

УДК 615.471:616-073.5.

© А. В. Ваганов

ПРИБОР ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭНДОТОКСИКОЗА НА ОСНОВЕ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Рассматривается турбидиметрический фотометр, позволяющий проводить исследование эндотоксикоза с использованием инфузорий по сыворотке крови человека. Описывается конструкция прибора на уровне блок-схемы. Приводятся экспериментальные зависимости.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование эндотоксикоза (Э), возможность определения его на ранней стадии, контроль течения заболевания представляют собой актуальную задачу в наши дни.

В последнее время многие специалисты по изучению Э используют биологический контроль и как его разновидность — биотестирование [1]. При этом тест-организмом могут быть экспериментальные животные (кролики, мыши и т. д.), культуры клеток, получаемые из тканей человеческого или животного происхождения, или простейшие.

Использование простейших, например, инфузорий для диагностики Э имеет неоспоримые преимущества: легкость культивирования, относительная дешевизна эксперимента, стабильность характеристик тест-объекта, безопасность культуры для человека.

В настоящее время известны два типа тест-реакций инфузорий, используемые при исследовании Э: угнетение прироста и гибель [2].

Тест-реакция "гибель инфузорий" является наиболее экспрессной, так как анализу подвергается неразведанная центрифугированная сыворотка крови больных и здоровых людей (контрольная группа). Сыворотка и культура инфузорий берется в соотношении 1:1. Оценивается время от начала воздействия сыворотки крови на клетки инфузорий до гибели (прекращения движения) последних. Максимальное время проведения опыта не превосходит 20 минут, что наряду с принципиальной простотой проведения свидетельствует о перспективности данного способа исследования Э. Однако широкое внедрение его в медицинскую практику сдерживают сложности реализации (микроскопный счет, секундомер), субъективный фактор и т. д.

Существующий турбидиметрический измеритель концентрации инфузорий "Биотестер" не может быть применен для исследования Э, т. к. в нем не учтены оптические и физико-химические

особенности сыворотки крови, отсутствует адаптация инфузорий к солевому составу сыворотки, используется слишком большой объем тестируемой пробы (2 мл), отсутствует термостатирование пробы при измерении, недостаточно обнаруживающая способность прибора к инфузориям малых размеров (например, *Tetrahimena rugiformis*).

Все вышеизложенное послужило основанием для создания прибора контроля токсичности сыворотки крови, который позволит автоматически производить оценку изменения концентрации живых (подвижных) инфузорий в исследуемой биожидкости.

ПРИНЦИП ИЗМЕРЕНИЯ

Для регистрации изменения концентрации живых инфузорий в исследуемой среде предпочтение отдано турбидиметрическому способу, т. к. взвесь инфузорий как крупных частиц в оптически "мягкой" среде имеет сжатую вперед индикатрису рассеяния. Поэтому, с одной стороны, взвесь рассеивает малый поток излучения под углом 90 градусов к оси источника излучения, с другой стороны, проходящий через частицу поток излучения уменьшает величину экстинкции взвеси. При нефелометрической схеме построения прибора необходимо использовать методы фотометрии малых потоков, что неизменно приводит к усложнению конструкции [3].

Взвесь инфузорий образует хаотически подвижную, рассеянную взвесь прозрачных эллипсоидальных тел размерами 30–300 мкм.

Для описания взаимодействия светового излучения с инфузориями лучше всего подходит модель геометрической оптики. Она применима, если $\rho > 100$, где $\rho = 2\pi r / \lambda$. Здесь r — диаметр частицы, λ — длина волны светового излучения. Существенной качественной особенностью ослабления света частицами с большим $\rho = 2\pi r / \lambda$ (или большим радиусом r) является появление

вместе с рассеянием света в малых углах эффекта дифракции Фраунгофера в параллельных лучах. Фронт плоской волны образует "тень" за частицей и при условии $r \ll R$ (R — расстояние от частицы до приемника) дифракционную картину, такую же какую создает отверстие радиуса r .

При работе с сывороткой крови в оптическом диапазоне возникает увеличение поглощения и рассеяния светового излучения по сравнению с водной средой вследствие возможной большой концентрации липопротеидов в исследуемой биожидкости (визуально это оценивается по степени ее мутности), а также возможности гемолиза сыворотки (полного или частичного разрушения гемоглобина), из-за чего она приобретает красный цвет.

