого объема) по периметру основания капли, а в ее центральной части, соответственно, наблюдается их уменьшение и увеличение прозрачности в этой области. Адсорбция поверхностно-активных компонентов плазмы на границе раздела кровь/воздух, а также агрегация клеток (в начальные моменты оседания) приводят к снижению внутренней энергии пробы, ее поверхностного натяжения и, соответственно, к уплощению капли (рис. 2, б), что повышает величину светопропускания пробы. Данный процесс в большей степени оказывает влияние на начальные оптические свойства пробы.

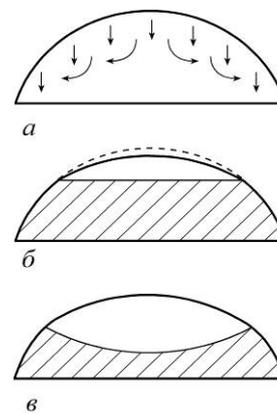


Рис. 2. Модель процессов, происходящих в капельной пробе при оседании в ней эритроцитов. Пояснения в тексте

Образование над оседающими частицами дисперсной фазы сферического прозрачного слоя плазмы (рис. 2 б, в) ведет к изменению рассеивающих свойств пробы-линзы и соответственно изменению плотности светового потока на выходе пробы. Образовавшаяся “капля” плазмы над оседающим слоем клеток в результате влияния поверхностных сил приводит к изменению кривизны этого слоя (рис. 2 в), что также скажется на светопропускной характеристике капли. Но последний процесс эффективен только при достаточно длительном фотометрировании капли.

Был проведен математический анализ изменения концентрации клеток, находящихся в области прохождения светового потока при изменении толщины оседающего слоя (h) эритроцитов в капле. Графики расчетных значений изменения концентрации клеток крови с гематокритом равным 0,5 при разных диаметрах зондирующего луча представлены на рис. 3. Как видно из графиков, при оседании клеток наиболее выраженное уменьшение их концентрации происходит именно в центральной (осевой) части капельного образца.

О перераспределении клеток по объему пробы говорит и тот факт, что при изменении диаметра пучка зондирующего излучения резко меняется динамика регистрируемого светового потока. При увеличении диаметра зондирующего луча (плотность светового потока не изменяется) скорость изменения величины светопропускания капельной пробой заметно уменьшается (рис. 4). Для диаметра луча, близкого к диаметру капли, изменение интенсивности проходящего светового потока при оседании эритроцитов схоже с динамикой светопропускания

пробой крови, размещенной в плоской кювете, просвечиваемой вертикально и имеющую сравнимую с каплей толщину просвечиваемого слоя.

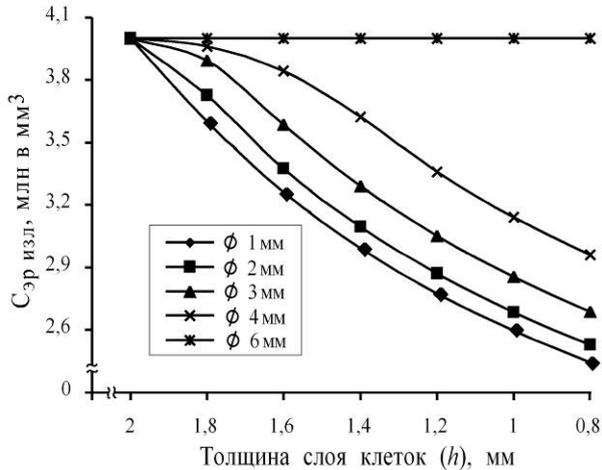


Рис. 3. Расчетное изменение концентрации клеток при оседании в области прохождения зондирующего излучения для разных диаметров луча. Диаметр основания капли – 6 мм, высота – 2 мм

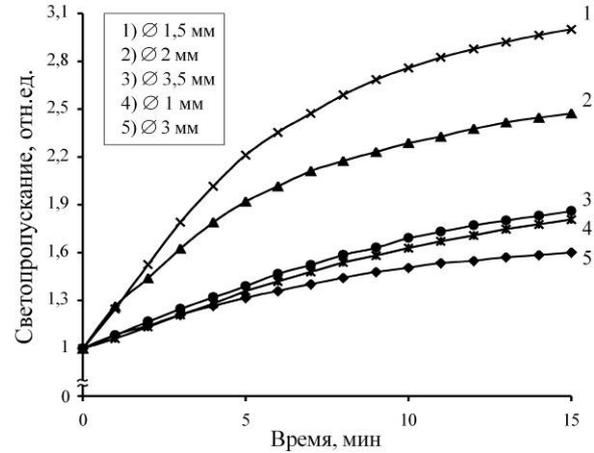


Рис. 4. Динамика изменения светопропускания пробы в зависимости от диаметра светового потока: 1, 2, 5) капельная проба; 3, 4) плоская кювета. СОЭ крови 40 мм/ч, диаметр основания капли 3,5 мм, объем капли 11 мкл

На основании эксперимента и математических расчетов можно полагать, что процесс перераспределения клеток по объему пробы является основным фактом при обосновании зависимости между динамикой изменения интенсивности светового потока, проходящего через капельную пробу и скоростью оседания клеток. Так как динамика изменения концентрации клеток в области просвечивания является функцией, зависящей от скорости оседания клеток (скорость изменения h), и определяет динамику изменения интенсивности проходящего светового излучения, то на основе оценки изменения последнего параметра во времени (с учетом агрегационных процессов) может быть оценен и параметр СОЭ.

