

УДК 539.2+621.315.592

АКУСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОСТАВА СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2009 г. С. Н. Гурбатов, И. Ю. Демин, А. В. Клемина, В. А. Клемин*

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

** ЗАО “фирма “БИОМ”*

603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина 23

E-mail: klemina@rf.unn.ru

Поступила в редакцию 28.11.08 г.

Представлены новые акустические методы определения общего белка, белковых фракций и липидных компонентов сыворотки крови человека. Акустические методы базируются на высокоточных измерениях температурных зависимостей скорости и частотных и температурных зависимостях поглощения ультразвука. Измерения акустических характеристик сыворотки крови выполнялись методом интерферометра постоянной длины в акустических ячейках объемом около 80 мкл в температурном диапазоне 15–40°C, в частотном интервале 4–9 МГц на отечественном акустическом анализаторе, разработанном фирмой “БИОМ”. Погрешность измерения скорости ультразвука в сыворотке крови составила 3×10^{-5} , поглощения – 2×10^{-2} . Разработанные акустические методы клинически апробированы и рекомендованы к использованию в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений России.

PACS: 43.35.Yb, 43.80.Q

1. ВВЕДЕНИЕ

Акустические исследования биологических жидкостей позволяют изучать тонкие структурные характеристики и гидратацию биологических макромолекул в растворе, их межмолекулярные взаимодействия и конформационные перестройки биополимеров [1, 2]. На основе этой информации при использовании определенных модельных представлений возможно анализировать состав сложных биологических жидкостей, таких как сыворотка крови, желудочный сок, слюна и т.д. [3]. Систематические акустические исследования биологических жидкостей, взятых у пациентов с различными заболеваниями, стали возможными с появлением прецизионного резонаторного метода измерения скорости и поглощения ультразвука в сверхмалых (менее 100 мкл) объемах жидкости с разрешением по скорости порядка $10^{-4}\%$ и по поглощению порядка $10^{-2}\%$ [4].

В настоящее время в медицинской лабораторной практике применяется большое количество методов определения биохимических показателей сыворотки крови: фотометрические, турбодиметрические, электрофоретические и т.д. [5]. Все эти методы предполагают применение реактивов, а это значит, что исследования находятся в зависимости от наличия, стоимости и качества диагностических наборов. Более того, реагенты добавляют дополнительный этап в измерительную процедуру, что неизбежно сопровождается увеличением погрешностей лабораторных исследований. Для определения некоторых биохими-

ческих параметров требуется достаточно длительное время проведения анализа. При этом каждая из известных методик исследования биохимических показателей предназначена для определения только одного из компонентов сыворотки крови. Не существует единого метода определения сразу нескольких биохимических показателей в одном образце крови.

Многие физиологические и патологические процессы в организме протекают при непосредственном участии белков. Белки поддерживают коллоидно-осмотическое давление плазмы крови, осуществляют транспорт многих эндо- и экзогенных веществ (гормонов, липидов, лекарственных средств), являются ферментами, факторами свертывания крови и так далее. И хотя на сегодняшний день возможна идентификация и количественное определение многих индивидуальных белков, определение общего белка сыворотки крови по-прежнему актуально в скрининговых исследованиях. Важным тестом является и фракционирование белков, так как при многих состояниях возникает диспротеинемия, т.е. состояние, которое характеризуется сохранением концентрации общего белка в диапазоне нормальных значений при изменении соотношения между различными белковыми фракциями. В этой ситуации очевидна необходимость проведения биохимического скрининга для распределения белковых фракций. В некоторых странах эта задача решается при помощи электрофоретического разделения белковых фракций сыворотки крови. Однако в нашей стране этот метод не получил

широкого распространения ввиду трудоемкости и дороговизны и фактически как скрининг не применяется. В связи с этим перспектива появления нового метода с целью биохимического скрининга диспротеинемий вполне актуальна.

Вопросы профилактики болезней системы кровообращения — ведущей причины смертности во всех индустриально развитых странах — уже несколько десятилетий занимают как теоретическую медицину, так и врачей практиков. Среди многих факторов риска развития болезней системы кровообращения важнейшими являются гиперлипидемия и гиперхолестеринемия, т.е. повышенное содержание липидов в сыворотке крови. Многочисленными исследованиями показано, что обязательным является определение помимо холестерина общего ($X_{об}$) еще холестерина липопротеинов высокой плотности ($X_{лпвп}$), холестерина липопротеинов низкой плотности ($X_{лпнп}$) и триглицеридов (ТрГ). Всем взрослым людям старше 20 лет каждые 5 лет необходимо выполнять исследование липидного спектра сыворотки крови. У каждого человека содержание липидов меняется изо дня в день и от недели к неделе [6]. Поэтому даже в хорошо оборудованной лаборатории показатели у одного же больного в разное время могут значительно отличаться. Следовательно, при выборе лечения необходимо принимать во внимание результаты двух или большего числа измерений. Тесты для определения $X_{об}$ просты и сравнительно недороги. Но исследование ТрГ и холестерина в липопротеинах различной плотности — полная липидограмма — в зависимости от методов исследования становится достаточно дорогим анализом.