Возможным диапазоном для регистрации изменения концентрации подвижных инфузорий при исследовании токсичности сыворотки крови является ближний инфракрасный спектр (720–1100 нм), т. к. значение оптической плотности в нем минимально (рис. 1). Оптимальной длиной волны для проведения измерений считается $\lambda = 810$ нм: поглощение оксигемоглобином (HbO_2) и дезоксигемоглобином (HbR) одинаково [4].

Сыворотка крови является оптически более сложной средой, чем водная. Компоненты с наибольшими размерами до 600 нм оказывают влияние в виде помехи на формирование информационного сигнала из-за перемещения их в кювете конвекционными потоками. Наиболее полно ослабление и рассеяние света элементами сыворотки крови описывает теория Ми, учитывающая вторичные волны, распространяющиеся от частицы-осциллятора, на которую воздействует фронт плоской волны излучения.

Исследуемая среда (взвесь инфузорий и сыворотка крови) может быть промоделирована взвесью малых подвижных частиц (инфузории) в среде очень малых частиц различной концентрации и размеров (элементы сыворотки крови).

Увеличенное значение вязкости сыворотки крови по сравнению с водной средой приводит к некоторому снижению начальной скорости перемещения простейших. Однако это не влияет на конечный результат измерения (время полной остановки всех инфузорий в пробе).

С целью уменьшения влияния солевого состава сыворотки крови (в частности, NaCl) на простейших, что может привести к росту погрешности измерения, в проводимых экспериментах в качестве тест-объекта используются инфузории, адаптированные к 0.7 % раствору NaCl .

Уменьшение объема тестируемой пробы с 2 до 0.3 мл позволило не только сократить расход

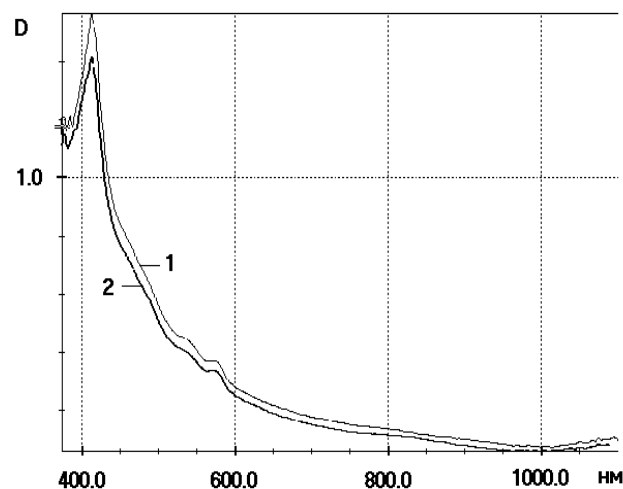


Рис. 1. Зависимость оптической плотности (D) от длины волны в исследуемом растворе (сыворотка крови + среда Лозин-Лозинского 1:1) на примере одной из сывороток (1). Та же сыворотка, но инактивированная — 2

биоматериала, но и сформулировать условия максимизации потока частиц (инфузорий) через контролируемый объем (датчик).

Для термостатирования кюветного модуля с исследуемой средой выбрана стандартная температура для медицинских исследований — 30 градусов.

Для работы с инфузориями малых размеров произведено повышение обнаруживающей способности прибора. По сравнению с "Биотестер" интенсивность импульсного излучения светодиода увеличена в 5 раз, общее усиление — в 2.5 раза.

ОПИСАНИЕ КОНСТРУКЦИИ ПРИБОРА

Оптоэлектронный датчик представлен на рис. 2. Оптическое излучение, создаваемое светодиодом СД, проходит через кювету с исследуемой пробой и проецируется на фотодиод ФД. Полученный сигнал изменения освещенности фотодиода преобразуется в электрический сигнал и усиливается фотоусилителем ФУ. Электрический сигнал на выходе датчика имеет переменную составляющую, т. к. учитываются как входящие в контролируемую зону, так и выходящие из нее инфузории из приграничных слоев ϵ . Объем приграничных слоев можно вычислить по формуле