Для оценки светопропускания через образец крови, в котором происходит агрегация клеток, за базовую была взята известная зависимость, полученная В.С. Ремизович и соавт. [1982] и описывающая оптическую передачу через дисперсную среду с высокой концентрацией оптически мягких частиц:

$$T(d) = \left(\frac{1}{\cosh(\sqrt{\mu_a \mu_{tr}} d)} \right) e^{-\mu_a d}, \quad (1)$$

где μ_a – коэффициент поглощения, μ_{tr} – транспортный коэффициент рассеяния, d – толщина просвечиваемого слоя.

$$\mu_a = (\mu_{a \text{ HbO}_2} s + \mu_{a \text{ Hb}} (1 - s) - \mu_{a \text{ H}_2\text{O}}) Ht + \mu_{a \text{ H}_2\text{O}}, \quad (2)$$

где Ht – гематокрит, s – параметр сатурации гемоглобина крови кислородом.

Для расчета транспортного коэффициента рассеяния μ_t использовано приближение, полученное для сфероидальных частиц (эллипсоид вращения), V. Twersky [1970] на основе аппроксимации Вентцеля-Краммерса-Бриллюэна (ВКБ) с учетом многократного рассеивания и усреднения для разных углов поворота агрегатов в пространстве, которое записывается:

$$\mu_{tr} = \mu_s(1-g) = \pi(a^2 + c^2)\Xi \frac{Ht(1-Ht)(1-g)K(\rho)}{V_0} \quad (3)$$

где g – средний косинус угла рассеяния (для крови принимают равным $g > 0,99$), a и c – соответственно меньшая и большая оси сфероида, V_0 – объем рассеивателя.

В пределах ВКБ аппроксимации функция $K(\rho)$ отражает интерференционную природу каждого отдельного акта рассеяния

$$K(\rho) = 1 - \left(\frac{\sin(2\rho)}{\rho} \right) + \left(\frac{\sin(\rho)}{\rho} \right)^2, \text{ где } \rho - \text{эффективный фазовый сдвиг.}$$

$\rho = 2\pi c \Xi \frac{(n_{Nb} - n_{H_2O})}{\lambda}$, где n_{Nb} и n_{H_2O} – показатели преломления Nb и H_2O , Ξ – безразмерный коэффициент, связанный с формой частиц.

Для оценки изменений оптической передачи, следуемой в результате агрегации клеток, проанализировано выражение (3), когда отношение c/a , отражающее рост агрегатов, увеличивается во времени. В целом, рост агрегатов вызывает уменьшение μ_{tr} и соответствующее увеличение светопропускания. Однако, когда большая ось агрегатов растет со временем, также растет и ρ . Ввиду того, что функция $K(\rho)$ имеет колебательный характер, это ведет к сложному поведению μ_{tr} и, следовательно, необходимости более тщательного подхода к выбору длины волны излучения, используемого при исследованиях.

Из анализа факторов, влияющих на светопропускание крови, сделан вывод, что диапазон длин волн, который может быть использован для оценки процессов оседания эритроцитов, лежит в области 750–950 нм и отвечает требованию монотонности увеличения функции светопропускания с увеличением размера оседающих клеточных агрегатов. Оптимальная длина волны – 805 нм соответствует изобестической точке спектральных характеристик гемоглобина и оксигемоглобина.

Был проведен численный анализ изменения светопропускания капельной пробы при оседании в ней эритроцитов (с учетом образования клеточных агрегатов). При анализе оценивалось изменение оптической плотности в центральной части капли, где происходят наибольшие изменения концентрации, а, следовательно, и интенсивности проходящего светового излучения.

Исходными физическими величинами, зависящими от динамики процессов в капельной пробе и определяющими коэффициенты μ_a , μ_{tr} , а в конечном итоге – величину светопропускания пробы T , являются толщина просвечиваемого слоя d , которая определяется высотой осевшего слоя клеток h и является функцией от времени, величина гематокрита и размер клеточных агрегатов. Так как при оседании происходит увеличение концентрации клеток в осевшем слое, μ_a также будет представлять функцию от времени. Для длины волны 805 нм, основываясь на (2), можно записать:

$$\mu_a(t) = (\mu_{aNb} - \mu_{aH_2O}) Ht(t) + \mu_{aH_2O}, \quad (4)$$

Транспортный коэффициент рассеяния μ_{tr} , даже в отсутствие агрегации эритроцитов, также зависит от величины гематокрита (3) и, следовательно,

изменяется при оседании клеток. С учетом протекающих в капле процессов уравнение (1) можно записать в следующем виде:

$$T(t) = \frac{e^{-\mu_a(t)h(t)}}{\cosh(\sqrt{\mu_a(t)\mu_{tr}(t)}h(t))} \quad (5)$$

Расчетные изменения $Ht(t)$ для “плоской” и капельной проб имеют различную динамику (рис. 5).

