

Спектральные исследования плазмы и крови новорожденных.

Костюков Д.В.², Лагутина Н. К.¹, Павлушкина Л. В.¹, Сецко И.В.², Терешков В.П.².

1. Московская Детская городская клиническая больница № 13 им. Н.Ф.Филатова.
2. ЗАО НПП «ТЕХНОМЕДИКА», г. Москва.

Оптические методы анализа компонентов крови давно и широко используются в лабораторной диагностике. Многие доступные и распространенные приборы основаны на измерении оптической плотности пробы на одной длине волны, что позволяет определить концентрацию только одного компонента или интегрального показателя (например, общий гемоглобин, билирубин и др.). Использование одноволновых методов требует наличия изобестической точки в спектрах различных компонентов, как в методе Дервиза-Воробьева [1], либо влечет за собой необходимость химического преобразования нескольких компонентов в один, как в гемиглобинцианидном методе [2]. Результаты измерений могут искажаться наличием в пробе компонентов, не учитываемых при измерении. Например, ошибка определения концентрации гемоглобина оксигемоглобиновым аммиачным методом в присутствии карбоксигемоглобина может достигать 37% [3].

Значительно более широкие возможности открывает известный метод многокомпонентного спектрального анализа [4]. В основе этого метода лежит закон Бугера-Ламберта – Бера, гласящий, что спектр поглощения смеси веществ представляет собой сумму спектров поглощения составляющих смеси. Таким образом, зная спектр крови и спектры поглощения отдельных компонентов, можно определить концентрацию всех компонентов, решив соответствующую математическую систему уравнений для этих спектров. Хотя этот метод и представляет определенные сложности в технической реализации, к его достоинствам следует отнести то, что он является безреагентным и позволяет избежать ошибок преаналитического и аналитического этапов, что в условиях доказательной медицины особенно актуально. В данной работе исследованы возможности комплексного измерения концентрации компонентов крови и плазме новорожденных многокомпонентным оптическим спектральным методом.

Для измерения концентрации компонентов крови с необходимой точностью, требуется, во-первых, обеспечить высокоточное измерение спектров проб, а во-вторых, иметь в распоряжении столь же точно определённые спектры всех используемых в анализе

компонентов. Как показал анализ, прибор должен обеспечивать точность измерения оптической плотности не хуже 0.001 и длины волны не хуже 0.1 нм.

Для проведения работы нами был сконструирован и изготовлен компактный спектрофотометр, представленный на **Рис 1**.



Рис.1. Конструкция спектрофотометра.

Для аппаратной и программной компенсации факторов, вносящих погрешность в результаты измерений, были приняты следующие меры:

- калибровка по длине волны с помощью фильтра ПС-7;
- компенсация шумов за счет усреднения сигнала;
- расширение динамического диапазона за счет вариации чувствительности фотоприемника.

Наряду с высокой точностью измерений, метод многокомпонентного спектрального анализа требует досконального знания эталонных базовых спектров. Данные о спектрах компонентов, доступные из сторонних источников, недостаточно полны и детальны. Приводимые в публикациях спектры имеют шаг по длине волны в несколько нм и точность не выше 1-2%, что явно недостаточно для решаемой задачи. Прямое же измерение спектров компонентов затруднено сложностью их получения в чистом виде. В данной работе был использован альтернативный подход, основанный на статистическом анализе совокупности измеренных спектров крови значительного числа пациентов. Такой анализ позволяет определить независимые спектральные составляющие этой совокупности и восстановить по ним спектры компонентов крови (метод главных компонент [5]).

