УДК 312.1+612.46

© 2005 р. С.Г. Гумінецький, А.В. Мотрич

Чернівецький національний університет ім. Ю.Федьковича, Чернівці

СПЕКТРОМЕТРИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОМЕДИЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

Приведені узагальнені результати спектрофотометричних досліджень крові, плазми крові, сечі, легеневого конденсату та їх органічних складових як здорових людей (донорів), так і пацієнтів з різними запально-деструктивними захворюваннями, які отримані на кафедрі оптики і спектроскопії Чернівецького національного університету при сприянні співробітників відповідних кафедр Буковинського державного медичного університету в період з 1998 по 2004 роки. Описані основні особливості розроблених при цьому оптичних методів діагностики деяких захворювань та принципи їх використання в клінічній практиці.

Resulted generalized results of spectrophotometric researches of blood, plasma of blood, urine, pulmonary condensate and their organic constituents both healthy people (donors) and with different passionately-destructive diseases which are got on a department optics and spectroscopies of the Chernivtsi national university at the assistance of employees of the proper departments of the Bukovina state medical university in a period with 1998 for 2004 years. Described basic features of the developed here optical methods of diagnostics of some diseases and principles of their use in clinical practice.

Вступ

Основними органічними речовинами, які використовуються в медицині для аналізу різних захворювань людини є кров та сеча. В останні роки з цією метою все частіше використовується також легеневий конденсат. Всі вони є складними для досліджень середовищами. Це зумовлено багатокомпонентністю вміщуваних у них органічних речовин і нестабільністю їх концентрацій протягом доби (особливо для сечі), залежно від індивідуума, його стану, продуктів харчування тощо. Біофізичними методами встановлено діапазон концентрацій та кількісні характеристики формених елементів крові, а також кожної з основних органічних складових сечі та плазми крові здорової людини (в нормі). Що стосується легеневого конденсату, то достовірних, загальноприйнятих даних з цього питання немає. Крім того, відсутні детальні спектрофотометричні дослідження вказаних середовищ, хоча відомо, що електронні спектри їх поглинання знаходяться в спектральному інтервалі $\lambda<320$ нм, а для формених елементів крові в області $\lambda<620$ нм. [1,2].

В даній роботі розглядаються деякі результати спектрофотометричних досліджень вказаних середовищ як для здорових людей (як контрольні), так і при різних захворюваннях у процесі лікування з метою використання отриманих результатів для виявлення активності процесу і контролю за ефективністю лікування.

Об'єкти та методика досліджень

Зразки крові та її складових, сечі та легеневого конденсату надавалися відповідними кафедрами Буковинського державного медичного університету. Вимірювання спектрів поглинання нерозсіюючих розчинів проводилися з використанням закону Бугера-Бера на спектрофотометрії СФ-46 за методикою, описаною в [3,4], а для оптично неоднорідних середовищ використовувався спектрофотометр СФ-4А з фотометричною сферою за методикою [5], яка дозволяє врахувати розсіяння світла. Крім того, проводилося порівняння спектрів поглинання одних і тих же об'єктів, отриманих обома вказаними методами, що дає можливість оцінити вплив розсіяння на дійсні спектри поглинання досліджуваних середовищ. Вимірювався коефіцієнт пропускання τ, а оптична густина у випадку одноразового розсіяння розраховувалася:

$$D = -\lg\tau = (\alpha+\sigma)cl = \\ = \alpha cl + \sigma cl = D_{п} + D_{р}, \quad (1)$$

де α, σ – відповідно показники поглинання і розсіяння, а c – концентрація часток у середовищі, l – його товщина, $D_{п}$ – оптична густина за рахунок поглинання, $D_{р}$ – відповідно за рахунок розсіяння. При цьому кров та її складові і сеча розріджувалися дистильованою водою в межах співвідношень 1:100–1:120.

Досліди підтверджують, що вибране розрідження оптимальне для забезпечення максимальної точності вимірів [6]. Досліджувані розчини поміщали у кварцову кювету товщиною l=1 см.

