

Раздел IV. Приборы и системы клинико-лабораторного и экологического назначения

УДК 534.7

С.Н. Гурбатов, И.Ю. Демин, А.В. Клемина, В.А. Клемин

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА БЕЗРЕАГЕНТНОМ АКУСТИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ «БИОМ»

Представлена акустическая методика определения состава биологических жидкостей, которая в отличие от обычных биохимических методов не требует дорогостоящих реактивов и занимает несколько минут. Метод основан на точных измерениях акустических характеристик жидкостей в акустической ячейке резонатора. Описан метод определения молекулярного состава сыворотки крови и цельной крови человека.

Акустический анализатор; кровь.

S.N. Gurbatov, I.Yu. Demin, A.V. Klemina, V.A. Klemm

DEFINITION OF STRUCTURE OF HUMAN BLOOD SERUM OF THE PERSON ON NO REAGENT ACOUSTIC ANALYZER "BIOM"

In the article we present an acoustic method of determining the composition of biological fluids, which unlike the conventional biochemical methods does not require costly reagents and takes several minutes instead of hours, typical for other techniques. The method is based on accurate measurements of acoustic characteristics of fluids in an ultrasonic resonator cell. Application of the method for evaluation of molecular composition of human blood serum and gastric juice in normal and different diseased condition will be described.

The acoustic analyzer; blood.

Функциональные и патологические изменения тканей и жидкостей организма сопровождаются изменениями в их биохимическом составе. Эти изменения могут быть обнаружены посредством измерения скорости и поглощения ультразвука. Развитие новых методов, обеспечивающих точные измерения скорости ультразвука и поглощения в малых объемах (100 мкл) жидкостей, позволило проводить систематические исследования растворов белков, аминокислот и других биологических веществ. Такие исследования обеспечивают необходимые данные, которые позволяют изучить зависимости акустических свойств важных биологических жидкостей, такой как, например, сыворотка крови, желудочный сок и других, от их состава.

Многие физиологические и патологические процессы в организме протекают при непосредственном участии белков [1]. Белки поддерживают коллоидно-осмотическое давление плазмы крови, осуществляют транспорт многих эндо- и экзогенных веществ (гормонов, липидов, лекарственных средств), являются ферментами, факторами свертывания крови и т. д. Среди факторов риска, вызывающих развитие болезней системы кровообращения, самым важным является увеличенное содержание липидов в сыворотке крови [2]. Многократные исследования

показали, что за исключением определения общего холестерина (Хоб) обязательно также измерить холестерин липопротеидов высокой плотности (ХЛПВП), холестерин липопротеидов низкой плотности (ХЛПНП) и триглицеридов (Тр). Тесты на определение Хоб просты и относительно дешевы, но при определении полной липидограммы, тесты становятся уже достаточно дорогими.

Акустические характеристики цельной крови и ее основных компонентов (сыворотки крови и эритроцитов) исследовались еще прошлым веке [3]. Однако сравнительно большие объемы (более 1 мл) акустических ячеек не позволили проводить систематические исследования с целью анализа состава сыворотки крови при различных патологических состояниях.

Данная работа представляет результаты систематических исследований акустических характеристик сыворотки крови человека, на основе которых разработан новый акустический метод определения состава сыворотки крови. Причем, в отличие от биохимических методов, акустические исследования позволяют определять состав сыворотки крови без применения дорогостоящих реактивов. Представлены результаты сопоставительных испытаний традиционных и акустических методов в ведущих медицинских центрах России. На основе этих испытаний акустические методы рекомендованы к применению в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений.

Принципы функционирования акустического анализатора

Чтобы измерить акустические характеристики сыворотки крови, использовался метод интерферометра постоянной длины [4]. Объем акустических ячеек составляет 80 мкл. Термостатирование акустических ячеек выполняет специализированный ультратермостат. Точность поддержания температуры в ячейках объемом 80 мкл составляет 0,005 °С. Точность измерения относительной скорости ультразвука в сыворотке крови на приборе «БИОМ» составляет величину порядка $3 \cdot 10^{-5}$, а поглощения – порядка $2 \cdot 10^{-2}$.