Исследования проводились на лабораторной базе Московской Детской городской клинической больницы № 13 им. Н.Ф. Филатова (главный врач д.м.н., профессор В.В. Попов)

Для измерений использовались плазма крови без дополнительной обработки, и кровь, разведенная в 0,04% растворе аммиака в соотношении 1:100. Использование разведений преследовало две цели: во-первых, для лизирования крови с сохранением основных производных гемоглобина и других веществ, во-вторых – для уменьшения оптической плотности до значений, позволяющих использовать при фотометрировании стандартные 10 мм кюветы. Дезоксигемоглобин Hb в таком разведении переходит в оксигемоглобин, что не искажает исследования в нашем случае. При анализе мы учитывали возможность наличия в разведениях следующих компонентов: оксигемоглобин HbO₂, карбоксигемоглобин HbCO, метгемоглобин HbMet, фетальный гемоглобин HbFetal, билирубин прямой и непрямой. Кроме того, принимался во внимание фактор рассеяния, обусловленный строением эритроцитов и другими взвесями. Спектры основных компонентов, учитываемых в расчетах, приведены на **Рис. 2**.

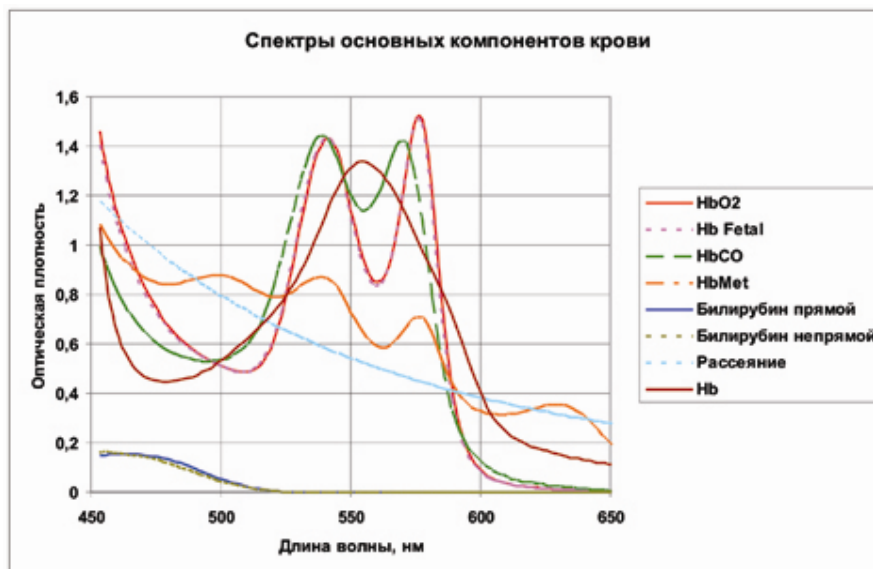


Рис.2 Спектры основных компонентов крови.

Нами были выполнены измерения 86 проб крови и 9 проб плазмы новорожденных. Эти измерения были подвергнуты статистическому анализу результатов методом главных компонент.

Анализ показал, что любой спектр из всей совокупности измеренных спектров проб крови можно представить в виде линейной комбинации спектров трех основных компонентов – оксигемоглобина, фетального гемоглобина и билирубина. Концентрация общего гемоглобина в разных пробах составляла от 81 до 190 г/л. Доля фетального гемоглобина

варьировалась в широких пределах и в некоторых образцах была близка к 100%. Концентрация билирубина изменялась в диапазоне от 0 до 160 мкм/л.

В плазме были выделены спектры двух фракций билирубина – прямого и непрямого, а также следы лизированного гемоглобина. Следует отметить, что присутствие двух фракций билирубина удалось обнаружить только при анализе плазмы, поскольку в разведениях крови вариации спектров, связанные с отличием фракций билирубина, маскируются доминирующим компонентом – оксигемоглобином. Спектры компонентов, обнаруженные в разведениях крови и плазме, представлены на **Рис. 3**

