



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Дальневосточный федеральный университет»

---

## **ШКОЛА БИОМЕДИЦИНЫ**

Департамент фундаментальной медицины

**Максаева Анна Геннадьевна**

## **МОДЕРНИЗАЦИЯ КОНЪЮНКТИВАЛЬНОГО МИКРОСКОПА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ БИЛИРУБИНА**

### **ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

по образовательной программе подготовки бакалавров  
по направлению 12.03.04 - «Биотехнические системы и технологии»

профиль «Медицинские информационные системы»

г. Владивосток  
2018





МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Дальневосточный федеральный университет»

**ШКОЛА БИОМЕДИЦИНЫ**  
**Департамент фундаментальной и клинической медицины**

**ЗАДАНИЕ**  
**на выпускную квалификационную работу**

Студентке Максаевой Анне Геннадьевне, группа Б7401

На тему Модернизация конъюнктивального микроскопа для определения уровня билирубина

Вопросы, подлежащие разработке (исследованию):

В теоретической части рассмотреть особенности физиологии обмена билирубина, методы обмена билирубина и его метаболитов, типы билирубина, существующие методы неинвазивного определения уровня билирубина, основы спектрофотометрии, показать преимущества разрабатываемого метода над транскутанной билирубинометрией.

В практической части произвести выбор конкретного физического метода, выбрать оптимальные рабочие длины волн, оценить поглощение различных составляющих глазного яблока для выбранных длин волн, определить допустимые параметры используемого излучения.

Основные источники информации и прочее, используемое для разработки темы: учебная, научная, техническая литература, статьи в журналах их списка ВАК.

Срок предоставления работы: « 05 » июня \_\_\_\_\_ 2018 г.

Дата выдачи задания: « 30 » октября \_\_\_\_\_ 2018 г.

Руководитель ВКР к.ф.-м.н., доцент  
(ученая степень, должность)

  
(подпись)

Полянский Д.А.  
(ф.и.о.)

Задание получил   
(подпись)

Максаева А.Г.  
(ф.и.о.)

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**  
 Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
 высшего профессионального образования  
**«Дальневосточный федеральный университет»**

**ШКОЛА БИОМЕДИЦИНЫ**

**Департамент фундаментальной медицины**

**Г Р А Ф И К**

подготовки и оформления выпускной квалификационной работы  
 студента (ки) Максаевой Анны Геннадьевны группы Б7401  
 (Фамилия Имя Отчество)

на тему Модернизация конъюнктивного микроскопа для определения уровня билирубина

№ п/п	Выполняемые работы и мероприятия	Срок выполнения	Отметка о выполнении
1	Выбор темы и согласование с руководителем	до 01 ноября	
2	Составление библиографии	до 20 ноября	
3	Составление плана работы и согласования с руководителем	до 01 декабря	
4	Разработка и представление руководителю: главы 1 главы 2 главы 3	до 01 марта	
		до 15 марта	
		до 01 апреля	
5	Подготовка и согласование с руководителем выводов и предложений, введения и заключения. Подготовка презентации работы	до 10 апреля	
6	Доработка ВКР в соответствии с замечаниями руководителя	до 15 апреля	
7	Получение отзыва научного руководителя и предзащита ВКР на заседании выпускающей кафедры	до 01 мая	
8	Доработка ВКР в соответствии с замечаниями, высказанными на предзащите, окончательное оформление	до 15 мая	
9	Передача работы на рецензирование	до 20 мая	
10	Получение рецензии, передача работы на кафедру	до 25 мая	
11	Завершение подготовки к защите (доклад, презентация в Power Point)	до 01 июня	
12	Защита ВКР в ГЭК	июнь	

Студент   
 (подпись)

Максаева А.Г.  
 (И.О. Фамилия)

« 25 » июня 2018 г.