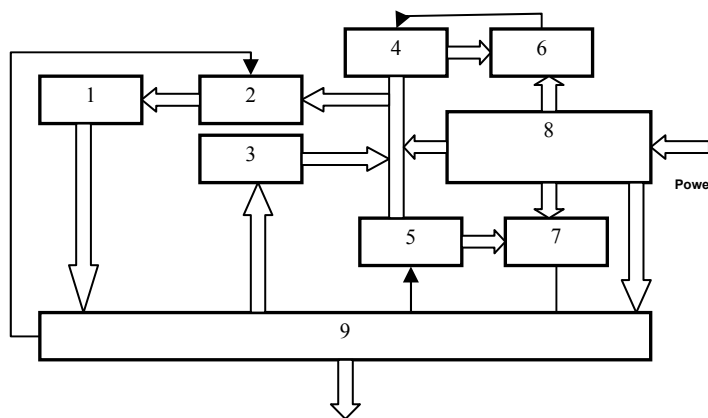


Рис. 1. Упрощенная структурная схема анализатора

На рис. 1 приведена упрощенная структурная схема акустического анализатора, который содержит два независимых канала измерения. Отметим, что каждый канал включает в себя блок акустических термостатируемых ячеек 6, 7 соответствующие им фазочувствительные схемы 4, 5, представляющие собой генераторы, управляемые напряжением (ГУН) с целью фазовой автоподстройки частоты (ФАПЧ). Перестройка частоты генераторов производится модулем управления 9

через цифроаналоговый преобразователь (ЦАП) 3. Выходы фазочувствительных схем 4 и 5 через коммутатор 2 попеременно подсоединяются с входом частотомера 1. Блок питания 8 обеспечивает напряжением узлы анализатора и содержит в своем составе схемы управления термостатами акустических ячеек. Модуль управления 9 содержит в своем составе устройство сопряжения с ПК. В результате обработки данных, получаемых с пьезоприемников акустических датчиков, в памяти компьютера фиксируются центральные частоты всех резонансных пиков в выбранном диапазоне частот для дистиллированной воды. Затем в обе ячейки прибора помещают исследуемую биологическую среду, а в памяти компьютера фиксируются центральные частоты всех резонансных пиков для этой среды. Измерения проводятся при двух температурах. Расчетные акустические параметры включают скорость ультразвука и поглощение в исследуемой жидкости относительно воды, а также температурные и частотные зависимости скорости и поглощения в среде.

Акустические исследования сыворотки крови

Сыворотка крови – сложная биологическая жидкость, которая содержит множество компонентов, обязательных для жизни человеческого организма. Важнейшими компонентами сыворотки крови являются глобулярные белки. Их вклад в суммарные акустические характеристики наиболее значителен (до 90 %) из-за высокой концентрации в сыворотке крови (75 – 85 г/л) в норме. Различные болезни часто сопровождаются изменениями в относительном содержании определенных белков в сыворотке крови.

Акустический метод определения белковых фракций в сыворотке крови основан на исследованиях скорости ультразвука в сыворотке крови и в двух модифицированных сыворотках, одна из которых не содержит γ -глобулин, и другая – β -и γ -глобулины. Определяет концентрацию белковых фракций в сыворотке крови: Са1 – альбумин, Са1 – α 1-глобулин, Са2 – α 2-глобулин, С β – β -глобулин, С γ – γ -глобулин, следующая система линейных уравнений:

$$\begin{aligned} C_{a1} \times A_{a1}^{T_1} + C_{a1} \times A_{a1}^{T_2} + C_{a2} \times A_{a2}^{T_1} + C_{\beta} \times A_{\beta}^{T_1} + C_{\gamma} \times A_{\gamma}^{T_1} &= \varphi_1, \\ C_{a1} \times A_{a1}^{T_2} + C_{a1} \times A_{a1}^{T_1} + C_{a2} \times A_{a2}^{T_2} + C_{\beta} \times A_{\beta}^{T_2} + C_{\gamma} \times A_{\gamma}^{T_2} &= \varphi_2, \\ C_{a1} \times K_{a1}^{T_1} + C_{a1} \times K_{a1}^{T_2} + C_{a2} \times K_{a2}^{T_1} + C_{\beta} \times K_{\beta}^{T_1} &= \varphi_3, \\ C_{a1} \times K_{a1}^{T_2} + C_{a1} \times K_{a1}^{T_1} + C_{a2} \times K_{a2}^{T_2} &= \varphi_4, \\ C_{\gamma} &= 100\% - C_{a1} - C_{a1} - C_{a2} - C_{\beta}. \end{aligned} \quad (1)$$

$$\varphi_{1,2} = \frac{V_{1,2}^{(s)} - V_{1,2}^{(H_2O)}}{V_{1,2}^{(H_2O)}} \quad \text{– относительные изменения скорости ультразвука в сыворотке крови при температурах } T_1 \text{ и } T_2;$$

$$\varphi_{3,4} = \frac{V_{3,4}^{(mS)} - V_{1,2}^{(H_2O)}}{V_{1,2}^{(H_2O)}} \quad \text{– относительные изменения скорости ультразвука в модифицированной сыворотке при температурах } T_1 \text{ и } T_2;$$

$$V^{(s)} = \frac{2lf_j^{(s)}}{j}$$

Эти уравнения получены согласно предположению, что низкомолекулярные компоненты сыворотки крови дают незначительный вклад в акустические характеристики сыворотки.