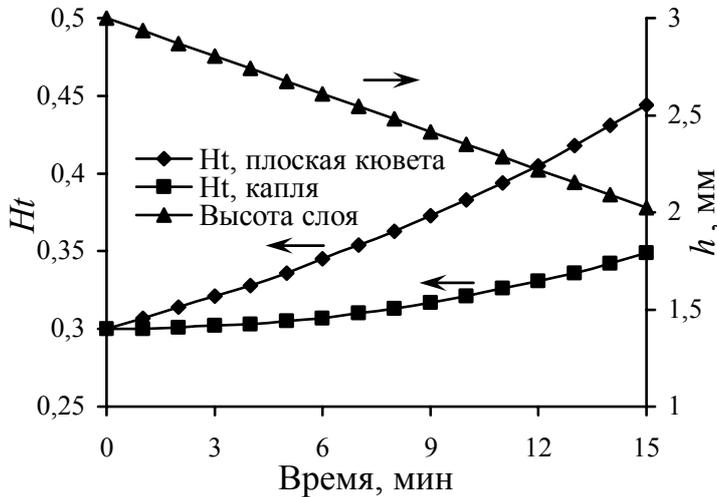
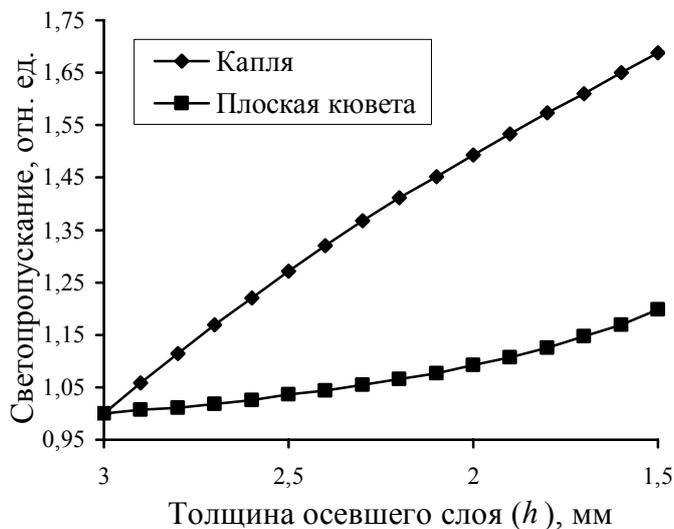


Рис. 5. Расчетное изменение величины гематокрита (Ht) в области прохождения излучения в результате изменения толщины просвечиваемого слоя (h) при оседании клеток

согласно выражению (5). Однако в целом, ввиду значительного уменьшения величины $h(t)$, по сравнению с изменением μ_{tr} и μ_a , светопропускание образцов, даже без учета агрегации клеток, будет возрастать (рис. 6).



Эта зависимость показывает преимущества использования капельной пробы. Так, при одной и той же скорости оседания эритроцитов величина гематокрита в зондируемой области для капельной пробы изменяется меньше, следовательно, скорость изменения светопропускания образца будет выше, чем для плоской кюветы.

Коэффициент поглощения, согласно (4), и транспортный коэффициент рассеяния с увеличением гематокрита также возрастают. Это должно приводить к снижению величины светопропускания образца крови,

Рис. 6. Расчетное изменение величины светопропускания (T) в процессе оседания клеток для плоской кюветы и капельной пробы (без учета агрегации) в зависимости от толщины осевшего слоя клеток. Высота капли и толщина плоской кюветы – 3 мм, начальный Ht – 0,3

Расчетные зависимости о преимуществе капельной пробы подтверждают результаты экспериментальных исследований (рис. 7).

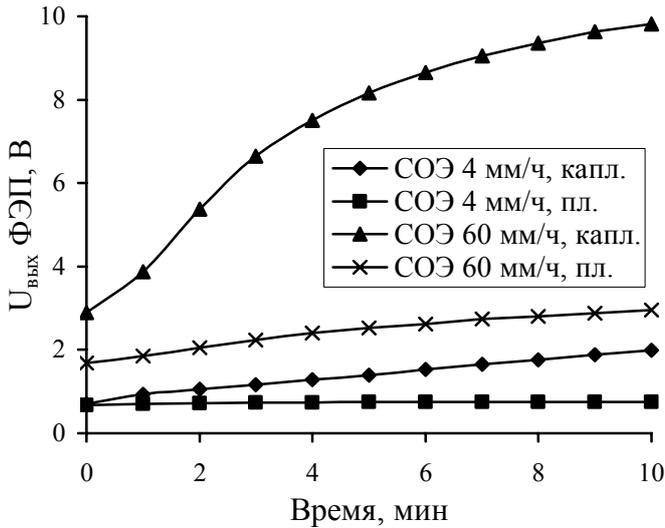


Рис. 7. Экспериментальные кривые изменения выходного напряжения фотоэлектрического преобразователя (ФЭП), отражающие динамику светопропускания в процессе оседания эритроцитов в капельной пробе (капл.) и в плоской кювете (пл.) для разных значений СОЭ образца

На рис. 8–9 представлены результаты экспериментального исследования, в ходе которого проводилось непосредственное сравнение изменения величины светового потока, прошедшего через капельную пробу (по изменению выходного напряжения ФЭП), с толщиной осевшего слоя клеток (h), оцениваемого по снимкам боковой проекции капельной пробы, рис. 8. Съемка капли проводилась в затемненной камере первичного преобразователя. Капля снизу просвечивалась потоком ИК-излучения, т.е. видеокамера фиксировала рассеянное каплей излучение.