Для определения липидных компонентов в настоящее время используют ферментативные методы с последующим фотометрированием результата реакции ($X_{об}$, ТрГ) и методы осаждения с последующим фотометрированием надосадочной среды ($X_{лпвп}$, $X_{лпнп}$) с целью определения концентрации нужного компонента [7]. К недостаткам данных методов относятся методические трудности ферментативного определения холестерина общего из-за гетерогенности распределения холестерина общего между липопротеинами и необходимостью полного расщепления эфиров холестерина общего. Некоторые компоненты сыворотки крови могут оказывать влияние на результаты определения холестерина общего. Способ определения холестерина липопротеинов высокой и низкой плотности обладает низкой точностью, что обусловлено имеющей место повышенной мутностью надосадочной жидкости, приводящей к дополнительному светорассеянию, которая искажает результат определения нужных компонентов.



Рис. 1. Анализатор акустический безреагентный “БИОМ”.

Акустические характеристики цельной крови и ее основных компонентов: сыворотки крови и эритроцитов исследовались еще прошлым веком [8, 9]. Однако сравнительно большие объемы (более 1 мл) акустических ячеек не позволили проводить систематические исследования с целью анализа состава сыворотки крови при различных патологических состояниях. Первой биологической средой, в которой исследование акустических свойств было выполнено для анализа состава среды, явился желудочный сок человека в норме и при ряде желудочных заболеваний [3].

В настоящей работе представлены результаты систематических исследований акустических характеристик сыворотки крови человека (в норме и при различных заболеваниях), 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, которые к тому же часто вредны для здоровья врача-лаборанта. Представлены результаты сопоставительных испытаний традиционных и акустических методов в ведущих медицинских центрах России. На основе этих испытаний акустические методы рекомендованы к применению в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений.

2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

2.1. Принцип работы акустического анализатора

Метод акустического интерферометра постоянной длины, реализованный в акустическом анализаторе биологических сред (рис. 1), разработан и изготавливается фирмой “БИОМ” под руководством В.А. Клемина. Работа прибора основана на том, что столбик исследуемой жидкости, находящейся в цилиндрической полости между двумя пьезопреобразователями (рис. 2), является

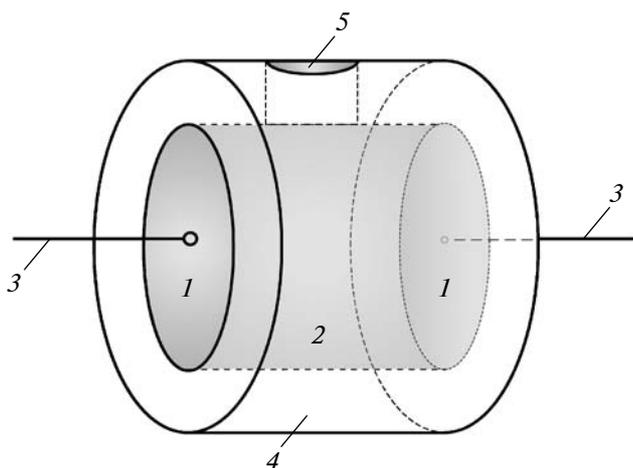


Рис. 2. Схематическое изображение акустического датчика. 1 – пьезопреобразователь, 2 – камера для образца, 3 – проводник, 4 – корпус датчика, 5 – заливная горловина.

механическим резонатором, собственные частоты которого линейно связаны со скоростью ультразвука в исследуемой среде. Измерение скорости ультразвука в жидкости, заполняющей ячейку, сводится к определению частоты заданного резонансного пика по максимуму амплитудно-частотной характеристики или по точке перегиба на фазово-частотной характеристике (рис. 3). Одновременно измеряется ширина резонансного пика на уровне 0.707 от максимума амплитуды или крутизна фазово-частотной характеристики в точке перегиба, связанные с величиной поглощения ультразвука.

В приборе “БИОМ” применяется метод интерферометра постоянной длины, основанный на использовании плоских стоячих ультразвуковых волн в цилиндрическом резонаторе. Термостатирование акустических ячеек выполняет специализированный ультратермостат. Точность поддержания температуры в ячейках объемом 80 мкл составляет 0.005°C . Точность измерения относительной скорости ультразвука в сыворотке крови на приборе “БИОМ” составляет величину порядка 3×10^{-5} . Это было определено с использованием растворов NaCl различной концентрации [10] и данных по скорости ультразвука в дистиллированной воде [11]. На основании сопоставления с литературными данными по растворам MnSO_4 [12] точность измерения поглощения ультразвука была определена равной приблизительно 2×10^{-2} . Калибратором для данного прибора является дистиллированная вода, которая помещается в акустические ячейки двух измерительных устройств (№ 1 и № 2) прибора, находящихся при двух конкретных температурах. В термостатируемых ячейках поддерживается строго заданная температура из диапазона $15\text{--}40^{\circ}\text{C}$.