Методология получения концентрационных коэффициентов скорости ультразвука для определения белковых фракций согласно системе уравнений (1) базируется на исследованиях белковых растворов как высокоочищенных белков (на-

пример, альбумина, γ -глобулина), так и белковых растворов, приготовленных из сыворотки крови путем селективного осаждения определенных белковых фракций.

Разработка акустического безреагентного метода определения липидных компонентов сыворотки крови человека базируется на исследованиях частотных зависимостей поглощения ультразвука и температурных зависимостей скорости ультразвука в растворах белков и сыворотке крови, содержащей разное количество белка и липидных компонентов.

Анализ результатов исследований сывороток крови с различными значениями липидных компонентов позволил выявить четкие закономерности зависимости акустических характеристик (скорости и поглощения ультразвука) от липидного состава сыворотки. Предполагая, как и в случае белковых фракций, аддитивность вклада отдельных липидных компонентов в температурные зависимости скорости ультразвука, а также в частотные и температурные зависимости поглощения ультразвука на длину волны, можно определить концентрацию липидных компонентов сыворотки крови – холестерина общего ($C_{X_{об}}$), холестерина липопротеинов высокой плотности ($C_{X_{ЛПВП}}$) и триглицеридов ($C_{ТрГ}$) из следующей системы уравнений:

$$\begin{aligned} C_{X_{об}}(A_{X_{об}}) + C_{X_{ЛПВП}}(A_{X_{ЛПВП}}) + C_{ТрГ}(A_{ТрГ}) &= \delta\varphi_T \\ C_{X_{об}}(B_{X_{об}}) + C_{X_{ЛПВП}}(B_{X_{ЛПВП}}) + C_{ТрГ}(B_{ТрГ}) &= \delta\xi_T^{\xi} \\ C_{X_{об}}(D_{X_{об}}) + C_{X_{ЛПВП}}(D_{X_{ЛПВП}}) + C_{ТрГ}(D_{ТрГ}) &= \delta\xi_f^{\xi} \\ C_{X_{ЛПНП}} &= C_{X_{об}} - (C_{X_{ЛПВП}} + C_{X_{ЛПОНП}}) \end{aligned} \quad (2)$$

$$\text{где } \delta\varphi_T = (\varphi_1 - \varphi_2) / \Delta T \quad \delta\xi_T^{\xi} = (\xi_{T1} - \xi_{T2}) / \Delta T \quad \delta\xi_f^{\xi} = (\xi_{f1} - \xi_{f2}) / \Delta F$$

Величины концентрационных коэффициентов в системе уравнений для определения липидных компонентов сыворотки крови (холестерина общего, холестерина липопротеидов высокой плотности, триглицеридов и холестерина липопротеидов низкой плотности) определяют общепринятым способом после выбора температур T_1 и T_2 ($T_2 > T_1$) и частот f_1 и f_2 ($f_2 > f_1$) с использованием сывороток с известными значениями липидных компонентов, например сывороток крови Serodos фирмы Human (Германия).

Результаты и обсуждение

Сравнение результатов акустических исследований белкового спектра проводилось с данными, полученными на электрофоретической системе «Paragon» (Beckman, США).

При исследовании контрольной сыворотки (Human, Германия) на акустическом приборе и электрофоретическим методом на аппарате «Paragon» установлено, что различия для альбумина, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулинов находятся в пределах, указанных в паспорте на контрольные сыворотки.

При проведении сравнительных исследований сыворотки крови для разных групп пациентов методом электрофореза и акустическим методом установлена высокая степень корреляции изменений альбумина, α_1 -, α_2 - и γ -глобулинов ($r = 0,95; 0,75; 0,82; 0,7$ и $0,92$ соответственно).

Для оценки правильности определения липидных компонентов были использованы контрольные сыворотки «Serodos» (Human, Германия) и проведены сопоставительные исследования акустического метода определения липидных

компонентов сыворотки крови с традиционными биохимическими методами. Данные исследования были проведены на биохимическом анализаторе Hitachi 917 и Konelab. В общей сложности была исследована сыворотка крови 2000 пациентов. Результаты сопоставительных исследований во всех указанных медицинских учреждениях имеют по всем измеренным липидным компонентам коэффициенты корреляции от 0,77 до 0,89, что соответствует высокой корреляционной связи, достаточной для правильной диагностики нарушений липидного обмена.