Кров та її складові

Фізико-хімічні властивості крові як складного біофізичного об'єкта частково описані в [4], характерні спектри поглинання основних її складових приведені на рис. 1. Крива 1 ілюструє типовий графік спектральної залежності оптичної густини $D_п$ для плазми крові здорової людини, криві 2, 3, 4 – відповідно, для лейкоцитів, тромбоцитів та еритроцитів у плазмі крові. Видно, що в спектрі поглинання плазми є два максимуми: короткохвильовий при λ=225-230 нм і довгохвильовий при λ=278-280 нм. Його вигляд визначається основними органічними складовими плазми: білками-альбумінами і глобулінами, спектри поглинання яких приведені на рис. 2 [3]. Порівнюючи їх з кривою 1 на рис. 1, бачимо, що короткохвильовий максимум зумовлений як поглинання альбумінів, так і глобулінів, а довгохвильовий в основному поглинанням глобулінів.

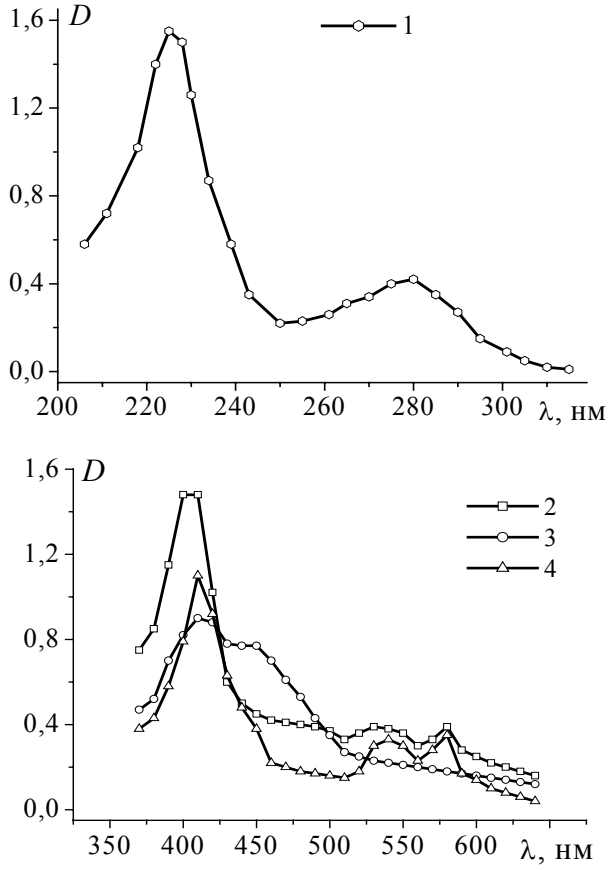

Рис. 1. Типові графіки спектральної залежності плазми крові здорової людини (1) та для лейкоцитів (2), тромбоцитів (3) та еритроцитів (4)

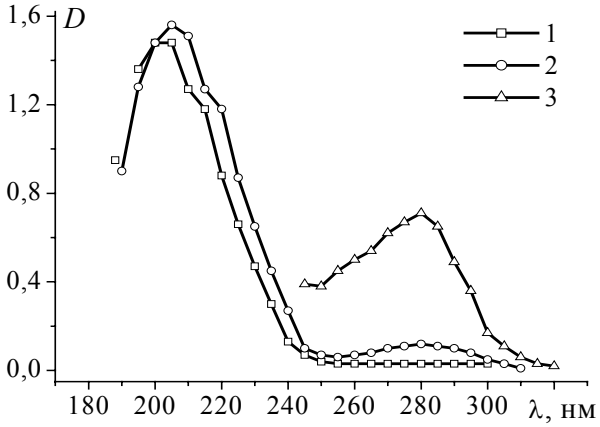

Рис. 2. Спектральна залежність оптичної густини D: альбуміна, концентрація 12 мг% (1), глобуліна, концентрація 12 мг% (2), глобуліна, концентрація 100 мг% (3)