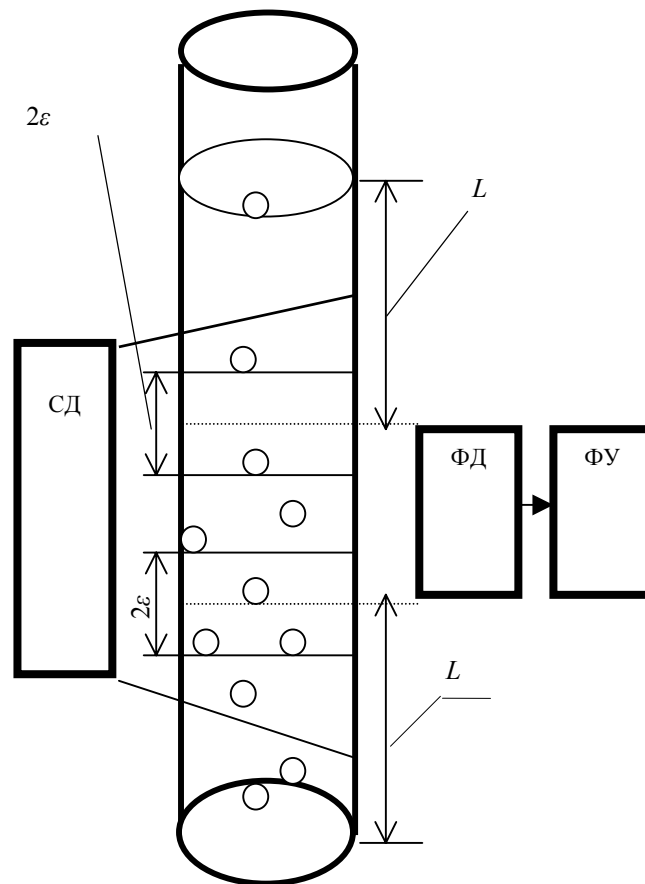


Рис. 2. Модель оптоэлектронного датчика. СД — светодиод, ФД — фотодиод, ФУ — фотоусилитель, 2ε — высота приграничных слоев, L — расстояние от измерительного объема до границ сред

$$V = 2L_f \cdot \varepsilon \cdot d,$$

где L_f — периметр датчика, ε — толщина приграничных слоев, d — расстояние между светодиодом и фотодиодом.

Перемещаемые конвекционными потоками микрочастицы сыворотки крови создают сигнал помехи или сигнал-фон. Характер движения инфузорий дискретно-хаотичный, состоящий из прямолинейных перемещений со случайной сменой направлений. Поэтому для потока дискретно движущихся частиц

через поверхность датчика (инфузории и микрочастицы сыворотки крови) подходит модель пуассоновских потоков. Полезный сигнал на выходе датчика имеет вид:

$$U(t) = n_i \cdot U_0 \cdot f(t - t_i).$$

Здесь n_i — число элементарных импульсов, возникающих за достаточно малый интервал времени δt ; t_i — случайный момент появления импульса, имеющего форму, описываемую функцией

$$f(t - t_i) = \begin{cases} 0, & \text{нпу } t < t_i; \\ \pm 1, & \text{нпу } t \geq t_i. \end{cases}$$

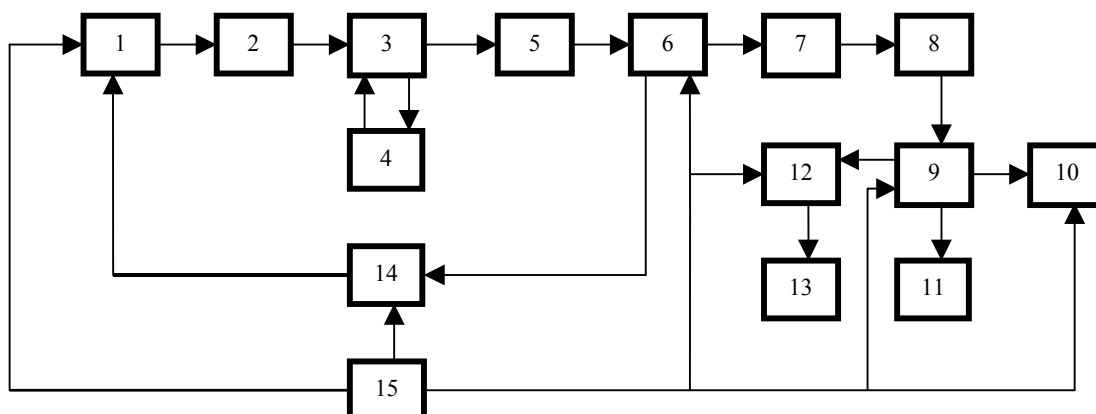


Рис. 3. Блок-схема измерителя токсичности сыворотки крови. 1 — усилитель, 2 — светодиод, 3 — кюветный модуль, 4 — блок термостабилизации, 5 — фотоусилитель, 6 — усилитель, 7 — фильтр, 8 — детектор, 9 — аналогово-цифровой преобразователь (АЦП), 10 — устройство для передачи измерительной информации в компьютер, 11 — блок индикации концентрации инфузорий, 12 — устройство отсчета времени, 13 — блок индикации минут, 14 — схема компенсации яркости светодиода, 15 — блок генератора