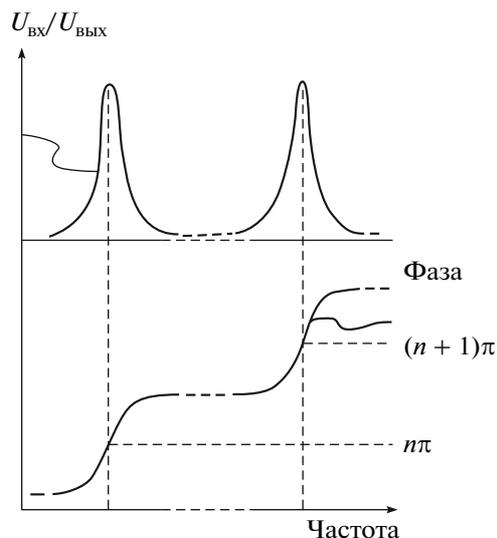


Рис. 3. Участок амплитудно- и фазо-частотной характеристики акустического датчика.

На рис. 4 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 цепью фазовой автоподстройки частоты (ФАПЧ). Перестройка частоты генераторов производится модулем управления 9 через цифро-аналоговый 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.

На акустические датчики подается сигнал частотой, изменяющейся на 10 МГц из любой части диапазона $2\text{--}20$ МГц (например, от 5.0 до 15.0 МГц). 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. Компьютер вычисляет среднюю разность частотного расстояния между резонанс-

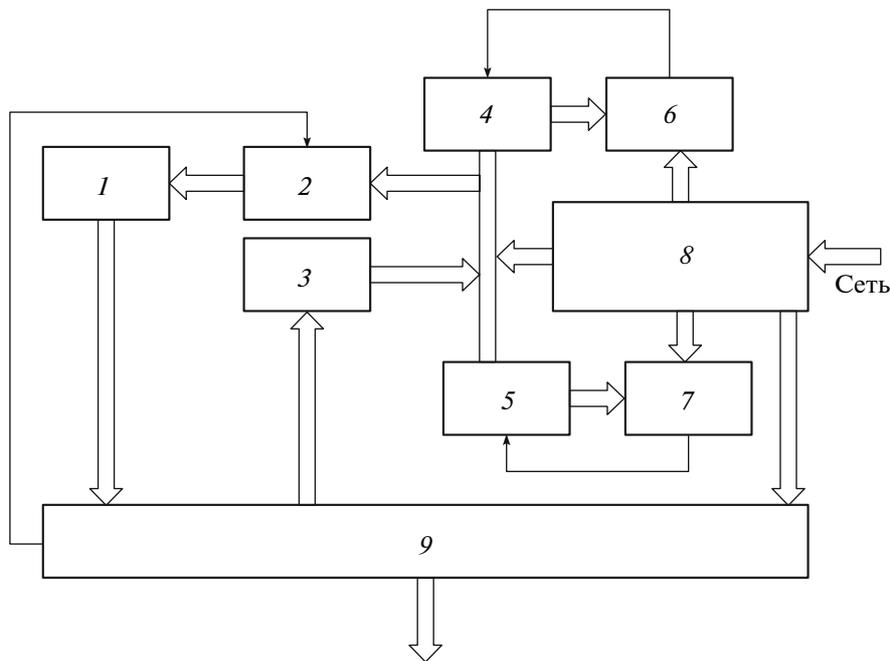


Рис. 4. Упрощенная структурная схема анализатора.

ми пиками и номер выбранного резонансного пика по формуле:

$$j = \frac{Nf_j}{\sum_{k=1} (f_{j+1} - f_j)_k}. \quad (1)$$

Здесь j – порядковый номер выбранного резонансного пика; N – число частотных расстояний между резонансными пиками в данном частотном диапазоне; f_j и f_{j+1} – резонансные частоты j -ого и $j + 1$ -ого резонансных пиков. Затем компьютером выбираются значения центральных частот резонансных пиков одного и того же номера для дистиллированной воды и исследуемой среды. Скорость ультразвука может быть вычислена по формуле [13]:

$$V^{(S)} = \frac{2lf_j^{(S)}}{j}, \quad (2)$$

где $V^{(S)}$ – скорость в исследуемой биологической среде, $f_j^{(S)}$ – резонансные частоты в исследуемой биологической среде, j – номер резонансного пика, l – эффективная длина ячейки (ее можно определить на основании известной скорости ультразвуковых волн в дистиллированной воде при заданной температуре [11]).

На основании результатов, полученных по формуле (2) для скорости ультразвука в сыворотке крови $V_{1,2}^{(S)}$ (индексы 1 и 2 определяются порядковым номером измерительных устройств) и извест-

ной скорости ультразвука в дистиллированной воде $V_{1,2}^{(H_2O)}$, вычисляют относительные изменения скорости ультразвука в сыворотке крови относительно дистиллированной воды в устройствах № 1 и № 2 по формуле:

$$\Phi_{1,2} = \frac{V_{1,2}^{(S)} - V_{1,2}^{(H_2O)}}{V_{1,2}^{(H_2O)}}. \quad (3)$$

Также на основании измерений можно определить и поглощение ультразвука в исследуемой биологической среде по формуле [13]:

$$\alpha_s^T \lambda = \pi \frac{\Delta f_s - \Delta f_{H_2O}}{f_s}, \quad (4)$$

где $\alpha_s^T \lambda$ – относительное поглощение ультразвука на длину волны в сыворотке крови относительно дистиллированной воды; Δf_s – ширина резонансного пика в сыворотке крови, Δf_{H_2O} – ширина резонансного пика в дистиллированной воде, f_s – частота резонансного пика в исследуемой биологической среде, λ – длина волны.