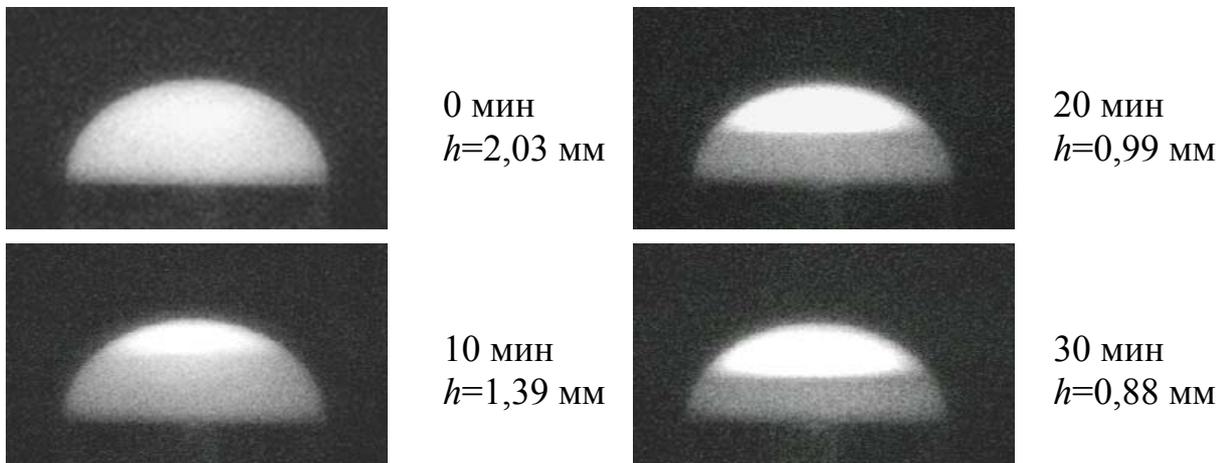


Рис. 8. Кинограмма оседания эритроцитов в капле. Диаметр основания капли – 5,3 мм, объем – 30 мкл, высота – 2,03 мм, СОЭ – 50 мм/ч

Как видно из графиков на рис. 9, динамика изменения светопропускания капельными пробками в зависимости от толщины осевшего слоя клеток для проб как с высокой, так и с низкой СОЭ с момента образования границы раздела фаз плазма/клетки, близка к линейной. Причем с увеличением величины СОЭ разброс экспериментальных значений от линейной аппроксимационной зависимости уменьшается. Это можно связать с тем, что при высокой величине СОЭ влияние агрегационных процессов сказывается на величине светопропускания только в первые минуты оседания, когда этот процесс протекает достаточно активно. Далее на светопропускание капельной пробы

влияет только процесс оседания клеток и их перераспределение по объему оседающего слоя. При низкой же величине СОЭ эти два процесса протекают параллельно в течение длительного времени, и наблюдаемая динамика светопропускания в связи с этим носит более сложный характер.

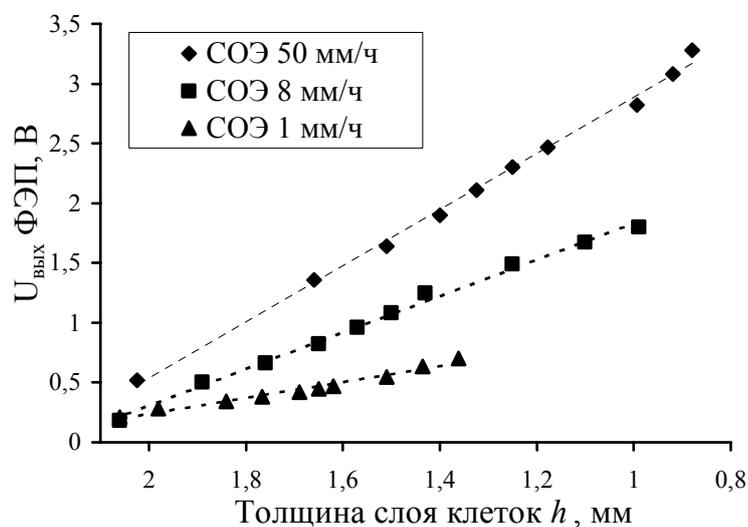


Рис. 9. Экспериментальная зависимость изменения величины выходного напряжения ФЭП в зависимости от толщины осевшего слоя клеток в капельной пробе для проб с разной величиной СОЭ. Время регистрации 30 мин

Проведенные на модели исследования функции передачи светового излучения через образец от изменения исходных характеристик системы, динамики процесса оседания частиц и сравнение их с реальными модельными экспериментами показали правильность выбранного метода оценки.

Конечно представленная модель, позволяет лишь приближенно судить об изменении светопропускания образца при оседании клеток во времени. Для получения более адекватных результатов необходим достаточно глубокий анализ изменения оптических свойств капельного образца с учетом аберраций, непостоянства локального радиуса кривизны, изменения эффективного коэффициента преломления гетерогенной полидисперсной среды и т.д.

Вместе с тем, упрощенная математическая модель светопропускания, отражающая основные процессы, происходящие в капельной пробе при оседании эритроцитов, позволяет целенаправленно подходить к выбору конструкции первичного измерительного преобразователя, оптимального объема, диаметра основания капельной пробы, параметров фотометрической системы и анализу получаемой информации.

