УДК 577.1 + 612.1

МЕТОДИКА И НЕКОТОРЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ *IN VIVO*

© 2004 г. **Н. И. Горская**

Саратовский государственный университет, Саратов
E mail: allagor@san.ru

Предложена методика спектроскопического исследования крови *in vivo* с целью диагностики. Приведены спектры поглощения и отражения различных образцов крови гематологических больных. Выполнен сравнительный анализ полученных спектров.

Коды OCIS: 170.1470, 170.4580.

Поступила в редакцию 23.12.2003.

Введение

По-видимому, нет ни одного заболевания, даже самого легкого, которое не нашло бы немедленного отражения в пространственной структуре крови, в этом "зеркале организма" [1]. И наоборот, отклонения от нормы в распределении частиц крови отражаются на состоянии всего организма. Изменение числа эритроцитов в единице объема резко влияет на стерическое расположение их в кровотоке, на физиологические отправления каждого эритроцита и всей их совокупности. Нормальная кровь обладает строго закономерным соотношением суммарных поверхностей и объемов и строго взаимным расположением эритроцитов в пространстве кровотока. На основании знаний значений концентрации и формы эритроцитов, скорости их перемещения в кровотоке или скорости оседания вне организма, связанных с геометрической формой специальных эритроцитных структур, ставятся диагнозы и прогнозы. Эти факты вынуждают глубже изучить физические параметры эритроцитов и геометрию их структурных ассоциаций и тем самым приблизить эмпирическое значение параметров крови к истинному.

В настоящее время при постановке диагноза и наблюдении за гематологическими больными основным методом является качественное и количественное исследование мазков костного мозга и крови, предварительно окрашенных стандартными способами [2].

В то же время одним из интенсивно развивающихся методов исследования и диагностики крови является оптическая спектроскопия крови *in vivo*, позволяющая получать данные при минимальном постороннем воздействии на организм.

В работе представлены данные по использованию спектроскопии крови в целях диагностики, проанализированы результаты сравнительных исследований спектров поглощения крови гематологических больных с целью выявления закономерностей изменений в спектрах в зависимости от вида болезни.

Методика исследований

Схема экспериментальной установки представлена на рис. 1. Экспериментальные исследования проводились с помощью универсального волоконно-оптического спектрометра LESA-7 *1*, подключенного к персональному компьютеру *2*. Толщина образцов крови составляла 220–240 мкм. Один из световодов *3* представляет собой волоконный световод с диаметром сердцевины 240 мкм и служит для подвода излучения к исследуемому образцу *4*. Световод *5* с диаметром сердцевины 400 мкм служит для сбора рассеянного объектом излучения. Измерения проводились в диапазоне длин волн 300–800 нм.

Для предотвращения гемолиза в качестве консерванта был использован изотонический раствор NaCl. К тому же NaCl тормозит оксигенацию гемоглобина [3], что способствует сохранности образцов. Консервант добавляется в количествах, соответствующих стандартным методикам. При хранении крови, разведенной изотоническим раствором, в спектрах поглощения не наблюдалось изменений в течение 4–5 дней при использовании цитрата натрия. Однако при применении цитрата натрия четвертые производные спектров, снятые через не-

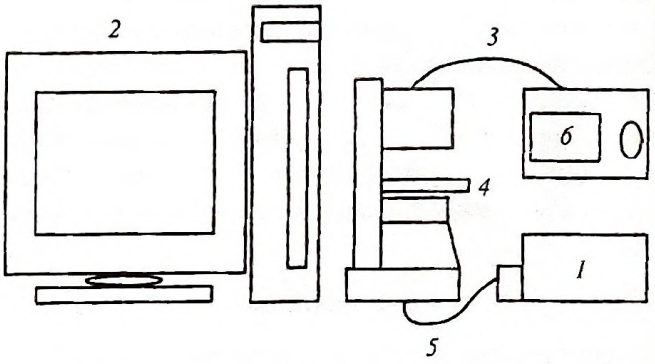

Рис. 1. Схема экспериментальной установки. *1* – универсальный волоконно-оптический спектрометр LESA-7; *2* – компьютер; *3, 5* – волоконные световоды; *4* – исследуемый образец; *6* – He–Ne-лазер.

сколько дней, отличались от производных исходных спектров, что говорит об изменениях в крови.