2.2. Исследования сыворотки крови

Сыворотка крови является сложной биологической жидкостью, содержащей множество компонентов, необходимых для жизнедеятельности организма человека. Важнейшими компонентами сыворотки крови являются глобулярные белки. Их вклад в суммарные акустические характеристики

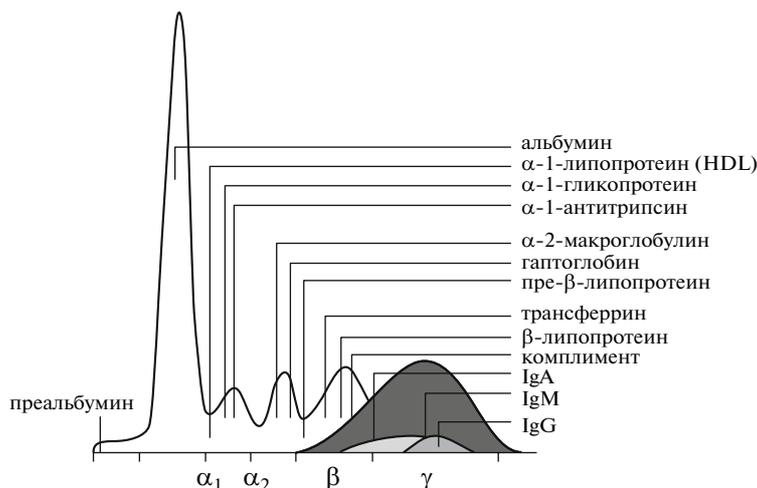


Рис. 5. Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови.

наиболее значителен (до 90%) из-за высокой концентрации в сыворотке крови (75–85 г/л) в норме.

Под определением “общий белок” сыворотки крови понимается большое количество белков, различающихся по структуре и функциям. Концентрация общего белка в сыворотке зависит как от физиологических факторов (возраст, пол, питание, климат, физическая нагрузка, прием лекарственных препаратов), так и от патологических (нарушение синтеза белков в печени, потери белка, например при заболевании почек). Повышение концентрации общего белка возникает достаточно редко (при обезвоживании организма, заболевания системы крови (миеломная болезнь) и т.д.), чаще происходит снижение концентрации общего белка (заболевания печени, почек, кровотечения, ожоги и т.п.). Еще чаще возникает нарушение соотношения отдельных белков. В таком случае определение концентрации общего белка не выявит патологии, поэтому важным является анализ отдельных фракций.

Для диагностики заболеваний внутренних органов большое значение имеет комплексная оценка изменений всех выявляемых белковых фракций. Наиболее распространен электрофоретический метод разделения белков [14]. Определение белковых фракций выполняется с помощью электрофоретического разделения исследуемой сыворотки, помещенной в камеру с буферным раствором, через который пропускают электрический ток определенной силы при напряжении приблизительно 300 В. В зависимости от электрического заряда и других физических и химических свойств белковые фракции передвигаются к одному из полюсов. В качестве поддерживающей среды при электрофорезе применяют бумагу, пленки ацетата целлюлозы, гели крахмала, агара и комбинированные среды. Оценку результатов

производят фотометрически или на денситометре (пример приведен на рис. 5) [14]. Недостатками электрофоретического метода разделения белковых фракций сыворотки крови являются химическая неоднородность поддерживающей среды, большая продолжительность процессов разделения, окрашивания, отмывания (в случае использования бумаги это 24–36 часов, ацетата целлюлозы – 1–2 часа). Кроме того, для определения процентного содержания белковых фракций сыворотка крови подвергается электрическому (пропускание достаточного сильного электрического поля через сыворотку), физическому (проникновение через поры бумаги или пленки ацетата целлюлозы), а также химическому (связывание со специальными красителями для идентификации) воздействию, что ведет к значительному изменению белков.

В разработанном нами акустическом методе концентрация общего белка сыворотки крови определяется по формуле:

$$C_{об} = \left(\frac{1}{A_{об}} \right) \alpha_s^T, \quad (5)$$

где $C_{об}$ – концентрация общего белка в г/л; α_s^T – относительное поглощение ультразвука в сыворотке крови относительно дистиллированной воды; $A_{об}$ – концентрационный коэффициент поглощения для общего белка. Заметим, что $A_{об}$ определяют общепринятым образом с помощью калибровки интерферометра по водным растворам альбумина различной концентрации из диапазона от 10 до 160 г/л (в данном диапазоне зависимость акустических свойств растворов от концентрации белка линейна).

Акустический метод определения белковых фракций базируется на исследованиях скорости

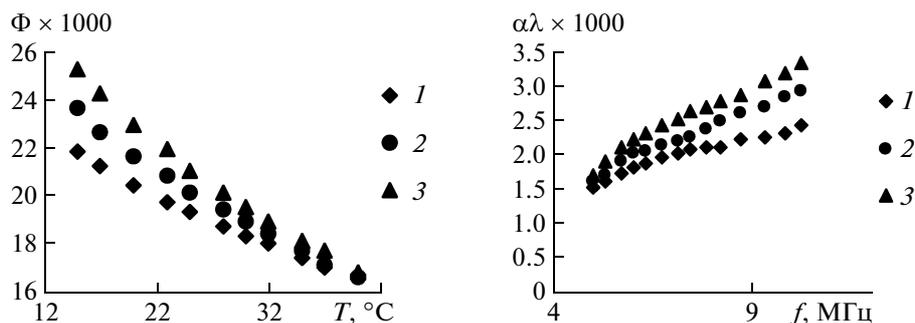


Рис. 6. а) температурная зависимость относительного изменения скорости Φ ультразвука; б) частотная зависимость поглощения на длину волны $\alpha\lambda$ ультразвука.

