

2. Барун В. В., Иванов А. П., Вологовская А. В., Улащик В. С. // Журн. прикл. спектр. – 2007. – Т.74. – С. 387 – 394.
3. Кулешова Д. В., Лощенов В. Б., Шевчик С. А., Барун В. В., Иванов А. П. // Мат. VI Межд. конф. «Лазерная физ. и оптич. технологии», под ред. Н.С.Казака, Гродно. – 2006. – Ч.2. – С. 184 – 186.

УДК 535:34, 535:36

Иванов А. П., Барун В. В., (Беларусь, Минск), Петрук В. Г., Кватернюк С. М. (Украина, Винница)

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ КРОВИ

Введение. В настоящее время хорошо разработан спектрофотометрический метод определения ряда характеристик гемолизированной крови. Он основан на измерении ослабления света и расчете концентрации поглощающего материала по найденной оптической плотности раствора в соответствии с законом Бугера – Бера. Однако аналогичная задача для суспензии эритроцитов имеет ряд особенностей, связанных с рассеянием света. Для восстановления параметров среды по измерению рассеянного ею света нужно использовать достаточно громоздкие и неудобные при обработке вычислительные методики (в основном, инверсный метод Монте Карло [1]) Это затрудняет их широкое внедрение в практику. В данной работе, на основании аналитических подходов предложены достаточно простые спектрофотометрические способы измерения таких характеристик как степень агрегации эритроцитов, концентрация гемоглобина, степень оксигенации крови.

Определение степени агрегации эритроцитов. Эритроциты в норме представляют собой двояковогнутые диски. Их диаметр составляет 7 – 9 мкм, по краю толщина 1.7 – 2.4 мкм, а в центре 0.9 – 1.2 мкм [2, 3]. Эритроциты способны агрегировать, связываясь друг с другом основаниями дисков, и образовывать цилиндрические цепочки. Число эритроцитов в агрегате может быть от нескольких до сотен штук [2, 3]. Поэтому длина l цепочки может сильно варьироваться – от примерно 2 мкм до 200 и более мкм, тогда как ее диаметр меняется в существенно более узких пределах. Нарушение степени агрегации (длины l) эритроцитов может свидетельствовать о ряде патологий крови. Поэтому контроль степени агрегации эритроцитов важен для выявления ряда заболеваний крови и организма человека в целом.

Будем моделировать эритроциты цилиндром с круговым основанием диаметром $d = 8$ мкм и высотой $l_0 = 2$ мкм. В [4] показано, что двояковогнутую структуру частиц можно просто учесть путем введения в показатель поглощения множителя, несколько изменяющего объем гемоглобина. Соответственно, агрегат эритроцитов будем полагать цилиндром, диаметр которого равен d , а длина – $l = l_0 N$, где N – число частиц в агрегате. Известно, что показатели поглощения раствора вещества и суспензии частиц из того же вещества могут сильно различаться. В первом случае показатель поглощения крови есть просто средневзвешенная сумма соответствующих показателей компонент (учитываем только основные компоненты – окси- HbO₂ и деоксигемоглобин Hb)

$$k_b^*(\lambda) = \alpha Hf [S k_{HbO_2}(\lambda) + (1-S) k_{Hb}(\lambda)] = \alpha H k_e(\lambda), \quad (1)$$

где α – коэффициент, характеризующий степень возможного разбавления пробы ($\alpha \leq 1$), который равен 1 для цельной крови, H – гематокрит (объемная доля эритроцитов в крови), f – объемная доля гемоглобина в эритроцитах, k_{HbO_2} , k_{Hb} и k_e – показатели поглощения соответственно окси-, деоксигемоглобина и эритроцитов, S – степень оксигенации крови, представляющая собой отношение концентраций оксигемоглобина и всего гемоглобина. Типичные значения $H = 0.4$, $f = 0.25$. В случае суспензии не весь свет попадает в эритроциты, содержащие гемоглобин. Часть его проходит вне частиц и не поглощается. В результате показатель поглощения суспензии при том же количестве гемоглобина будет меньше и равен

$$k_b(\lambda) = \alpha c Hf [S k_{HbO_2}(\lambda) + (1-S) k_{Hb}(\lambda)] = \alpha c H k_e(\lambda). \quad (2)$$

Здесь $c \leq 1$ – поправочный коэффициент, говорящий о нарушении закона Бера для дисперсного поглотителя. Его значения как раз указывает долю массы, эффективно участвующей в поглощении. Значения c зависят от сечения поглощения эритроцитов. Сечение поглощения, в свою очередь, определяется известными показателями поглощения дериватов гемоглобина HbO₂, Hb [5], размерами эритроцитов, в частности, искомой длиной l агрегатов, их ориентацией в пространстве. Аналитические выражения c и его расчет приведен в [6]. Показано, что поправочный коэффициент c с ростом средней оптической толщины эритроцита убывает. Если измерить c , то можно определить l . Это делается следующим образом.