Третья глава посвящена решению вопросов конструирования биотехнической системы для реализации предложенного метода оценки динамики поведения жидких сред путем фотометрирования ЛКП.

На рис. 10 представлена структурная схема разработанной экспериментальной установки, используемой для проведения исследований. Установка позволяет измерять оптические свойства пробы и одновременно регистрировать форму боковой проекции капли, что дает возможность изучать динамику изменения фототока и связать его с изменениями формы капли и характером происходящих в ней процессов.

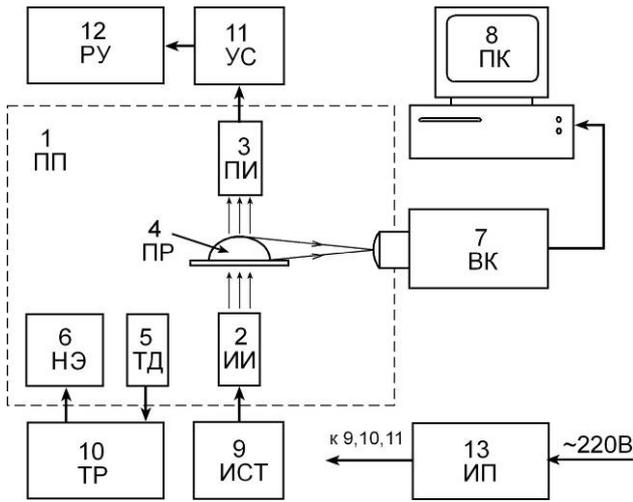


Рис. 10. Структурная схема экспериментальной установки: 1 – первичный преобразователь, 2 – источник излучения, 3 – приемник излучения, 4 – исследуемая проба, 5 – термодатчик, 6 – нагревательный элемент, 7 – видеокамера, 8 – персональный компьютер, 9 – источник стабильного тока излучателя, 10 – терморегулятор, 11 – усилительное устройство, 12 – регистрирующее устройство, 13 – источник питания

Теоретические и экспериментальные исследования позволили определить оптимальную конструкцию камеры первичного преобразователя (ПП) для исследования процесса изменения оптико-геометрических параметров капельной пробы и нахождения оптимальных характеристик оптической измерительной системы (рис. 11). Она позволяет с минимальной потерей полезной информации провести необходимые исследования и может служить прототипом первичного преобразователя приборов для решения конкретных медико-биологических задач.

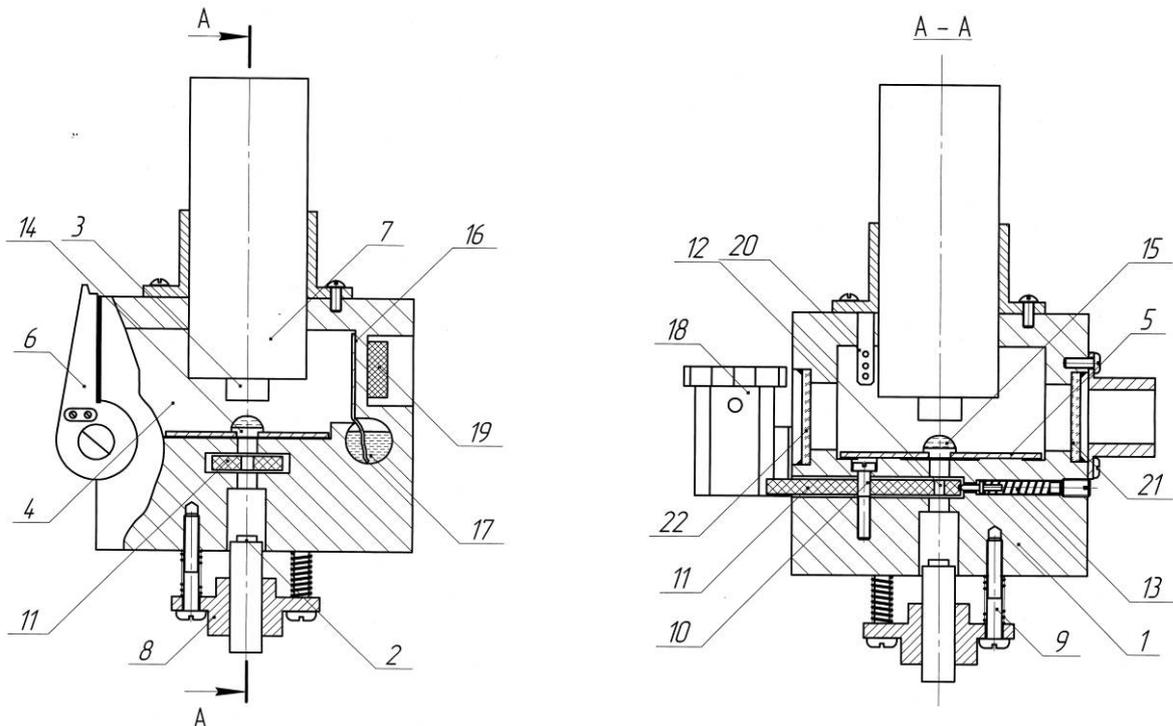


Рис. 11. Конструкция камеры ПП: 1 – корпус камеры, 2 – ИИ, 3 – ПИ, 4 – рабочий объем камеры, 5 – пластина кюветы, 6 – дверца камеры, 7 – подвижный плунжер, 8 – планшайба, 9 – юстировочные винты, 10 – ось диафрагмы, 11 – диск диафрагмы, 12 – диафрагмирующее отверстие, 13 – фиксатор диафрагмы, 14 – вкладыш кюветы, 15 – проба, 16 – поверхность испарителя, 17 – резервуар испарителя, 18 – колба резервуара испарителя, 19 – НЭ, 20 – ТД, 20, 21 – боковые окна камеры

На внутренней задней стенке камеры ПП приклеен гигроскопичный материал, служащий испарителем, нижний край которого опущен через щель в горизонтальный канал с водой и соединяющийся с внешним сосудом для его заправки. Данная система позволяет поддерживать повышенную влажность в камере ПП и тем самым снижает скорость испарения капельных проб жидкости.