Руководитель ВКР   
 (подпись)

Полянский Д.А.  
 (И.О. Фамилия)

« 25 » июня 2018 г.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Дальневосточный федеральный университет»

---

## ШКОЛА БИОМЕДИЦИНЫ

Департамент фундаментальной и клинической медицины

### ОТЗЫВ РУКОВОДИТЕЛЯ ВКР

на выпускную квалификационную работу студента(ки)

Максаевой Анны Геннадьевны

(фамилия, имя, отчество)

направление (специальность) \_\_\_\_\_

Биотехнические системы и технологии

\_\_\_\_\_ группа \_\_\_\_\_ Б7401

Руководитель ВКР

кандидат физико-математических наук,

Полянский Дмитрий Александрович

(ученая степень, ученое звание, и.о. фамилия)

На тему Модернизация конъюнктивного микроскопа для определения  
уровня билирубина

Дата защиты ВКР «25» \_\_\_\_\_ июня \_\_\_\_\_ 2018 г.

В дипломной работе решается нетривиальная исследовательская задача – разработка метода неинвазивного метода исследования содержания билирубина в крови с использованием данных, полученных со склеры глаза.

Характеризуя работу в целом необходимо отметить, что выбранная автором тема интересна в первую очередь тем, что имеет не только практическую, но и фундаментальную научно-исследовательскую значимость. Изложенная автором логика исследования и содержание глав позволяет глубоко и качественно раскрыть тему.

В вводной части и первой главе автор грамотно изложил постановку задачи, подвел биофизическую базу под решение поставленной задачи, на основе имеющихся литературных данных оценил возможность получения спектров поглощения билирубина с поверхности глазного яблока.

Во второй главе рассмотрены уже имеющиеся приборы для исследования уровня билирубина в крови, рассмотрены использующиеся спектрофотометрические методики, выбрана оптимальная, соответствующая поставленной задаче.

Как грамотного исследователя автора характеризует рассмотрение и анализ различных спектрофотометрических методик, изучение принципов работы уже использующихся приборов для определения уровня билирубина, и создание оригинального подхода, реализуемого на базе разработанного ранее в ШБМ прибора для конъюнктивальной микроскопии.

В целом представленная к защите выпускная квалификационная работа Максевой Анны Геннадьевны полностью соответствует заданию, отличается неплохим научно-исследовательским уровнем, удовлетворяет требованиям, предъявляемым к выпускной квалификационной работе бакалавра, а ее автор заслуживает присуждения оценки «ОТЛИЧНО».

Оригинальность текста ВКР составляет 91 %.

Руководитель ВКР \_\_\_\_\_ к.ф.-м.н. \_\_\_\_\_  
(уч. степень, уч. звание) (подпись)

Д.А. Полянский  
(и.о. фамилия)

«20» июня \_\_\_\_\_ 2018 г.

## Оглавление

Введение .....	10
<b>1 Обзор медицинских основ .....</b>	<b>13</b>
1.1 Билирубин .....	13
1.2 Склеральная оболочка .....	19
1.3 Анализ спектров поглощения склеры глаза .....	23
<b>2 Физическое обоснование метода .....</b>	<b>29</b>
2.1 Приборы для определения содержания билирубина .....	29
2.2 Спектрофотометрический метод исследования .....	34
<b>3 Модернизация конъюнктивного микроскопа .....</b>	<b>43</b>
3.1 Устройство спектрофотометров .....	43
3.2 Длины волн .....	45
3.3 Конъюнктивная микроскопия .....	46
3.4 Нормативные документы .....	48
Заключение .....	50
Список использованных источников .....	51

## Введение

В настоящее время все более широкое распространение получают неинвазивные методы определения содержания билирубина в крови. Лабораторные процедуры, такие как клинический и биохимический анализы, являются определяющими, так как удовлетворяют требованиям допустимых пределов аналитической вариации: для гемоглобина  $\pm 2\%$ , для билирубина  $\pm 10\%$ . Но для терапии и мониторинга состояния больных бескровные методы превосходят лабораторные исследования по экономичности, оперативности и эффективности.

Преимущества неинвазивных методов диагностики:

- в процессе забора крови возможно инфицирование пациента (СПИД, кокковая инфекция, гепатит и др.), в то время как неинвазивные методы исключают этот риск, что особенно актуально при проведении анализа вне медицинского учреждения;

- позволяют в течении нескольких секунд получить результат и быстро поставить диагноз, например, при гипербилирубинемии, анемии или диабете, а также методом скрининга выявить пациентов группы риска;

- измерение уровня билирубина в крови может производить любой медицинский работник;

- так как исключаются затраты на специальные реагенты, прибор быстро окупается.