ультразвука в сыворотке крови и в двух модифицированных сыворотках, полученных с помощью воздействия на сыворотку разработанными нами растворами. Предполагалось, что белковые фракции дают аддитивный вклад в относительные изменения скорости ультразвука в сыворотке крови и двух модифицированных сыворотках, одна из которых не содержит γ -глобулин, а другая β - и γ -глобулины. Принимая во внимание минимальное влияние низкомолекулярных компонентов сыворотки крови¹ на скорость ультразвука в этих биологических средах, для определения процентных долей в сыворотке крови $C_{ал}$ – альбумина, C_{α_1} – α_1 -глобулина, C_{α_2} – α_2 -глобулина, C_{β} – β -глобулина, C_{γ} – γ -глобулина будем использовать следующую систему линейных уравнений [15]:

$$\begin{aligned}
 & C_{ал} \times A_{ал}^{T_1} + C_{\alpha_1} \times A_{\alpha_1}^{T_1} + C_{\alpha_2} \times \\
 & \times A_{\alpha_2}^{T_1} + C_{\beta} \times A_{\beta}^{T_1} + C_{\gamma} \times A_{\gamma}^{T_1} = \Phi_1 \\
 & C_{ал} \times A_{ал}^{T_2} + C_{\alpha_1} \times A_{\alpha_1}^{T_2} + C_{\alpha_2} \times \\
 & \times A_{\alpha_2}^{T_2} + C_{\beta} \times A_{\beta}^{T_2} + C_{\gamma} \times A_{\gamma}^{T_2} = \Phi_2 \quad (6) \\
 & C_{ал} \times K_{ал}^{T_1} + C_{\alpha_1} \times K_{\alpha_1}^{T_1} + C_{\alpha_2} \times K_{\alpha_2}^{T_1} + C_{\beta} \times K_{\beta}^{T_1} = \Phi_3 \\
 & C_{ал} \times K_{ал}^{T_2} + C_{\alpha_1} \times K_{\alpha_1}^{T_2} + C_{\alpha_2} \times K_{\alpha_2}^{T_2} = \Phi_4 \\
 & C_{\gamma} = 100\% - C_{ал} - C_{\alpha_1} - C_{\alpha_2} - C_{\beta}
 \end{aligned}$$

Здесь $A_{ал}^{T_1}, A_{\alpha_1}^{T_1}, A_{\alpha_2}^{T_1}, A_{\beta}^{T_1}, A_{\gamma}^{T_1}$ – концентрационные коэффициенты скорости ультразвука для альбумина, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулинов соответственно при температуре T_1 в сыворотке крови; $A_{ал}^{T_2}, A_{\alpha_1}^{T_2}, A_{\alpha_2}^{T_2}, A_{\beta}^{T_2}, A_{\gamma}^{T_2}$ – концентрационные коэффициенты скорости ультразвука для альбумина, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулинов соответственно при температуре T_2 в сыворотке крови; $K_{ал}^{T_1}, K_{\alpha_1}^{T_1}, K_{\alpha_2}^{T_1}, K_{\beta}^{T_1}$ – концентрационные коэффициенты скоро-

сти ультразвука для альбумина, α_1 -, α_2 - и β -глобулинов в модифицированной сыворотке № 1 при температуре T_1 ; $K_{ал}^{T_2}, K_{\alpha_1}^{T_2}, K_{\alpha_2}^{T_2}$ – концентрационные коэффициенты скорости ультразвука для альбумина, α_1 - и α_2 -глобулинов в модифицированной сыворотке № 2 при температуре T_2 . $\Phi_{3,4}$ – относительные изменения скорости ультразвука в модифицированных сыворотках при температурах T_1 и T_2 соответственно:

$$\Phi_{3,4} = \frac{V_{3,4}^{(mS)} - V_{1,2}^{(H_2O)}}{V_{1,2}^{(H_2O)}}, \quad (7)$$

где $V_{3,4}^{(mS)}$ – скорость ультразвука в исследуемых модифицированных сыворотках.

Очевидно, что самым сложным в построении данной системы уравнений было определение концентрационных коэффициентов при неизвестных, причем таких, которые удовлетворяли большинству патологических сывороток. Методология получения концентрационных коэффициентов скорости ультразвука для определения белковых фракций согласно системе уравнений (6) базируется на исследовании белковых растворов как высокоочищенных белков (например, альбумина, γ -глобулина), так и белковых растворов, приготовленных из сыворотки крови путем селективного осаждения определенных белковых фракций. В последующем коррекция некоторых коэффициентов выполнялась с помощью сравнительных исследований образцов сыворотки крови электрофоретическим и акустическим методами для определенных патологических состояний, таких как воспалительный синдром, заболевания почек, миеломная болезнь.