Исходная проба крови делится на две одинаковые части. Одна часть гемолизуется, т. е. получаем раствор гемоглобина. Другая остается суспензией. Помещаем пробы в две кюветы одинаковой длины L и измеряем коэффициенты пропускания прямого света в обоих случаях. Эти коэффициенты (T^* , T) описываются экспоненциальными зависимостями, и соответствующие им оптические плотности равны

$$D^* = \ln(1/T^*) = k_b^* L, \quad D = \ln(1/T) = k_b L. \quad (3)$$

Здесь параметры со звездочками соответствуют раствору, без звездочки – суспензии; L – толщина кюветы через которую проходит свет. Следует отметить, что второе выражение в (3) справедливо при условии, что можно в оптической плотности пренебречь влиянием показателя рассеяния суспензии. Эритроциты в плазме оптически “мягкие частицы”, имеющие сильно вытянутую вперед индикатрису рассеяния. Поэтому, если

апертурный угол регистрирующего устройства порядка 1^0 , то значительная доля рассеянного света попадет на приемник и можно пользоваться формулой для D .

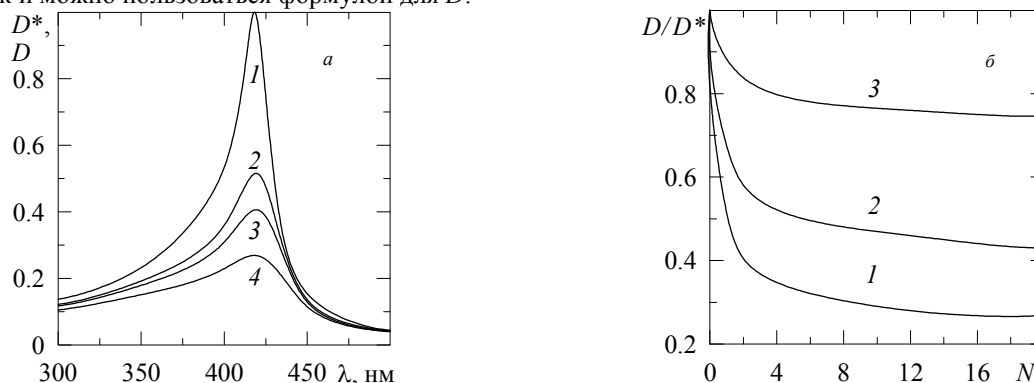


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от λ (а) и N (б); а: 1 – раствор, 2 – $l = 2$, 3 – 4, 4 – 40 мкм; б: 1 – $\lambda = 418$, 2 – 400, 3 – 450 нм

На рис. 1а по (3) построены спектральные оптические плотности при хаотическом распределении эритроцитов по углам и разной степени агрегации. Видно, что кривые сильно отличаются друг от друга, особенно в максимуме поглощения гемоглобина в полосе Сорэ ($\lambda_{\max} \cong 420$ нм), где оптические размеры $k_c d$ и $k_c l_0$ отдельных эритроцитов или их агрегатов принимают наибольшие значения. Это связано с сильным изменением величины c и составляет физическую основу предлагаемого способа. Очевидно

$$D/D^* = c. \quad (4)$$

На рис. 1б представлены нормированные оптические плотности как функции N при разных длинах волн. Измерив D/D^* , можно по приведенным градуировочным графикам определить степень агрегации. Как видно, чувствительность нормированной оптической плотности к N (или l) наибольшая вблизи максимума поглощения крови при $\lambda = 415 - 420$ нм. Кривые 1 – 3 на рис. 1б слабо зависят от N при $N > 20$ или $l > 40$ мкм. Поэтому чувствительность уменьшается при указанных значениях N и l , так что способ практически применим при $N < 20$ или $l < 40$ мкм.