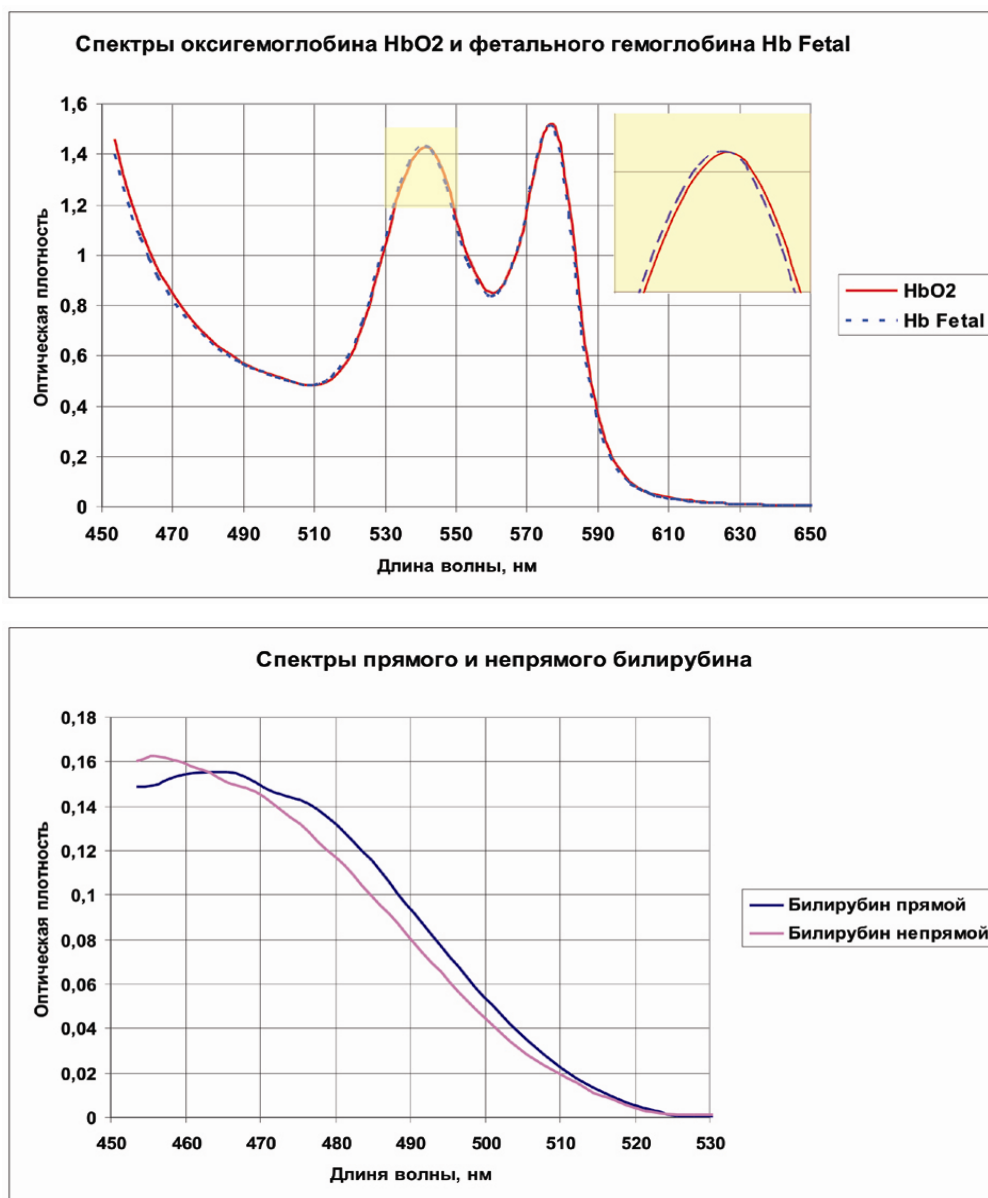


Рис. 3. Спектры компонентов, обнаруженные в крови и плазме.

Были проведены предварительные сравнительные измерения концентрации общего и прямого билирубина в плазме крови новорождённых различными методами. Результаты измерений представлены на слайде. Несмотря на небольшой объем серии, измерения различными методами хорошо коррелируют (Рис.4).