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 ли-

¹ Суммарный вклад глюкозы, мочевины, сиаловых кислот, Na^+ , K^+ и Ca^{2+} составляет не более (1–2)% от вклада белков.

пидных компонентов. На рис. 6 представлены результаты исследования а) температурной зависимости относительного изменения скорости ультразвука и б) частотной зависимости поглощения на длину волны для трех типов сывороток крови при одинаковом (66 г/л) содержании общего белка и различном содержании липидных компонентов:

1 – нормальном ($X_{об} = 4$ ммоль/л, $X_{ЛПВП} = 1.37$ ммоль/л, $Трг = 0,9$ ммоль/л); 2, 3 – патологических (2 – $X_{об} = 5.8$ ммоль/л, $X_{ЛПВП} = 1.00$ ммоль/л, $Трг = 1.9$ ммоль/л; 3 – $X_{об} = 7.4$ ммоль/л, $X_{ЛПВП} = 0.80$ ммоль/л, $Трг = 3.7$ ммоль/л).

Анализ результатов исследований сывороток крови с различными значениями липидных компонентов позволил выявить четкие закономерности 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 [16]:

$$\begin{aligned} C_{X_{об}}(A_{X_{об}}) + C_{X_{ЛПВП}}(A_{X_{ЛПВП}}) + C_{Трг}(A_{Трг}) &= \delta\varphi_T \\ C_{X_{об}}(B_{X_{об}}) + C_{X_{ЛПВП}}(B_{X_{ЛПВП}}) + C_{Трг}(B_{Трг}) &= \delta\xi_T \quad (8) \\ C_{X_{об}}(D_{X_{об}}) + C_{X_{ЛПВП}}(D_{X_{ЛПВП}}) + C_{Трг}(D_{Трг}) &= \delta\xi_f, \end{aligned}$$

где $\delta\varphi_T = (\varphi_1 - \varphi_2)/\Delta T$ – температурный коэффициент скорости ультразвука в сыворотке крови; $\delta\xi_T = (\xi_{T1} - \xi_{T2})/\Delta T$ – температурный коэффициент поглощения ультразвука в сыворотке крови; $\delta\xi_f = (\xi_{f1} - \xi_{f2})/\Delta F$ – частотный коэффициент поглощения ультразвука в сыворотке крови; ξ_{T1} – коэффициент поглощения ультразвука в сыворотке крови при температуре T_1 из интервала $(15 \div 40)^\circ\text{C}$; ξ_{T2} – коэффициент поглощения ультразвука в сыворотке крови при температуре T_2 из диапазона $(15 \div 40)^\circ\text{C}$; ξ_{f1} – коэффициент поглощения ультразвука в сыворотке крови при частоте f_1 из диапазона $(4-9)$ МГц; ξ_{f2} – коэффициент поглощения ультразвука в сыворотке крови при частоте f_2 из диапазона $(4-9)$ МГц; $(A_{X_{об}})$, $(A_{X_{ЛПВП}})$, $(A_{Трг})$ – концентрационные коэффициенты $\delta\varphi_T$ в сыворотке крови для $X_{об}$, $X_{ЛПВП}$, $Трг$ соответственно; $(B_{X_{об}})$, $(B_{X_{ЛПВП}})$, $(B_{Трг})$ – концентрационные коэффициенты $\delta\xi_T$ в сыворотке крови для $X_{об}$, $X_{ЛПВП}$, $Трг$ соответственно; $(D_{X_{об}})$, $(D_{X_{ЛПВП}})$, $(D_{Трг})$ –

концентрационные коэффициенты $\delta\xi_f$ в сыворотке крови для $X_{об}$, $X_{ЛПВП}$, $Трг$ соответственно. $C_{X_{ЛПВП}}$ определяется по формуле Фридрексона [7]:

$$C_{X_{ЛПВП}} = C_{X_{об}} - (C_{X_{ЛПВП}} + C_{X_{ЛПОНП}}), \quad (9)$$

где $C_{X_{ЛПОНП}} = C_{Трг}/2.2$, что справедливо для $C_{Трг} < 4.5$ ммоль/л. Процент пациентов, у которых значение $C_{Трг} > 4.5$ ммоль/л, составляет величину не более 0.1% от общего числа пациентов с нарушениями липидного обмена.

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 образом 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). Для сывороток с $C_{Трг} > 4.5$ ммоль/л нами были получены уточненные значения коэффициентов в системе (8) путем сопоставительных исследований акустического и традиционного биохимических методов.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

При определении общего белка на аппарате “БИОМ” была выполнена проверка воспроизводимости (внутрисерийной и аналитической), правильности (сравнением с контрольными сыворотками Serodos и Serodos plus, Human, Германия) и чувствительности акустического метода определения общего белка на аппарате “БИОМ”. В качестве метода сравнения использовался биуретовый метод определения концентрации общего белка в сыворотке крови [5].

Был проведен регрессионный анализ и рассчитан коэффициент корреляции для оценки связи показателей, полученных двумя методами. Получена высокая степень корреляции ($R = 0.97$) для выборки $n = 80$, n – количество проб. Статистическая значимость коэффициента корреляции проверялась по таблице распределения Стьюдента для числа степеней свободы $f = 78$ и уровня значимости 5%. Полученные значения для воспроизводимости по общему белку для прибора “БИОМ” приведены в табл. 1, где CV – коэффициент вариации. Все полученные значения соответствуют нормам аналитической точности клинических лабораторных исследований. Чувствительность акустического метода определения общего белка на приборе “БИОМ” менее 10 г/л в интервале концентраций общего белка 10–150 г/л.