Спектри поглинання білків у свою чергу визначаються спектрами поглинання амінокислот, що входять до їх структури. Відомо [1,7], що всі двадцять дві амінокислоти, які складають структуру білків плазми крові, мають максимум у спектрі поглинання в області λ=190-210 нм і тільки три з них (тирозін, триптофан і фенілаланіну) – в області λ=260-280 нм. Це означає, що три останні в альбумінах відсутні. Оскільки в області λ>320 нм білки й амінокислоти не поглинають [1,2], то це означає, що в цій області на величину D і характер спектра поглинання крові повинні впливати форменні елементи (рис. 1, криві 2-4).

У спектральному інтервалі λ=370-640 нм для лейкоцитів характерним є наявність однієї досить розмитої смуги поглинання з максимумом при λ=418 нм (крива 2). Спектри поглинання еритроцитів і тромбоцитів дуже потрібні: основний, найбільш інтенсивний максимум при λ=415 нм і два невеликих – один в області λ=540 нм, а другий при λ=580 нм. Зрозуміло, що спектр поглинання крові в цілому повинен виступати як суперпозиція вказаних вище чотирьох спектрів основних її складових, що ілюструється рис. 3. Тут наведено два спектри, отримані різними методами: крива 1 на сферичному фотометрі, що згідно з формулою (1) відповідає значенням $D_п$, а крива 2 на Сф-46, що відповідає значенням $D=D_п+D_р$. Видно, що в області λ>600 нм виміряні класичним методом значення оптичної густини зумовлені виключно розсіянням на оптичних неоднорідностях крові. Даний фактор використаний при розробці оптичного методу визначення часу тромбоутворення у плазмі крові [8,9] та дослідженні динаміки згортання крові. Він базується на визначенні зміни величин Др тромбоцитарної плазми і плазми без тромбоцитів для лазерної довжини

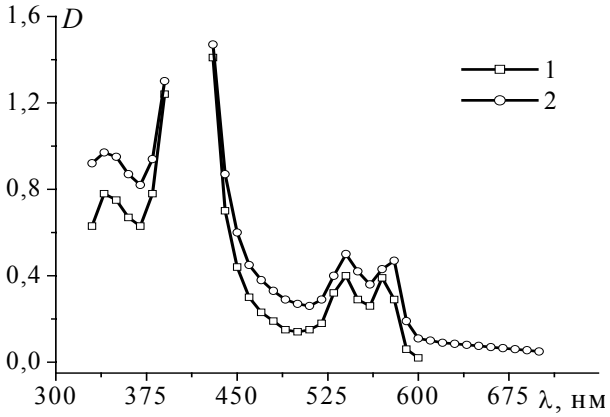

Рис. 3. Спектри поглинання цільної крові, отриманої: на сферичному фотометрі (1), класичним методом (2)

хвилі λ=633 нм протягом певного часу при доливанні до неї дозованої кількості розчину $CaCl_2$ або тромбіну людини.