Методы для определения содержания билирубина используются довольно давно, но являются либо инвазивными (происходит забор крови пациента в кювету, которая помещается в анализирующий прибор), либо неинвазивными, но требующими внесения определенных поправок (прибор «Билитест» от ООО НПП "ТЕХНОМЕДИКА", который определяет содержание билирубина в кожном покрове, при этом требуется внесение ряда коэффициентов для учёта цвета кожи, возраста, пигментации и т.д.) [12].

В данной работе стоит задача рассмотрения физических основ для анализа содержания билирубина в крови на базе разработанного ранее мобильного конъюнктивального микроскопа (патент РФ №2544314) с получением данных по принципу оптического спектрофотометрирования участка конъюнктивального русла бульбарной конъюнктивы глаза.

Актуальность: для скрининга новорожденных на заболевания, связанные с избытком билирубина, встречающиеся по статистике в 60 процентов случаев, необходим неинвазивный и максимально удобный прибор, исследования на котором проводятся без забора крови, что исключает риск травмирования здоровья новорождённых при проведении данной процедуры [14].

Цель: модернизация конъюнктивального микроскопа для выполнения спектрофотометрического исследования уровня билирубина в крови.

Задачи:

1. проведение литературного обзора и патентного обзора, определение существующих проблем в данной области (среди методик определения уровня билирубина):

- рассмотрение физических особенностей обмена билирубина;
- обзор существующих методик определения содержания билирубина в крови.

2. модернизация конъюнктивальной микроскопии с помощью метода спектрофотометрии для определения содержания билирубина в крови.

3. обоснование перехода от использования оптического разрешения в конъюнктивальном микроскопе к разрешению по длине волны.

4. выбор оптимальных физических параметров излучения для проведения спектрофотометрического исследования на сосудистом русле конъюнктивы и определение допустимых параметров используемого излучения.

Новизна: оптимизация метода определения билирубина в крови, который позволит бескровным методом без риска инфицирования пациента

за несколько секунд определить содержание уровня билирубина на основе объединения методики спектрофотометрии и конъюнктивальной микроскопии.

Предмет: содержание билирубина в крови.

Объект: конъюнктивальный микроскоп, адаптированный для спектрофотометрической методики.

Гипотеза: создание новой методики определения содержания билирубина в крови с помощью конъюнктивального микроскопа и применения спектрофотометрической методики сможет значительно обезопасить, ускорить и упростить процесс определения уровня данного показателя.

Научная новизна: в работе обоснована эффективность применения спектрофотометрического метода в конъюнктивальном микроскопе.

Структура дипломной работы обусловлена предметом, целью и задачами исследования. Работа состоит из введения, трех глав и заключения.

Введение раскрывает актуальность темы, объект, предмет, цель, задачи, раскрывает теоретическую и практическую значимость работы.

В первой главе рассматриваются биологические свойства склеры глаза и билирубина. Во второй главе описываются уже существующие методы определения уровня билирубина в крови. Третья глава посвящена физическому обоснованию и принципу работы прибора.

В заключении подводятся итоги исследования, формируются окончательные выводы по рассматриваемой теме.

## 1 Обзор медицинских основ

### 1.1 Билирубин

Билирубин — основной продукт распада гемоглобина, высвобождающегося из стареющих эритроцитов. Также он расценивается как диагностический признак заболеваний крови и печени [17]. Является одним из главных компонентов желчи в организме человека и животных. В норме его образование происходит как результат расщепления белков, которые содержат гем гемоглобина, миоглобина и цитохрома. Распад гемоглобина происходит в клетках ретикуломакрофагальной системы костного мозга, селезёнки, лимфоузлов и печени, откуда конечные продукты попадают в желчь и выводятся из организма.

В крови билирубин содержится в небольших количествах в виде двух фракций: свободной и связанной. Повышение билирубина может говорить, как об избыточном разрушении эритроцитов (гемолитическая желтуха и пр.), так и о нарушенном выведении билирубина из организма, например, при печёночной желтухе, закупорке жёлчных протоков и прочих заболеваниях. Показатели общего, свободного (непрямого) и связанного (прямого) билирубина используются для более точной диагностики.