Заключение

Выполненные систематические исследования акустических характеристик сыворотки крови позволили разработать новые акустические методы определения общего белка, белковых фракций и липидных компонентов сыворотки крови человека. Методы не требуют дорогостоящей аппаратуры и биохимических реактивов и в то же время имеют хорошие корреляционные соотношения с традиционными методами. Время выполнения акустического анализа общего белка, белковых фракций и липидных компонентов сыворотки крови сокращено до 3-х минут, в то время как при использовании традиционных методов все указанные компоненты могут быть определены в течение не менее 1,5 часов при использовании высокотехнологичного биохимического анализатора и аппарата для электрофореза белков.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ – 08-02-00631, 09-02-97074 и ведущей научной школы НШ – 1055.2008.2.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Сарвазян А.П., Харакоз Д.П. Акустические исследования конформационных состояний белков в водных растворах // Молекулярная и клеточная биофизика. – М.: Наука, 1977. – С. 93-106.
2. Гурбатов С.Н., Клемина А.В., Демин И.Ю., Клемин В.А. Определение липидных компонентов сыворотки крови человека на основе акустических измерений // Сборник трудов XIX сессии Российского акустического общества. – М.: ГЕОС, 2007. – Т. 3. – С. 145-148.
3. Яронис Г., Сукацкас В., Лукашкявичус А., Волейшис А. Вопросы ультразвуковой диагностики крови // Проблемы техники в медицине. – Томск, 1983. – С. 196-197.
4. Клемина А.В., Демин И.Ю., Клемин В.А. Исследование акустического резонатора сверхмалого объема для медико-биологических приложений // Вестник ННГУ. Сер. Радиофизика. – 2006. – Вып. 1. – № 4. – С. 59-66.

Гурбатов Сергей Николаевич

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского.
E-mail: gyrb@rf.unn.ru.
603950, г. Н. Новгород, пр. Гагарина, 23, тел.: (831)4656305.
Профессор, д.ф.-м.н.

Gurbatov Sergey Nikolaevich

Nizhniy Novgorod State University of N.I.Lobachevsky.
E-mail: gyrb@rf.unn.ru.
23, Gagarin's avenue, N. Novgorod, 603950, Russia, Phone: (831)4656305.
Professor, Doctor of Sc.

Демин Игорь Юрьевич

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского.
E-mail: demin@rf.unn.ru.
603950, Н. Новгород, пр. Гагарина, 23, тел.: (831)4656305.
Доцент, к.ф.-м.н.

Demin Igor Yurievich

Nizhniy Novgorod State University of N.I.Lobachevsky.

E-mail: demin@rf.unn.ru.

23, Gagarin's avenue, N. Novgorod, 603950, Russia, Phone: (831)4656305.

Assistant professor, Cand. of Sc.

Клемина Анна Викторовна

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского.

E-mail: klemina@rf.unn.ru.

603950, Н. Новгород, пр. Гагарина, 23, тел.: (831)4656305.

Аспирантка.

Klemina Anna Victorovna

Nizhniy Novgorod State University of N.I.Lobachevsky.

E-mail: klemina@rf.unn.ru.

23, Gagarin's avenue, N. Novgorod, 603950, Russia, Phone: (831)4656305.

Post-graduate student.

Клемин Виктор Александрович

ЗАО «фирма «БИОМ».

E-mail: biom-nn@mail.ru.

603950, Н. Новгород, ул. Ветеринарная, 3, тел.: (831)4345080.

С.н.с., к.б.н.

Klemin Victor Alexandrovich

Company «BIOM».

E-mail: biom-nn@mail.ru.

3, street Veterinary, N. Novgorod, 603950, Russia, Phone: (831) 4345080.

Cand. of Sc.

УДК 57.087

И.С. Захаров, А.Г. Казанцева**РЕКУРРЕНТНАЯ МОДЕЛЬ ГАЛЬВАНОТАКСИСА ДЛЯ ПРИБОРОВ
КОНТРОЛЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ СРЕД**

Описана модель, на основе которой формируются информативные параметры токсичности водных сред по характеристикам фаз гальванотаксической реакции.

Гальванотаксис; рекуррентная формула; фаза.

I.S. Zakharov, A.G. Kazantseva**THE RECURRENT MODEL OF GALVANOTAXIS FOR AQUA MEDIA TOXIC
CONTROL DEVICES**

The model of galvanotaxis assay stages has developed. Information parameters of aqua media toxicity for the model are investigated.

Galvanotaxis; recurrent formula; stage.

Важной проблемой создания биотестовой аппаратуры является необходимость разработки математических моделей тест-реакций организмов. При этом модели должны позволять описывать экспрессные популяционные тест-реакции микроорганизмов, которые повышают статистическую достоверность результатов