Таблица 1. Воспроизводимость по общему белку для прибора “БИОМ”

	CV , полученный на сливной сыворотке; CV_{10} , %	CV , полученный на контрольном материале (Serodos); CV_{10} , %	Норма аналитической точности для общего белка CV_{10} , %
Внутрисерийная воспроизводимость (сходимость)	0.23	0.26	$0.5CV_{10} = 2.4$
Аналитическая воспроизводимость	0.72	1.7	4.8

Таблица 2. Оценка воспроизводимости при определении белковых фракций

Исследование сыворотки	Альбумин	Глобулины			
		α_1 -	α_2 -	β -	γ -
Коэффициент вариации (%) сыворотки человека	1.55	1.66	1.03	0.08	4.03
Коэффициент вариации (%) контрольной сыворотки	0.34	4.04	0.64	0.11	0.70

Сравнение результатов акустических исследований белкового спектра проводилось с данными, полученными на электрофоретической системе “Paragon” (Beckman, США) с денситометрией на денситометре Appraise (Beckman, США).

Проверку качества определения белковых фракций производили на акустическом анализаторе “БИОМ”, вычисляя воспроизводимость при определении данных показателей. С этой целью выполняли 10-ти кратное определение белковых фракций в сыворотке крови донора и в контрольной сыворотке, результаты представлены в табл. 2. Анализ полученных данных свидетельствует, что результаты вполне удовлетворяют нормам аналитической точности клинических лабораторных исследований.

При исследовании контрольной сыворотки (Human) на акустическом приборе и электрофоретическим методом на аппарате “Paragon” установлено, что различия для альбумина, α_1 -, α_2 - и γ -глобулинов находятся в пределах, указанных в паспорте на контрольные сыворотки, а для β -глобулинов несколько выше, чем указано 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 ($r = 0.95, 0.92, 0.65, 0.64$ соответственно).

При разработке акустического метода определения показателей липидного обмена было обращено особое внимание на метрологические характеристики анализатора акустического “БИОМ”. Необходимо было проведение измерений скорости и поглощения ультразвука в двух акустиче-

ских ячейках при температурах T_1 и T_2 , поддерживаемых с точностью не хуже $\pm 0.01^\circ\text{C}$. Для анализа синхронности измерения температуры в ячейках было разработано специальное устройство для измерений температуры в акустических ячейках сверхмалого объема и разности температур в ячейках. Калибровка устройства проводилась с использованием водяного ультратермостата УТ-15 и ртутных термометров с ценой деления 0.05°C и электронного термометра с точностью измерения температуры 0.01°C . Воспроизводимость измерения разности температур в акустических ячейках составила $\pm 0.005^\circ\text{C}$.

Было экспериментально доказано, что точность измерения температуры в акустических ячейках и разности температур между ячейками составляет $\pm 0.01^\circ\text{C}$. Этого оказалось достаточным для проведения точных измерений скорости и поглощения ультразвука в сыворотке крови с целью определения параметров липидного обмена.

Для ежедневного контроля качества в биохимических исследованиях помимо контрольных сывороток с известными значениями биохимических компонентов используются специальные калибраторы на каждый компонент. Для акустического метода определения параметров липидограммы нами разработаны калибраторы на основе глицерина и неорганических солей, которые позволяют ежедневно контролировать два уровня липидов: нормальный и патологический (последний соответствует повышению холестерина общего, холестерина липопротеинов низкой плотности и триглицеридов и понижению холестерина липопротеинов высокой плотности). Разработанные нами калибраторы стабильны и воспроизводимы, что является принципиально важным для анали-

тического определения липидных компонентов сыворотки крови акустическим методом.

В качестве необходимого элемента метрологического контроля определения липидных компонентов сыворотки крови был разработан специальный стенд, состоящий из двух акустических датчиков с водяным термостатированием, высокочастотного генератора Г4-158 и микровольметра ВЗ-48А. Акустические датчики термостатировались с помощью двух ультратермостатов УТ-15, которые поддерживали температуру в акустических датчиках с точностью $\pm 0.01^\circ\text{C}$. Все блоки разработанного стенда метрологически поверены в Росстандарте, и поэтому на стенде можно поверять калибраторы после их изготовления и в процессе эксплуатации. На этом стенде поверялся и анализатор акустический "БИОМ", в соответствии с методикой поверки, утвержденной в Росстандарте.

Воспроизводимость определения параметров липидограммы (определение холестерина общего, холестерина ЛПВП, холестерина ЛПНП и триглицеридов) производили в сыворотке больных с различным содержанием липидов и контрольных сыворотках "Serodos" фирмы Human (Германия). Средние коэффициенты вариации и величины смещения были ниже предельно допустимых значений для показателей липидного обмена, рекомендуемых соответствующими документами Минздравсоцразвития РФ.