На внешней задней стенке камеры ПП в районе испарителя установлен нагревательный элемент системы термостабилизации. Такое расположение нагревателя, как показали экспериментальные исследования конструкции камеры, обеспечивает наилучшие условия для создания повышенной влажности в камере.

При разработке устройства произведен обоснованный выбор электрической схемы питания источника излучения, обеспечивающей стабильность светового потока преобразователя ток фотодиода – напряжение, обеспечивающего линейность передаточной характеристики при высокой чувствительности, а также системы термостабилизации, обеспечивающей поддержание температуры в камере ПП на уровне $30,0 \pm 0,1$ °С. Произведена оценка источников погрешности фотометрической системы.

В главе представлены результаты технических испытаний устройства, подтверждающие правильность принятого принципа действия и основные теоретические предпосылки, использованные при конструировании прибора.

В четвертой главе представлены разработанная методика и результаты экспериментальных клинических исследований оценки СОЭ с помощью предложенного нами метода.

На основе расчетных и экспериментальных исследований определены оптимальные условия настройки фотометрической измерительной системы и проведения исследований с кровью, обеспечивающие воспроизводимость результатов и высокую чувствительность измерительной системы к процессу оседания эритроцитов. Выбран тип кюветы для размещения исследуемого образца, обеспечивающий стабильность формы капли.

В работе представлены результаты клинических исследований, проводившихся в 2004 – 2005 гг. в лечебных учреждениях г. Томска. Ряд исследований проводился в Военно-медицинском институте г. Томска (на базе ожогового отделения и отделения хирургии). В хирургическом отделении исследовались пациенты, поступившие по скорой помощи с острыми воспалительными заболеваниями (острый аппендицит, острый холецистит, гнойные раны, гангрена, отморожения и др.), а также ряд плановых больных. В отделении пульмонологии Томской областной клинической больницы были обследованы больные с острой пневмонией и бронхиальной астмой. Всего обследовано 74 человека в возрасте от 16 до 79 лет (30 женщин и 44 мужчины). При обследовании больных ставилась задача сопоставления динамики изменения интенсивности светового потока, проходящего через каплю крови в процессе агрегации и оседания клеток, с показателями СОЭ, полученными по стандартной, принятой в клинической практике методике.

На рис. 12 приведены сводные кривые динамики изменения выходного напряжения ФЭП при фотометрировании исследуемых капельных образцов крови в процессе оседания в них эритроцитов. Как видно из графиков на рис. 12, более

высоким значениям показателя скорости оседания эритроцитов, определенных по методу Панченкова, соответствует большая крутизна нарастания графиков светопропускания для соответствующих капельных образцов крови. На этом факте был построен дальнейший анализ кривых для получения более точных данных о взаимосвязи между кривой светопропускания и величиной СОЭ.

Проведен регрессионный анализ. Показано, что наиболее тесная связь СОЭ (коэффициент корреляции $r > 0,9$), измеряемой методом Панченкова, наблюдается с величиной изменения абсолютного значения выходного напряжения ФЭП, измеряемого в начальный момент оседания и на 10 минуте, $U(t_{10}) - U(t_0)$ (рис.13). Использование величины относительного изменения выходного напряжения, $U(t_{10})/U(t_0)$, обнаруживает менее тесную его зависимость с показателем СОЭ ($r < 0,81$). Это подтверждает результаты анализа модели светопропускания, где показано, что использование относительных значений светопропускания, ввиду различия начальных величин оптической плотности образцов, дает неоднозначные результаты при оценке СОЭ.

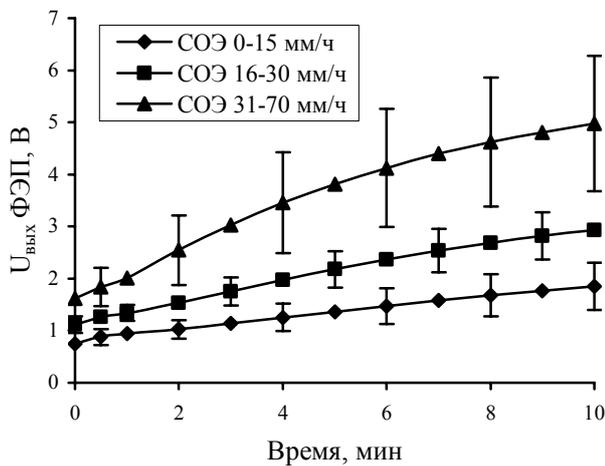


Рис. 12. Сводные графики динамика изменения выходного напряжения ФЭП для образцов с разной величиной СОЭ, построенные по средним значениям