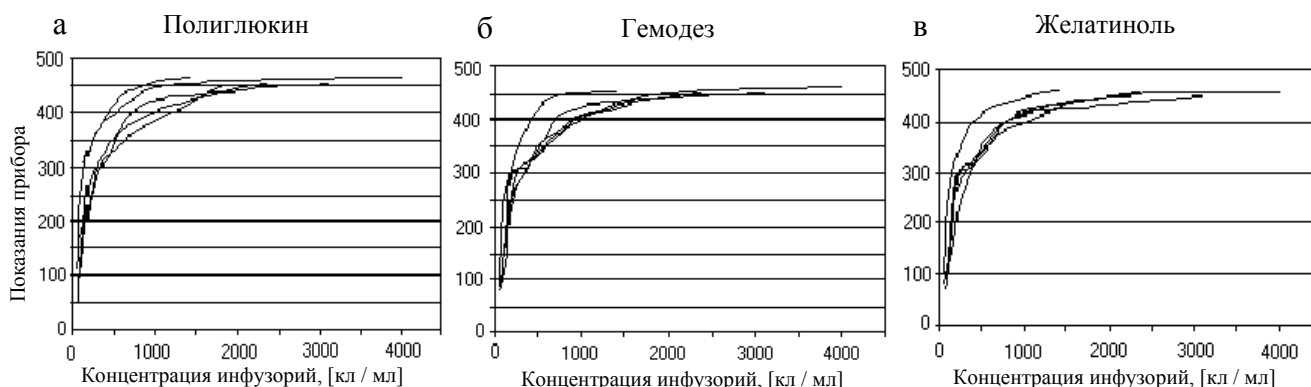


Рис. 4. Калибровочные кривые по заменителям сыворотки крови

Случайные величины n_i и t_i считаются независимыми.

Блок-схема измерителя представлена на рис. 3.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе проведенных экспериментов построены калибровочные кривые (зависимость показаний прибора от концентрации живых инфузорий) с использованием заменителей сыворотки крови рис. 4. По этим кривым произведен выбор оптимальной рабочей концентрации взвеси инфузорий ($C \approx 500$ кл/мл), обоснованной относительно ли-

нейной зависимостью показаний прибора от концентрации живых клеток в кювете. Выработан алгоритм проведения исследований.

Произведены пробные замеры, которые показали хорошую повторяемость результатов измерений (времени гибели), а также подтвердили корреляцию данного метода с методом оценки токсичности сыворотки крови по М.Я. Малаховой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захаров И.С., Пожаров А.В. Биотехнические методы охраны окружающей среды: Учебн.

- пособие. СПб.: Изд-во СПбГЭТУ "ЛЭТИ", 2001. 80 с.
2. Виноходов Д.О., Виноходов В.О., Гипан Л.И., Земляникина Т.А. Использование инфузорий в исследовании внутренних сред высших организмов // Архив ветеринарных наук. 1999. Т. 1, № 3. С. 551–557.
 3. Захаров И.С. Метод и аппаратура для измерений концентраций инфузорий в медико-экологических исследованиях. Автореф. дис. ... канд. тех. наук. СПб., 1996. 16 с.
 4. Кренс Е.М. Оксигемометрия: техника, применение в физиологии и медицине. Л.: Изд-во Медгиз, 1959. 222 с.
- Санкт-Петербургский государственный университет телекоммуникаций им. проф. М.А. Бонч-Бруевича*
- Материал поступил в редакцию 2.07.2003.

BIOASSAY DEVICE FOR INVESTIGATION OF ENDOTOXICOSIS

A. V. Vaganov

St. Petersburg State University of Telecommunications named after Prof. M.A. Bonch-Bruевич

A new turbidimetric photometer for endotoxiosis investigation is described. The device is based on the infusoria bioassay in human serum. The flow diagram of the device and experimental results are presented.