Сеча та її складові

Відомо [10], що в сечі здорової людини в нормі є сечовина (концентрація *c*=1500-2000 мг%), сечова кислота (*c*=60-100 мг%), креатинін (*c*=70-150 мг%), біля 15 вільних амінокислот в невеликих кількостях (їхня сумарна концентрація *c*=60-80 мг%), що складає 2-2,5 % від її маси; 96% сечі – вода і 1,5 -2 % розчинені в ній неорганічні солі. Серед амінокислот найбільший вклад в поглинання вносять: тирозин, гліцин та гістидин [6,11]. Білки в сечі здорової людини відсутні [10]. Таким чином, спектри поглинання сечі в нормі визначаються шістьма органічними складовими: сечовиною, сечовою кислотою, креатиніном, тирозином, гліцином і гістидином. При цьому основними є сечовина, сечова кислота і тирозин [11], спектри поглинання яких приведені на рис. 4. Видно, що в їх спектрах поглинання є по три максимуми: короткохвильовий при λ=195-200 нм, середньохвильовий при λ=225-235 нм і довгохвильовий при λ=270-275 нм (для сечовини і тирозину), λ=290 нм (для сечової кислоти). Останні відрізняються між собою не тільки розташуванням в спектрі, але й інтенсивністю поглинання: для сечової кислоти величина екстинції ε=0,51(см·мг%)$^{-1}$, для сечовини ε=0,125 (см·мг%)$^{-1}$, для тирозину ε=0,074(см·мг%)$^{-1}$ [11]. Зрозуміло, що УФ-спектр поглинання сечі в цілому отримується шляхом сумування оптичних густин вказаних вище шести органічних компонент і має вигляд, зображений на рис. 5. В ньому є два максимуми: короткохвильовий при λ 235-240 нм і довгохвильовий при λ=290-295 нм. В [11] показано, що основний внесок у значення *D* в короткохвильовому максимумі вносить сечовина (на решту органічних складових припадає 1,5-1,7 % від

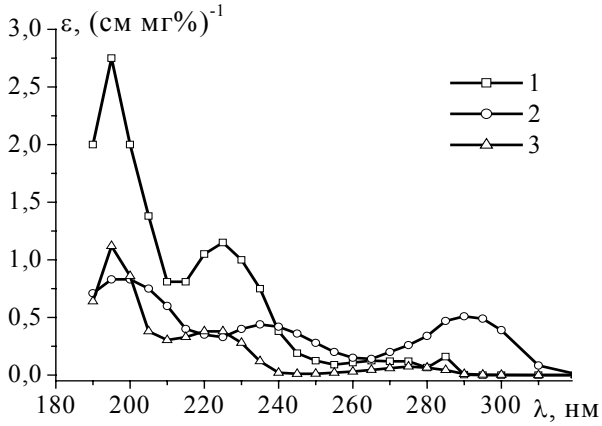

Рис. 4. Значення екстинкції для основних органічних складових сечі: 1 – сечовина, 2 – сечова кислота, 3 – тирозин

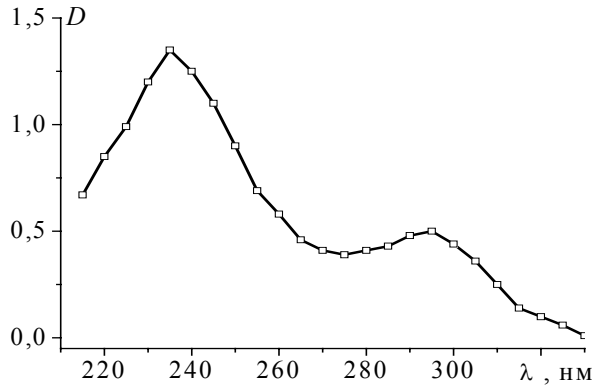

Рис. 5. Типовий спектр поглинання сечі донорів в концентрації 1: 100

сумарної оптичної густини), в той час як довгохвильовий максимум визначається в основному поглинанням сечової кислоти.

Оптичні властивості сечі, плазми крові і легеневого конденсату хворих туберкульозом

Для оцінки реального внеску сечової кислоти в сумарну оптичну густину сечі в області λ>250 нм пронормуємо спектр поглинання для кожного конкретного випадку на значення *D* у максимумі, що знаходиться при λ=235-240 нм. Аналогічну процедуру застосовуємо і при аналізі спектрів поглинання плазми крові. Щоб оцінити співвідношення між собою альбумінів і глобулінів пронормуємо також її спектральне поглинання на значення *D* у короткохвильовому максимумі.

На рис. 6 (для сечі) і на рис. 7 (для плазми крові) наведено нормовані спектри поглинання трьох хворих на легеневу форму туберкульозу до лікування в порівняні з контрольними спектрами поглинання (крива 1) для здорової людини. Видно, що як для сечі, так і для плазми крові відношення D/D_{max} у спектральному інтервалі λ=265-295 нм для хворих туберкульозом пацієнтів є значно вище в порівнянні з контролем.