Определение концентрации гемоглобина в пробе крови. При решении этого вопроса основу аналитического подхода [7] составляет асимптотическая теория переноса излучения [8]. Область ее применимости как раз соответствует оптическим свойствам суспензии эритроцитов, особенно в красной и ближней ИК области спектра:

$$k/\varepsilon \leq 0.18, \quad \tau = \varepsilon L \geq 2/3, \quad (5)$$

где k – показатель поглощения среды, $\varepsilon = \varepsilon'(1 - g)$ – приведенный показатель ослабления, ε' – показатель ослабления, g – средний косинус индикатрисы рассеяния, τ и L – приведенная оптическая и геометрическая толщина среды. Входящие в (5) оптические характеристики явным образом связаны с искомыми параметрами крови. Если говорить о показателе поглощения, то эта связь приведена в (2).

При использовании этого подхода обычно измеряют коэффициенты диффузного отражения R и пропускания T слоя среды. В эксперименте, естественно, необходимо учесть влияние границ рассеивающего слоя. Следует указать, что в асимптотической теории [8] это сделано, но для сравнительно малых коэффициентов отражения границ. Нами выполнен более точный расчет. Рассмотрена следующая система. Кювета с кровью накрыта стеклянной плоскопараллельной пластинкой. Снизу кювета имеет идентичную стеклянную подложку. Сверху по нормали к поверхности падает монохроматический направленный пучок света. Возникают многократные отражения света в трехслойной системе: верхняя граница (пластинка) – суспензия – нижняя граница (подложка). Их можно учесть и получить формулы для R и T в такой системе, которые выражаются через достаточно точно рассчитываемые коэффициенты отражения и пропускания рассеивающей среды по асимптотической теории без учета границ и коэффициенты отражения границ ρ со стороны мутного слоя [9]. Последние оказываются при типичных условиях эксперимента равными 0.6 и 0.54

Для нахождения полной концентрации гемоглобина C можно предложить следующую методику.

Воспользовавшись формулами для T и R , рассчитаем номограмму, показанную на рис. 2а. Здесь при толщине кюветы 0.2 см, для указанных выше коэффициентов отражения от границ слоя изнутри 0.6 и 0.54 в системе координат $T - R$ построено два семейства кривых для $\lambda = 800$ нм, где показатели поглощения окси- и деоксигемоглобина равны 30 см^{-1} [5]. В одном семействе каждая кривая соответствует постоянному C и разным приведенным показателям рассеяния $\sigma = \sigma_p H(1-g)/v_p$ (σ_p и v_p – поперечник рассеяния и объем эритроцита), а в другом – постоянному σ и разным C . Номограмма позволяет по измеренным T и R определить C и σ .

Если концентрация гемоглобина C измерена другим способом (в частности, спектрофотометрическим методом на гемолизированной крови), то можно определить приведенный показатель рассеяния и коэффициент отражения границы слоя. Для этого на рис. 2б в системе координат $T - R$ представлена другая номограмма. Она получена, для примера, при $\lambda = 800$ нм, $C = 0.1$, $L = 0.2$ см и разных σ и ρ . Последние полагаем у верхней и нижней границ равными, что делает расчет несколько менее точным.

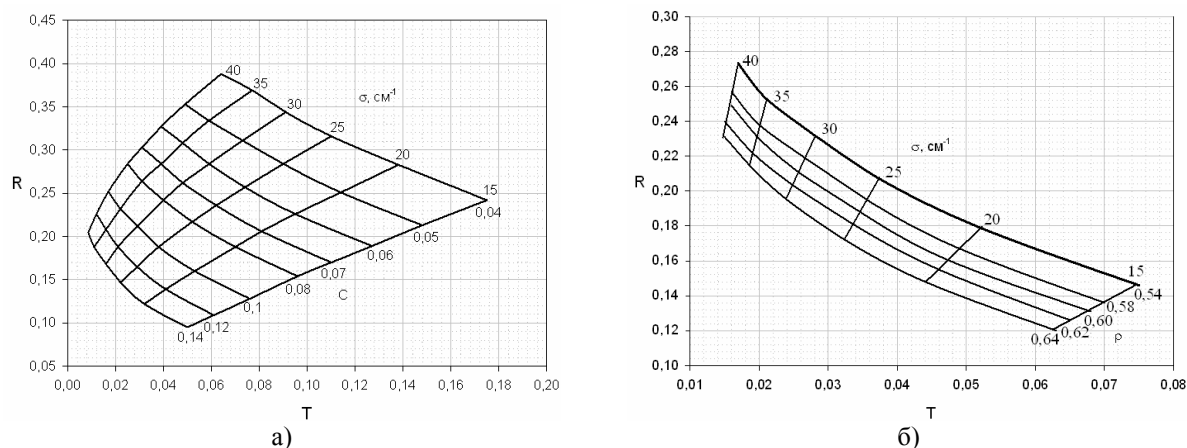


Рис. 2. Номограми $R - T$ при $\lambda = 800$ нм, різних σ і C (а), різних σ і ρ (б)

Після того, як знайдені C і σ , перейдемо до визначення S .