Несмотря на то что изотонический раствор должен исключать процесс гемолиза, для некоторых образцов спектры указывали на наличие разрушения клеток. Это можно объяснить явлением внутрисосудистого гемолиза, сопровождающего ряд гематологических заболеваний.

Контроль параметров крови спектральными методами

Авторы многих публикаций уделяют большое внимание спектральным характеристикам гемоглобина (рис. 2), который составляет приблизительно 98% массы белков цитоплазмы эритроцита [4]. Такое внимание обосновано тем, что основной вклад в спектры поглощения крови вносит именно гемоглобин. Поэтому в ходе диагностики заболевания контролируют изменения концентрации гемоглобина (количества эритроцитов), т. е. кровенаполнение, и формы спектров.

Такие изменения связаны в первую очередь с изменением отношения концентраций окси- и деоксигенированной форм гемоглобина, т. е. со степенью оксигенации гемоглобина. Кроме того, в изменение формы спектра вносят вклад другие вещества, содержащиеся в крови, – другие формы гемоглобина, билирубин и т. д. При наложении спектров окси- и деоксигемоглобина (рис. 3) обнаруживается ряд точек, в которых поглощение одинаково (изобестические точки). Очевидно, что величина поглощения света в таких точках не зависит от степени оксигенации гемоглобина, а является функцией только кровенаполнения. Как видно из приведенных данных, наибольшие отклонения наблюдаются в ближней инфракрасной области, где поглощение мало и, следовательно, слабые изменения других параметров (например, рассеяния света) оказывают существенное влияние.

Представляет интерес также измерение поглощения крови в ближнем и среднем инфракрасном диапазонах. Несмотря на то что поглощение в этих диапазонах мало (рис. 3), свет с длинами волн в диапазоне 600–1200 нм глубоко проникает через кожу в ткани человека. В результате возможно измерение степени оксигенации крови *in vivo* [5], а также определение концентраций компонентов крови (глюкоза, холестерин и т. д.) [6]. Такие измерения могут применяться для диагностики заболеваний кожи, мозга, конечностей, раковых заболеваний, а также для определения концентраций хромофоров (гемоглобины) и классификации измеряемых объектов.

Рис. 2. Структура гема.

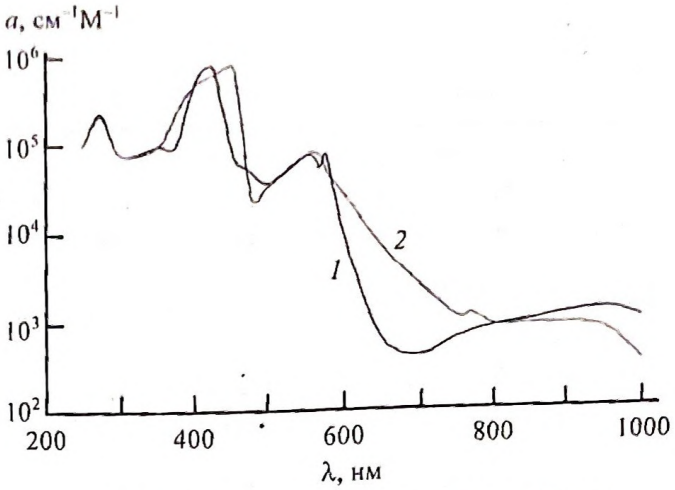

Рис. 3. Спектральные зависимости молярного коэффициента поглощения гемоглобина. *1* – оксигенированная форма, *2* – деоксигенированная.

Изменение оптических характеристик крови сказывается на спектрах диффузного отражения кожи *in vivo* [7]. Подобные изменения важны для диагностики. Например, при изменении концентрации глюкозы в крови изменяется показатель преломления плазмы крови, что в свою очередь изменяет величину коэффициента рассеяния света. Следовательно, по величине рассеяния света на эритроцитах можно определять концентрацию глюкозы в крови [8]. Такие измерения могут применяться при неинвазивной диагностике диабета [9].