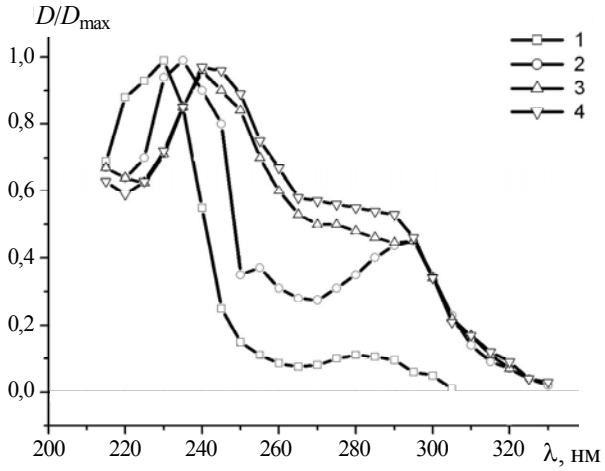

Рис. 6. Спектри поглинання добових проб сечі пацієнтів: В - (2), С - (3), К - (4), контроль – (1)

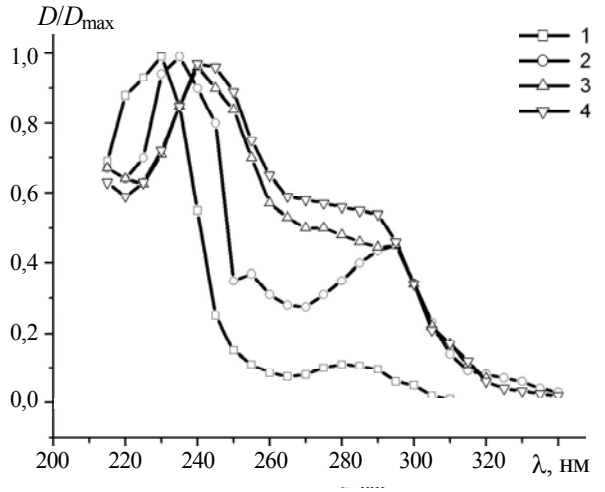

Рис. 7. Спектри поглинання плазми крові пацієнтів: В - (2), С - (3), К - (4), контроль – (1)

Для сечі це означає , що для хворих туберкульозом пацієнтів у добових пробах сечі або підвищується концентрація сечової кислоти, або підвищується частка в сумарному її вмістові сечовини і сечової кислоти. У випадку плазми крові це пояснюється тим, що для хворих туберкульозом пацієнтів порушується значення альбумін-глобулінового коефіцієнта: для здорових людей його значення знаходиться в межах 1,8–2,0, а для хворих туберкульозом падає, що свідчить про зростання частки глобулінів у сумарному вмісті білків в плазмі.

При цьому видно, що для різних пацієнтів в день їх поступлення в лікарню ці ефекти виражені різною мірою: криві 2,3 і 4 відрізняються між собою. Спектри поглинання сечі та плазми крові хворих на туберкульоз легень у процесі їх лікування дозволяють проводити дослідження через певні інтервали, контролюючи зміну оптичної густини [12]. З метою узагальнення результатів за великою кількістю пацієнтів достатньо порівняти значення D/D_{max} для однієї найбільш характерної довжини хвилі. Виходячи з приведених вище графіків, вибираємо для плазми крові λ=280 нм, а з метою узагальнення результатів за великою кількістю пацієнтів достатньо порівняти значення D/D_{max} для однієї найбільш характерної довжини хвилі. Виходячи з наведених вище графіків, вибираємо для плазми крові λ=280 нм, а з метою узагальнення результатів по великій кількості пацієнтів достатньо порівняти значення D/D_{max} для однієї найбільш характерної довжини хвилі.