Для визначення ступеня оксигенації крові необхідно виміряти R або T на інших довжинах хвиль. На рис. 3 побудовані залежності R і T від S при $C = 0.1$. Видно, що з віддаленням від $\lambda = 800$ нм чутливість R і T до S зростає. Це пов'язано зі специфікою спектрів поглинання окси- і дезоксигемоглобіна. Збільшення товщини шару також збільшує чутливість визначення S по T .

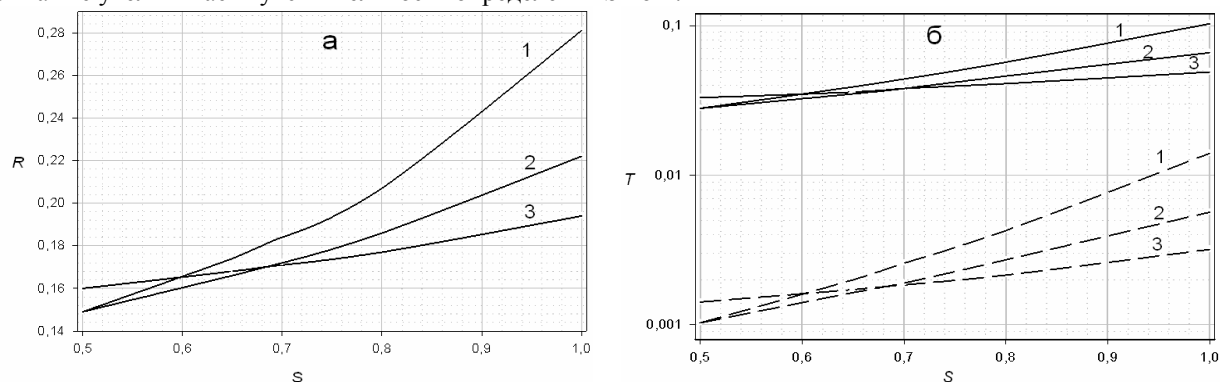


Рис. 3. Залежність коефіцієнтів дифузного відбиття (а) і пропускання (б) від ступеня оксигенації крові S при $\lambda = 700$ (криві 1), 750 (2) і 775 нм (3). Для а - $L = 0.2$ см, для б - сплошні лінії $L = 0.2$ см, пунктирні 0.4 см

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Meinke M., Gersonde I., Friebel M., et al. // Appl. Spectrosc. – 2005. – V. 59. – P. 826 – 835.
2. Кассирский И. А., Алексеев Г. А.. Клиническая гематология, Москва: Медицина. 1970.
3. Левтов В. А., Регирер С. А., Шадрин Н. Х.. Реология крови, Москва: Медицина. 1982.
4. Науменко Е. К. // Журн. прикл. спектроск. – 2003. – Т. 70. – С. 375 – 380.
5. Prahl S. A.. <http://omlc.org/spectra/hemoglobin/index.html>.
6. Барун В. В., Иванов А. П. // Опт. спектроск. – 2004. – Т. 96. – С. 1019 – 1024.
7. Хайруллина А. Я. / Распространение света в дисперсной среде. Под ред. Иванова А. П. Минск: Наука и техника. 1982. С. 275 – 292.
8. Зега Э. П., Иванов А. П., Кацев И. Л. Перенос изображения в рассеивающей среде. Минск: Наука и техника. 1985. 327 с.
9. Барун В. В., Иванов А. П. // Инж.-физ. журн. – 2011. – Т. 84. – С. 22 – 31.

УДК 681.518.5

Петрук В.Г., Кватернюк С.М., Кватернюк О.Є., Вишнеvsька Я. Ю. (Україна, Вінниця)

МЕТОДИКА ОЦІНЮВАННЯ ТОКСИЧНОСТІ СТІЧНИХ ВОД ЗА ДОПОМОГОЮ БІОІНДИКАЦІЇ ПО ФІТОПЛАНКТОНУ

Розвиток виробництва призводить до збільшення техногенного впливу на водні екосистеми за рахунок підвищення скиду забруднюючих речовин зі стічними водами у місцеві водні об'єкти. Навіть при наявності нового сучасного технологічного обладнання ряд хімічних речовин, що застосовуються у виробництві можуть потрапляти у стічні води, наприклад, при порушенні технологічних процесів чи виході з ладу очисного