Влияние заболеваний на спектры поглощения крови

Сравнение спектров поглощения периферической крови, взятой у различных больных, показало, что спектры различаются между собой. Различия наблюдаются как в интенсивности полос, так и в положении их максимумов. Для демонстрации отобраны спектры поглощения больных с диагнозами: острый миелобластный лейкоз (больной А); хронический неспецифический лимфаденит (больной Б); острый миелобластный лейкоз, стадия клинико-гематологических проявлений (больной В); острый лейкоз, эритромиелоз (больной Г); острый миелобластный лейкоз, острая фаза (больной Д); лимфо-

Результаты анализа крови для больных А, Б, В, Г, Д, Е

Показатели	А	Б	В	Г	Д	Е	Норма
Гемоглобин							
М.			89	121		58	130–160 г/л
Ж.	139	88			162		120–140 г/л
Эритроциты							
М.			2,6	3,4		2,0	$(4–5)\times10^{12}$/л
Ж.	4,5	3,0			4,5		$(3–4,7)\times10^{12}$/л
Тромбоциты	198	150	143		225	24	$(180–320)\times10^{9}$/л
Лейкоциты	4,4	2,5	1,1	3,1	6,1	6,3	$(4–9)\times10^{9}$/л
Базофилы		1			1		0–1%
Лимфоциты	4	25	45	47	40	26	19–37%
Моноциты	1	6	1		1	2	3–11%

гранулематоз (больной Е). Наряду со спектрами поглощения измерялись также и спектры отражения, однако их описание и анализ приводит к тем же результатам. В таблице приведены некоторые результаты анализов клеточного состава периферической крови.

По результатам измерений можно заключить следующее.

В спектрах крови, аналогично данным других авторов, четко выражены четыре полосы (рис. 4): широкая полоса поглощения около 340 нм; наиболее интенсивная полоса с максимумом при 410–415 нм; две полосы поглощения в желто-зеленой области видимого спектра – полоса с максимумом при 540–546 нм и менее широкая с более резкими краями полоса с максимумом при 575–577 нм.

Между последними двумя полосами поглощения находится минимум при 560–563 нм. В интервалах 600–660 и 456–486 нм наблюдаются слабые подъемы. Вследствие того что основным веществом крови, определяющим поглощение в видимой области спектра, является гемоглобин, наиболее логично связать данные полосы с полосами поглощения гемоглобина. Полосы с максимумами около 576 и 542 нм по виду и местоположению в спектре достаточно хорошо согласуются с α- и β-полосами спектра поглощения оксигемоглобина. Интенсивная полоса с максимумом при 410–415 нм соответствует полосе Соре, наблюдавшейся, в частности, в спектре HbO_2.

Таким образом, первичный анализ свидетельствует о том, что гемоглобин в исследуемых образцах в основном находится в оксигенированной форме, так как полосы поглощения в диапазоне 340–580 нм хорошо соотносятся с α-, β-, γ- и γ'-полосами поглощения оксигемоглобина. Неточное соответствие литературным данным может обусловливаться как естественными изменениями состава крови, так и наличием полос поглощения других веществ.

В полосы с максимумами при 410–415, 500, 542, 576 нм и подъем в диапазоне 600–660 нм могут давать вклад в той или иной степени следующие вещества: порфирины, метгемоглобин, гидропероксидазы, метгемальбумин. В области полосы Соре и в диапазоне 600–650 нм поглощают вердоглобины, в частности сульфгемоглобин. Карбоксигемоглобин дает вклад в α-, β- и γ-полосы. Деоксигемоглобин интенсивно поглощает в области полосы Соре и в диапазоне 555–560 нм.

Из перечисленных веществ наибольшую концентрацию в крови в физиологических условиях имеет оксигемоглобин, и, судя по экспериментально полученным спектрам, он дает наибольший вклад в поглощение видимого света. Метгемальбумин может появляться в плазме крови при внутрисосудистом гемолизе [10], но в небольших количествах. Порфирины содержатся в эритроцитах в малых концентрациях, и лишь протопорфирин накапливается при

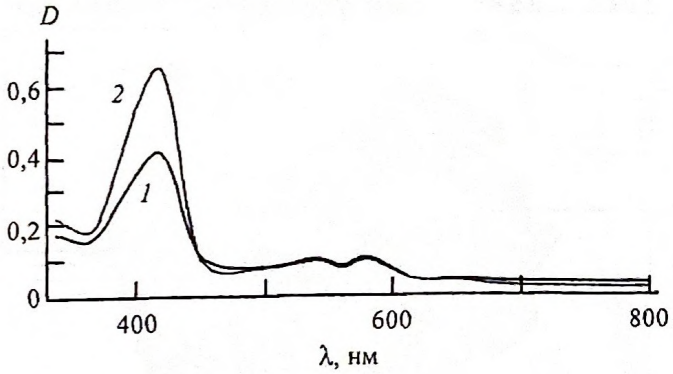

Рис. 4. Спектры поглощения крови больных А и Б. *1* – гипопластическая анемия (больной А, Hb 89 г/л); *2* – лимфаденит (больной Б, Hb 162 г/л).