Для оценки правильности определения липидных компонентов были использованы контрольные сыворотки "Serodos" фирмы 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 в Центральном военном госпитале Бурденко (г. Москва), на биохимическом анализаторе Konelab на кафедре лабораторной диагностики Ставропольской государственной медицинской академии, на биохимическом анализаторе Olimpus в частной клинико-биохимической лаборатории "Тематес" (г. Нижний Новгород) и в клинико-диагностическом отделении Нижегородского областного медицинского диагностического центра (г. Нижний Новгород). В общей сложности была исследована сыворотка крови 730 пациентов. Результаты сопоставительных исследований во всех указанных медицинских учреждениях имеют по всем измеренным липидным компонентам коэффициенты корреляции от 0.73 до 0.85, что соответствует высокой корреляционной связи, достаточной для правильной диагностики нарушений липидного обмена. Статистическая обработка данных показала, что средние величины смещения находятся

в пределах допустимых значений для показателей липидного обмена.

4. 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, т.е. двух разных приборов. Стоимость реактивов для таких аппаратов составляет несколько сотен рублей при выполнении анализа для одного пациента.

Проведены клинические испытания акустического метода определения этих компонентов сыворотки крови в четырех ведущих клиниках России: Больницы им. Боткина, Кардиологическом научном центре, Центральном военном госпитале им. Бурденко и Ставропольской медицинской академии на кафедре лабораторной диагностики, а также в областном Нижегородском диагностическом медицинском центре (г. Нижний Новгород). Результаты клинических испытаний во всех указанных медучреждениях положительные.

Авторы выражают искреннюю благодарность зав. кафедрой клинической и лабораторной диагностики РМАПО проф. Долгову В.В., зав. биохимической лабораторией Кардиологического научного центра проф. Титову В.Н., зав. биохимическим отделением Центрального военного госпиталя им. Бурденко к.м.н. Кудряшову С.К., зав. кафедрой лабораторной диагностики Ставропольской государственной медицинской академии проф. Первушину Ю.В. и зав. отделением клинико-лабораторной диагностики Нижегородского клинического диагностического центра к.м.н. Крыжановской Н.А. за организацию и проведение сопоставительных исследований акустического и традиционных биохимических методов определения общего белка, белковых фракций и липидных компонентов сыворотки крови.

Работа выполнена при поддержке ведущей научной школе НШ-1055.2008.2 и гранта РФФИ № 08-02-00631.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sarvasyan A.P.* Ultrasonic velocimetry of biological compounds // *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1991. V. 20. P. 321–342.
2. *Сарвазян А.П., Харакоз Д.П.* Акустические исследования конформационных состояний белков в водных растворах // В сб.: Молекулярная и клеточная биофизика. М.: Наука. 1977. С. 93–106.
3. *Klemin V.A., Karev I.D., Sarvasyan A.P., Timokhina L.M., Ruchkin V.V., Mayorov E.A.* Relation of acoustic characteristics of human gastric juice to its composition for some stomach diseases // *Studia Biophysica.* 1981. V. 84. № 2. P. 139–144.
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.
5. *Тиц У.* Клиническое руководство по лабораторным тестам // Пер. с англ. под ред. Меньшикова В.В. М.: ЮНИМЕД-пресс. 2003. 721 с.
6. *Творогова М.Т.* Степень достоверности однократного определения холестерина // *Клиническая диагностика.* 1997. № 1. С. 4–6.
7. *Долгов В.В., Титов В.Н., Творогова М.Г., Ройтман А.П., Шевченко Н.Г.* Лабораторная диагностика нарушений обмена липидов. Учебное пособие. М. 1999. 55 с.
8. *Carstensen E.L., Li K., Schwan H.P.* Determination of acoustic properties of blood and its components // *J. Acoust. Soc. Am.* 1953. V. 25. P. 286–289.
9. *Яронис Г., Сукацкас В., Лукашкявичус А., Волейшис А.* Вопросы ультразвуковой диагностики крови // В сб. Проблемы техники в медицине. Томск. 1983. С. 196–197.
10. *Millero F.J., Vinokurova F., Fernandez M., Hershey P.J.* PVT properties of concentrated electrolytes. VI. The speed of sound and apparent molal compressibilities of NaCl, Na₂SO₄, MgCl₂, MgSO₄ solutions from 0 to 100°C // *J. Solution Chemistry.* 1987. V. 16. № 4. P. 269–284.
11. *Del Grosso V.A. and Mader C.W.* Speed of sound in pure water // *J. Acoust. Soc. Am.* 1972. V. 52. P. 1442–1446.
12. *Стюэр Дж., Езер Э.* Распространение ультразвуковых волн в растворах электролитов. // В кн. *Физическая акустика*, под. ред. Мэзона. М. 1968. Т. 2. С. 371–485.
13. *Eggers F., Funck Th.* Ultrasonic measurements with milliliter liquids samples in the 0.5–100 MHz range // *Rev. Sei. Instr.* 1973. V. 44. P. 969–978.
14. *Долгов В.В., Шевченко О.П.* Лабораторная диагностика нарушений обмена белков. Учебное пособие. М. 1997.
15. *Klemina A.* Ultrasonic method to define human serum blood total protein and protein fractions // *Abstracts of 5th Forum Acousticum in Acta Acustica (with Acustica).* May/June 2008. V. 94. Suppl. 1. P. 256.
16. *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.