Наведені в таблицях дані по групі більше 10 пацієнтів говорять про те, що в більшості випадків значення D/D_{max} у процесі лікування зменшуються, наближаючись до контрольних. Проте після лікування впродовж 5-ти місяців цей показник не у всіх досягає контрольних значень. Це свідчить про те, що необхідне для цих пацієнтів більш тривале лікування. Крім того, з таблиць видно, що зменшення значення D/D_{max} різне для різних пацієнтів, що є індивідуальною особливістю кожного з них, або говорить про різну ефективність лікування. Деякі результати спектрофотометричних досліджень легеневого конденсату людини в спектральному інтервалі 220<λ<360 нм наведені на рис. 8 (для здорової людини) і на рис. 9 (для хворої туберкульозом). Порівнюючи між собою відповідні криві рис. 8 і рис. 9, бачимо, що в цьому спектральному інтервалі значення D у хворих туберкульозом пацієнтів істотно нижчі ніж у здорових. Виходячи з літературних даних [13,14], можна стверджувати, що сумарний вміст біологічно активних речовин, у тому числі і вільних амінокислот, у легеневому конденсаті хворих туберкульозом пацієнтів значно менший, ніж у здорової людини. Це має місце в усіх випадках із досліджених 9-ти хворих і 10-ти здорових пацієнтів [15]. Крім того, із рис. 8 випливає, що значення D, отримані класичним методом (крива 1) вищі від значень, отриманих на сферичному фотометрі (крива 2), в той час як для хворих на туберкульоз пацієнтів спектри поглинання в обох випадках практично збігаються (рис. 9). Це свідчить про наявність у легеневому конденсаті здорових людей компонент, які спричиняють розсіяння, чого не спостерігається в легеневому конденсаті хворих пацієнтів.

Таблиця 1. Значення D/D_{max} сечі хворих на туберкульоз легень для λ=285 нм (контрольне значення 0,1)

Час обстеження	Хворі											
	К.	В.	У.	Д.	К1.	Д1.	С.	К2.	Т.	В1.	Ч.	М.
До лікування	0,48	0,44	0,38	0,43	0,46	0,44	0,42	0,38	0,52	0,46	0,33	0,33
Після одного місяця лікування	0,42	0,39	0,34	0,38	0,44	0,26	0,28	0,36	0,36	0,26	0,3	0,39
Після п'яти місяців лікування	0,43	0,26	-	-	0,27	-	-	0,3	-	-	-	-

Таблиця 2. Значення D/D_{max} плазми крові хворих на туберкульоз легень для λ=280 нм (контрольне значення 0,26)

Час обстеження	Хворі										
	К.	В.	У.	Д.	К1.	Д1.	С.	К2.	С1.	В1.	Ч.
До лікування	0,44	0,48	0,45	0,46	0,42	0,42	0,44	0,47	0,53	0,42	0,43
Після одного місяця лікування	0,37	0,44	0,37	0,32	0,39	0,33	0,37	0,34	0,44	0,37	0,43

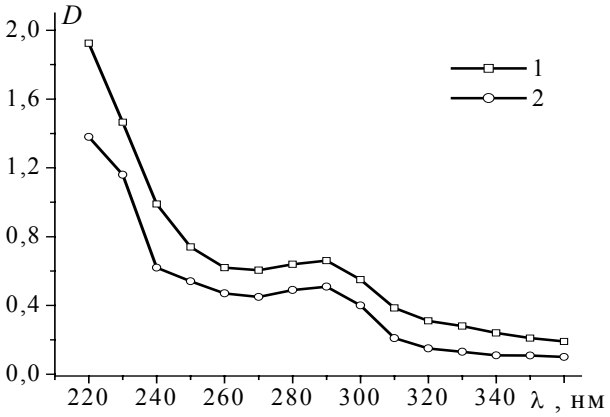

Рис. 8. Спектри поглинання легеневого конденсату здорових пацієнтів, отримані класичним методом (1) і на сферичному фотометрі (2)