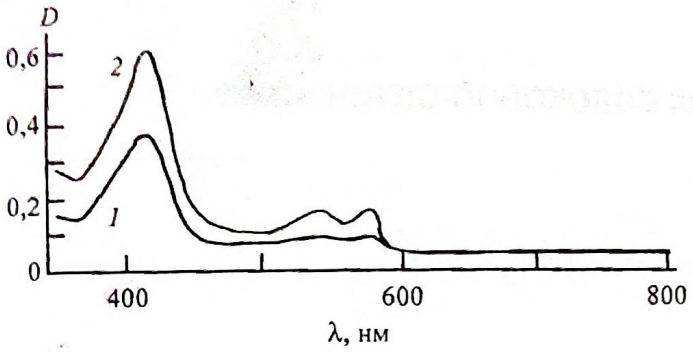

Рис. 5. Спектры поглощения крови больных Д, Е. *1* – острый миелобластный лейкоз, острая фаза (больной Д, Hb 139 г/л); *2* – лимфогранулематоз (больной Е, Hb 88 г/л).

недостатке железа. На спектры поглощения образцов должен оказывать влияние деоксигемоглобин, заметное количество которого обусловлено дыхательной функцией гемоглобина. Метгемоглобин всегда присутствует в крови в небольшой концентрации. Однако превышение нормы метгемоглобина наблюдалось рядом авторов при изучении различных форм анемий [10].

Несовпадение максимумов полосы Соре в спектрах крови различных больных говорит о различном соотношении концентраций поглощающих свет веществ в данных средах, а возможно, и различии в химическом составе. В частности, сдвиг максимума полосы Соре в коротковолновую область и сопутствующие изменения в интенсивностях других полос могут свидетельствовать о накоплении в данной среде метгемоглобина.

Часть сделанных выводов находит подтверждение при сравнении поведения спектров с картиной болезни. Так, повышение интенсивности поглощения в области 456–486 нм хорошо согласуется с превышением нормы концентрации билирубина плазмы.

Примером согласования спектральной картины с результатами лабораторного анализа крови может служить больная Д, у которой содержание гемоглобина и эритроцитов в крови не отклоняется от нормы (рис. 5).

В проведенных экспериментах с образцами крови гематологических больных наблюдалось хорошее совпадение спектров поглощения крови у выздоравливающих людей.

Анализ спектров по амплитуде и положению их компонентов, как правило, возможен при привлечении данных исследования биохимического и клеточного составов крови. Решение обратной задачи в настоящее время затруднительно и требует дальнейшего статистического набора данных. Из анализа спектров поглощения можно делать выводы только об отклонении состояния человека от нормы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Чижевский А.Л.* Структурный анализ движущейся крови. М.: АН. СССР, 1959. С. 8–13.
2. Большая медицинская энциклопедия. В 30 т. 3-е изд. М.: Советская энциклопедия, 1978–1988.
3. *Иржак Л.И.* Гемоглобины и их свойства. М.: Наука, 1975. 240 с.
4. *Шиффман Ф.Дж.* Патофизиология крови. М.: БИНОМ, 2001. С. 71–75, 380.
5. *Cysewska-Sobusiak A.* One-dimensional representation of light-tissue interaction for application in noninvasive oximetry // Opt. Engin. 1997. V. 36. № 4. P. 1225–1233.
6. *Budinova G., Volka K.* Utilization of infrared spectroscopy in the study of human tissues // Chem. Listy. 1996. V. 90. № 5. P. 433–443.
7. *Marbach R., Heise H.M.* Optical diffuse reflectance accessory for measurements of skin tissue by near-infrared spectroscopy // Appl. Opt. 1995. V. 34. № 4. P. 610–621.
8. *Maier J.S.* Possible correlation between blood glucose concentration and the reduced scattering coefficient of tissues in the near infrared // Opt. Lett. 1997. V. 19. № 24. P. 2062–2064.
9. *Bruulsema J.T.* Correlation between blood glucose concentration in diabetics and noninvasively measured tissue optical scattering coefficient // Opt. Lett. 1997. V. 22. № 3. P. 190–192.
10. *Кушаковский М.С.* Клинические формы повреждения гемоглобина. Л.: Медицина, 1968. 325 с.