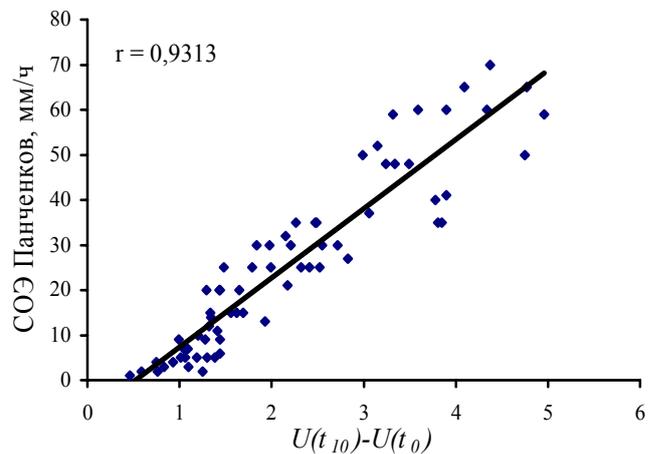


Рис. 13. Регрессионная зависимость между параметром $U(t_{10}) - U(t_0)$ и СОЭ образца крови

С целью оценки возможности использования кривых динамики светопропускания для задачи отслеживания процесса лечения были проведены повторные заборы и анализ проб крови у ряда пациентов, подвергшихся терапевтическому воздействию. Показано, что для больных, проходивших терапию и имевших положительную динамику в процессе лечения, повторные графики светопропускания имели меньшую скорость нарастания относительно исходных. В ряде случаев этот факт имел место, даже если значения СОЭ по Панченкову исследуемых образцов, взятые до и после (в ходе) лечения, мало отличались. У больных с ухудшением патологического процесса, наблюдалось увеличение крутизны кривой светопропускания или она практически мало отличалась от исходной. На основании этого можно предположить, что данная методика может быть более чувствительна к изменению состояния системы крови и организма, чем стандартный анализ СОЭ в его “классической” постановке.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о возможности использования предложенного нами метода для оценки процесса оседания эритроцитов. Поиск оптимального алгоритма обработки экспериментальных данных требует накопления достаточно большого и более полного, чем при проведенных нами первичных исследованиях клинического материала, а также учета многих факторов, что не являлось целью настоящего диссертационного исследования и диктует необходимость дальнейшего научного поиска.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработан и экспериментально проверен новый подход к задаче исследования оседания частиц в жидких дисперсных биологических средах, на базе которого создан экспресс-метод оценки СОЭ в микрообъемах.

2. Предложенный метод исследования процесса оседания эритроцитов основан на фотометрировании проб исследуемого образца крови, сформированного в виде лежащей капли. При этом производится оценка изменения величины светопропускания капельного образца в его осевой части.

3. Показано, что в основе повышенной чувствительности данного метода к процессу оседания эритроцитов лежат механизмы, связанные с перераспределением оседающих частиц по объему пробы, ведущие к значительному уменьшению их концентрации в зондируемой области, а также изменение геометрии капельного образца.

4. Разработана адекватная физико-математическая модель динамики светопропускания образцом крови в виде лежащей капли, при оседании в ней эритроцитов. Численно проанализирована зависимость светопропускания капельной пробы от исходных параметров исследуемого образца и динамики процесса оседания.

5. Разработана и сконструирована экспериментальная исследовательская установка, реализующая метод фотометрирования лежащих капельных проб и обеспечивающая повторяемость результатов оценки оптических характеристик исследуемого образца с точностью до 5%.

6. Создана конструкция системы первичного преобразователя, обеспечивающая анализ микрообъемной пробы, термостатирование исследуемого образца, позиционирование и задание начальных геометрических размеров капли, а также уменьшение испарения пробы.

7. Разработана методика проведения исследований, определены оптимальные параметры фотометрической измерительной системы и капельной пробы исследуемого образца.

8. Определено, что диапазон длин волн зондирующего излучения, подходящий для оценки процесса оседания эритроцитов, лежит в области 750 – 950 нм и отвечает требованию монотонности увеличения функции светопропускания с увеличением размера оседающих клеточных агрегатов. Оптимальная длина волны (805 нм) соответствует изобестической точке спектральных характеристик гемоглобина и оксигемоглобина.

9. Теоретически и экспериментально доказано, что изменение величины светового потока, прошедшего через капельный образец, от толщины осевшего слоя клеток в пробе имеет практически линейную зависимость, а значит параметр светопропускания адекватно отражает динамику процесса оседания эритроцитов.

10. Показано, что для получения расчетных показателей, связывающих изменение оптических свойств капельного образца с величиной СОЭ, необходимо учитывать изменение абсолютных значений величины светопропускания.