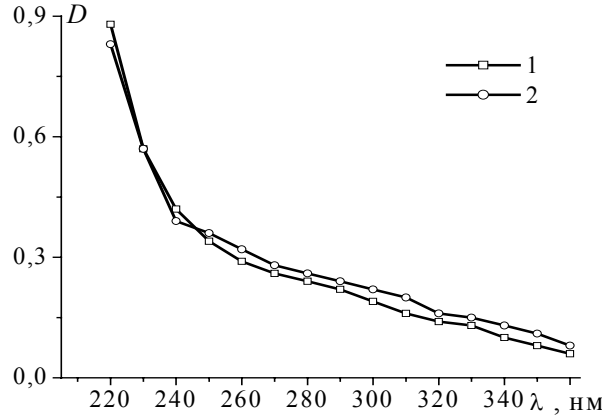

Рис. 9. Спектри поглинання легеневого конденсату хворих на туберкульоз пацієнтів, отримані класичним методом (1) і на сферичному фотометрі (2)

Спектри поглинання плазми венозної крові у хворих на гострі запальні процеси органів черевної порожнини.

Досліджувалися спектри поглинання плазми венозної крові хворих віком від 17 до 72 років, які поступали в Чернівецьку обласну лікарню з підозрою на гострий апендицит (32 осіб), гострий холецистит (51 особа), кишкову непрохідність (14 осіб), гострий панкреатит (15 осіб), виразку шлунка (12 осіб). Контролем служила плазма крові, отримана у 15 здорових донорів. У всіх випадках плазма розріджувалася дистильованою водою у співвідношенні 1:100. Як приклад на рис. 10 приведені деякі результати досліджень. Тут крива 1 – усереднений графік спектральної залежності для плазми донорів; крива 2 – типовий спектр поглинання плазми крові хворих на деструктивний апендицит і крива 3 – відповідно на деструктивний холецистит. Видно, що в області λ=280 нм при розвитку гострих хірургічних захворюваннях органів черевної порожнини спостерігається зростання оптичної густини плазми крові порівняно із контролем, в той час як короткохвильовий максимум не є інформативним. Аналогічні зміни виявленні у хворих з некрозом кишки, гострим панкреатитом і при перфоративній виразці шлунка. При капторальних формах апендициту і холециститу, у хворих без некрозу кишки, кровоточивій виразці шлунку і загостреннях гастриту параметри оптичної густини не перевищували контрольних.

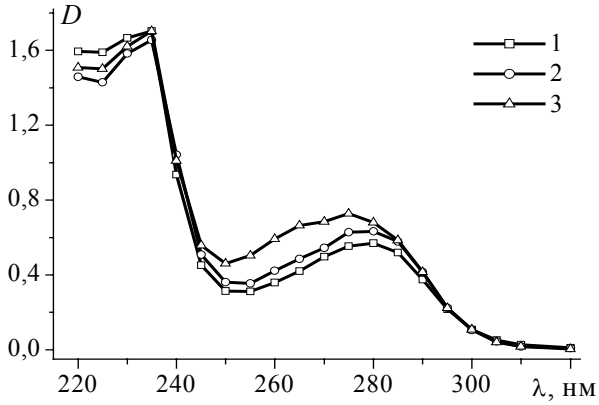

Рис. 10. Спектри поглинання венозної крові; 1-контрольні; 2-деструктивний апендицит; 3-деструктивний холецистит

Висновки

На основі отриманих результатів по спектрах поглинання крові, сечі та їх складових, а також по легеневому конденсату людини можна зробити такі висновки:

- спектрофотометричний метод дослідження оптичних властивостей сечі та плазми крові може бути використаний у клінічній практиці лікування хворих туберкульозом легень як один із способів визначення активності процесу і контролю ефективності лікування;
- значення оптичної густини плазми венозної крові людини в області λ=280 нм використані як оптичний тест при розробці експрес-діагностики гострих загально-деструктивних захворювань органів черевної порожнини [16];
- розроблено оптичний метод визначення часу тромбоутворення у плазмі крові для різних типів реакцій тромбоутворення [9];
- встановлено кількісні критерії, що характеризують відмінність між оптичними властивостями легеневого конденсату здорових і хворих легеневою формою туберкульозу пацієнтів, які можуть бути використані в рутинній лабораторній практиці протитуберкульозних установ як один із способів діагностики захворювання на туберкульоз легень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Современные методы биофизических исследований / Под ред. А.Б. Рубина. – М.: Высшая школа, 1988.
2. *Демченко А.П.* Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. – Киев: Наукова думка, 1981.
3. *Пішак О.В., Гумінецький С.Г., Пішак В.П., Григоришин П.М.* Поглинаючі та різсіюючі властивості білків плазми крові і сечі // Буковинський медичний вісник. – 1998. – **2**, №1. – С.137-144.
4. *Гумінецький С.Г., Решеткін І.В., Григорашин П.М., Гнатюк І.Е.* Спектрофотометричні властивості білків і форменних елементів крові // Науковий вісник ЧДУ. Вип. 22: Інженерно-технічні науки. – Чернівці: ЧДУ, 1998. – С.61-69.
5. *Рвачев В.П., Гуминецкий С.Г., Сахновский Н.Ю., Смолинский Е.С., Тихоненко Т.И., Добров Е.Н.* Исследование поглощения вирусных суспензий на интегральном фотометре // ЖПС. – 1968. – №5. – С.844-850.
6. *Guminietsky S.G., Gayka O.R., Kokoshuk G.I., Grigorishin P.M.* Absorption spectra of the main organic components of haulm urine in the absence of proteins // Proc. Spie. – 1999. – **3904**. – P.579-589.
7. *Рубин А.Б.* Біофізика. – М.: Высшая школа,1987.
8. *Гумінецький С.Г., Котик Г.М., Кухарчук О.П.* Оптичний метод дослідження динаміки згортання крові // Науковий вісник ЧНУ. Вип.86: Фізика. Електроніка. – Чернівці: ЧНУ, 2000. – С.45-47.
9. Патент України. UA58370. Спосіб визначення тромбоутворення у плазмі крові / *Пішак В.П., Гумінецький С.Г., Григоришин П.М., Ломанець В.С.* // Бюл. №7, 2003.
10. *Лопаткин Н.А.* Урология и неврология. – М.: Медицина, 1990.
11. *Guminetsky S.G., Motrich A.V., Kuzjmin M.M.* absorbent and depressive peculiarities of man's lung condensed and its parts // Electronica. – 2004. – **8-9**. – P.125-126.
12. *Гумінецький С.Г., Ніцович Б.М., Мотрич А.В.* Ультрафіолетова спектрофотометрія плазми крові та сечі хворих туберкульозом // Науковий вісник ЧНУ. Вип. 201: Фізика. Електроніка. – Чернівці: ЧНУ, 2004. – С.12-15.
13. *Бестужева С.В.* Конденсат выдыхаемого воздуха как продукт нереспираторной функции лёгких // Сб. "Нереспираторная функция лёгких". – 1988. – С.62-67.
14. *Гончарова В.А., Доценко Е.К., Черный С.М.* Сравнительный анализ БАВ тканей лёгких и лёгочного конденсата // Сб. "Нереспираторная функция лёгких". – 1988. – С.30-32.
15. *Гумінецький С.Г., Мотрич А.В., Гараздюк І.В., Рослякова З.А.* Спектрофотометричні характеристики основних органічних складових сечі людини.// Науковий вісник ЧНУ. (В друці)
16. Патент України. UA 77018. Спосіб спектрофотометричної діагностики запально-деструктивних захворювань в черевній порожнині / *Полянський І.Ю., Ніцович Б.М., Гумінецький С.Г., Гринчук Ф.В., Бродовський С.П.* // Бюл. №4, 2004.