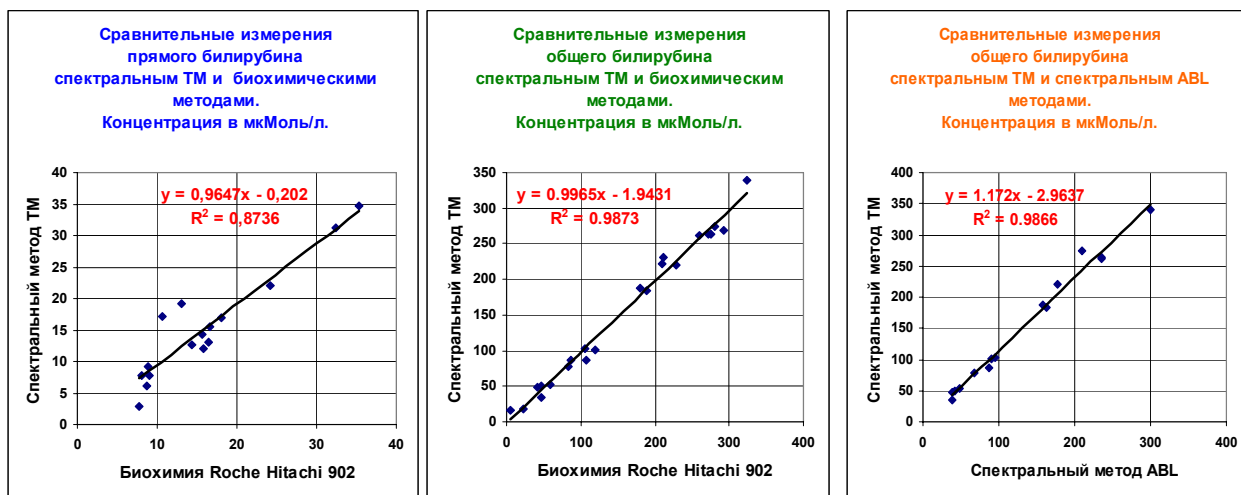


Рис.4. Результаты сравнительных измерений билирубина в плазме различными методами.

Полученные результаты подтверждают возможность создания компактных и недорогих приборов, позволяющих проводить безреагентное измерение концентрации компонентов крови спектральным методом с требуемой в лабораторной диагностике точностью. Опытный образец такого прибора, разработанного и изготовленного в ЗАО НПП «ТЕХНОМЕДИКА», представлен на Рис. 5



Рис. 5. Опытный образец лабораторного спектрофотометра.

Благодарность.

Авторы выражают благодарность главному врачу Московской Детской городской клинической больницы №13 им. Н.Ф. Филатова, доктору медицинских наук, профессору Попову В.В. за оказанное содействие при подготовке материалов данной статьи.

Литература.

1. Воробьев А.И., Дервиз Г.В. Определение концентрации гемоглобина посредством аппарата ФКМ-М. - Лабораторное дело, 1959, N3, с.3-9.
2. Haemoglobin Cyanide Standart Preparation. International Committee for Standartisation in Haematology. // Wld Hlth. Org. Tech Rep.1967. Ser. 384, p. 14.
3. Антонов В.С., Давыдов В.М., Ованесов Е.Н., Сецко И.В. Оптический метод определения концентрации гемоглобина с учетом его производных. 5-ый Российский съезд специалистов по лабораторной диагностике. Тезисы докладов. Москва, 24-26 мая 1995 г.
4. Zwart A, Buursma A, van Kampen EJ, Zijlstra WG.Multicomponent analysis of hemoglobin derivatives with reversed-optics spectrophotometer. Clin Chem. 1984 Mar;30(3):373-9.
5. Jolliffe I.T. Principal Component Analysis, Series: Springer Series in Statistics, 2nd ed., Springer, NY, 2002, XXIX, 487 p. 28 illus. ISBN 978-0-387-95442-4.