11. Проведенные клинические испытания созданной биотехнической системы показали перспективность использования данного метода в медицинской практике. Предложенный метод обеспечивает высокую повторяемость результатов, хорошо согласуется с принятым методом Панченкова и имеет ряд преимуществ: время анализа сокращается до 15 минут, объем используемой крови – до 25 мкл, обеспечивает возможность слежения за динамикой процесса оседания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Аристов А.А., Яковлев А.Г. Автоматизированный индикатор фагоцитоза //2-ая областная науч.-практич. конф. молодежи и студентов “Современные техника и технологии”. Тезисы докладов. – Томск: Изд-во ТПУ, 1996. – С.44-45.
2. Ананьев Л.М., Аристов А.А., Яковлев А.Г., Евтушенко Г.С. Фотоэлектрический анализатор иммунологических реакций //Актуальные проблемы электронного приборостроения: Труды III междунар. науч.-техн. конф. – Новосибирск: Изд-во НГТУ, 1996. – Т.3. – С.35-36.
3. Ананьев Л.М., Аристов А.А., Яковлев А.Г. Прибор для автоматизированного анализа фагоцитарной активности нейтрофилов //Труды конференции, "Медико-биологические аспекты нейрогуморальной регуляции". – Томск: Изд-во СГМУ, 1997. – С.341-343.
4. Аристов А.А., Рыбаков А.Н. Телефотометрическая установка для исследования динамики полускапельных биопроб //Четвертая областная науч.-технич. конф. молодежи и студентов по техническим наукам и высоким технологиям. Труды конф. – Томск: Изд-во ТПУ, 1998. – С.232-233.
5. Аристов А.А. Расширение функциональных возможностей автоматизированного индикатора фагоцитоза //Актуальные проблемы электронного приборостроения: Труды IV междунар. науч.-техн. конф. – Новосибирск: Изд-во НГТУ, 1998. – Т.5. – С.35-36.
6. Ананьев Л.М., Аристов А.А. Фотометрический автоматизированный индикатор фагоцитоза //Тезисы докладов шестой петербургской школы-семинар-выставки “Лазеры для медицины, биологии и экологии”. – С.-Петербург, 1998. – С.21.
7. Aristov A.A., Shmakova N.V. Automation of blood sedimentation rate measurement methods //The sixth International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Yong Scientist “Modern Techniques and Technology” – Tomsk: Tomsk Polytechnic University, 2000. – P. 220-221.
8. Aristov A.A., Rybakov A.N. Optimization of methods of obtaning forming surface and methods of computing surface tension in drop biological samples // The sixth International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Yong

- Scientist “Modern Techniques and Technology” – Tomsk: Tomsk Polytechnic University, 2000. – P. 222-224.
9. Аристов А.А., Рыбаков А.Н. Оптимизация метода получения образующей поверхности и определения поверхностного натяжения капельных биопроб //Шестая Междунар. науч.-практич. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых “Современные техника и технологии”. Сб. статей. – Томск: Изд-во ТПУ, 2000. - С.397-399.
 10. Аристов А.А., Шмакова Н.В.. Автоматизация методов регистрации скорости оседания эритроцитов // Шестая Междунар. науч.-практич. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых “Современные техника и технологии”. Сб. статей. – Томск: Изд-во ТПУ, 2000. – С.399-401.
 11. Аристов А.А. Автоматизированный метод определения скорости оседания эритроцитов //Всероссийская науч.-технич. конф. студентов, молодых ученых и специалистов "Биотехнические, медицинские и экологические системы и комплексы". Тезисы докладов – Рязань: Изд-во РГРТА, 2001. – С25-26.
 12. Aristov A.A., Raimanov N.I.. Optimization and automation of erythrocytes sedimentation rate measurement //The eight International Scientific and Practical Conference of Students, Post graduates and Young Scientists “Modern Technique and Technologies” – Tomsk: Tomsk Politechnic University, 2002. – P.113-115.
 13. Аристов А.А. Возможности и пути автоматизации измерения скорости оседания эритроцитов //Материалы Всероссийской науч.-практич. конф. “Электронные средства и системы управления”. – Томск: Изд-во ИОА СО РАН, 2003. - С.269-273.
 14. Аристов А.А. Капельный микрометод оценки скорости оседания эритроцитов крови //Материалы Всероссийской науч.-практич. конф. “Электронные средства и системы управления”. – Томск: Изд-во ИОА СО РАН, 2003. - С.273-277.
 15. Патент на ПМ № 47526 Российская Федерация, МПК⁷ G 01 N 33/00. Устройство для оценки физических свойств биологических жидкостей / А. А. Аристов (Россия). – № 2005104329/22; заявл. 17.02.2005; опубл. 27.08.05. Бюл. № 24. – 7 с.
 16. Аристов А.А. Автоматизированный метод оценки динамики агрегации и седиментации частиц в биологических жидкостях. Радиотехника, электротехника и энергетика //XI Междунар. науч.-техн. конф. студентов и аспирантов: Тез. докл. в 3-х т. – М.: МЭИ. 2005. Т.1. – С.282-283.
 17. Аристов А.А., Симонова Л.В. Автоматизация метода ранней диагностики онкологических заболеваний //Одиннадцатая Междунар. науч.-практич. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых “Современные техника и технологии”. – Томск: Изд-во ТПУ, 2005. – Т.1. – С. 379-381.
 18. Аристов А.А., Трифонова А.А. Применение метода фотометрирования капельной пробы для автоматизации рост-опухолевого теста //Всероссийская науч.-технич. конф. студентов, молодых ученых и специалистов "Биотехнические, медицинские и экологические системы и комплексы". Тезисы докладов. – Рязань, Изд-во РГРТА, 2006. – С. 31-32.
 19. Аристов А.А., Пеккер Я.С., Евтушенко Г.С. Применение метода фотометрирования капельной пробы крови для оценки процесса оседания эритроцитов //Известия ТПУ, 2006. – №3. – С.144-150.