В результате метаболизма гемоглобина образование более 80% гема происходит из эритроцитов и 20% из цитохромов и миоглобина.

Свободный (непрямой) билирубин превращается, образуясь при разрушении эритроцитов и распаде гемоглобина в органах ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) в билирубин-диглюкуронид (связанный или прямой билирубин) в печеночной клетке (рисунок 1). Процесс осуществляется в три этапа:

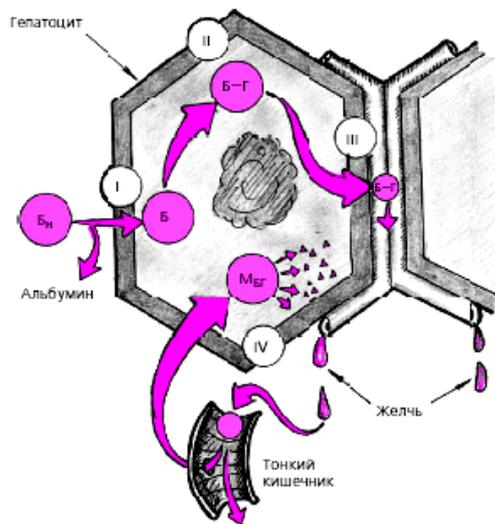


Рисунок 1 – Процессы обезвреживания свободного (непрямого) билирубина и мезобилиногена (уробилиногена) в печеночной клетке. Бн - свободный (билирубин); Мбг - мезобилиноген (уробилиноген). Римскими цифрами обозначены этапы обезвреживания 1. I этап — захват билирубина (Б) печеночной клеткой после отщепления альбумина; 2. II этап — образование водорастворимого комплекса билирубин-диглюкуроонида (Б-Г); 3. III этап — выделение образовавшегося связанного (прямого) билирубина (Б-Г) из печеночной клетки в желчные каналы (проточки) непрямым билирубином; Б-Г - билирубин-глюкуроид (связанный или прямой)

Далее билирубин поступает в желчные пути и кишечник. Под воздействием микробной флоры в нижних отделах желчевыводящих путей и кишечнике происходит постепенное восстановление связанного билирубина до уробилиногена. Часть уробилиногена (мезобилиноген) всасывается в кишечнике и по системе воротной вены вновь попадает в печень, где в норме происходит практически полное его разрушение. Другая часть уробилиногена (стеркобилиноген) всасывается в кровь в геморроидальных венах попадая в общий кровоток и выделяясь почками с мочой в незначительных количествах в виде уробилина, который часто не выявляется клиническими лабораторными методами. Наконец третья часть

уробилиногена превращается в стеркобилин и выделяется с калом, обуславливая его характерную темно-коричневую окраску.

Трансформация протопорфирина гема в биливердин осуществляется под влиянием микросомных оксидаз гепатоцитов (рисунок 2). Далее происходит окисление биливердина с образованием непрямого билирубина. Непрямой билирубин, циркулирующий в крови, связан с альбуминами и поэтому не фильтруется в почках и отсутствует в моче.

Транспорт билирубина в гепатоциты сочетается с диссоциацией комплекса неконъюгированный билирубин-альбумин. В гепатоцитах билирубин образует комплекс с белками и глутатион-S-трансферазами.

Диглюкуронизация билирубина в гепатоцитах завершается образованием растворимого в воде конъюгированного билирубина. Прямой билирубин не связан с альбумином. В связи с этим он активно (прямо) взаимодействует с диазореактивом Эрлиха, выявляющим этот пигмент.

Впоследствии происходит экскреция конъюгированного билирубина в желчные пути.

Конъюгированный (прямой) билирубин трансформируется в уробилиноген в верхнем отделе тонкой кишки. Там он всасывается, попадает по системе воротной вены в печень, где разрушается в гепатоцитах. Другая часть прямого билирубина трансформируется стеркобилиноген в основном в толстой кишке. Стеркобилиноген всасывается в нижнем отделе толстого кишечника и с кровью геморроидальных вен попадает в общий кровоток. Стеркобилиноген хорошо растворим в воде, не связан с белками и поэтому фильтруется в почках в мочу (придавая ей в норме соломенно-желтый цвет). Часть стеркобилиногена выделяется с экскрементами, окрашивая их [4].

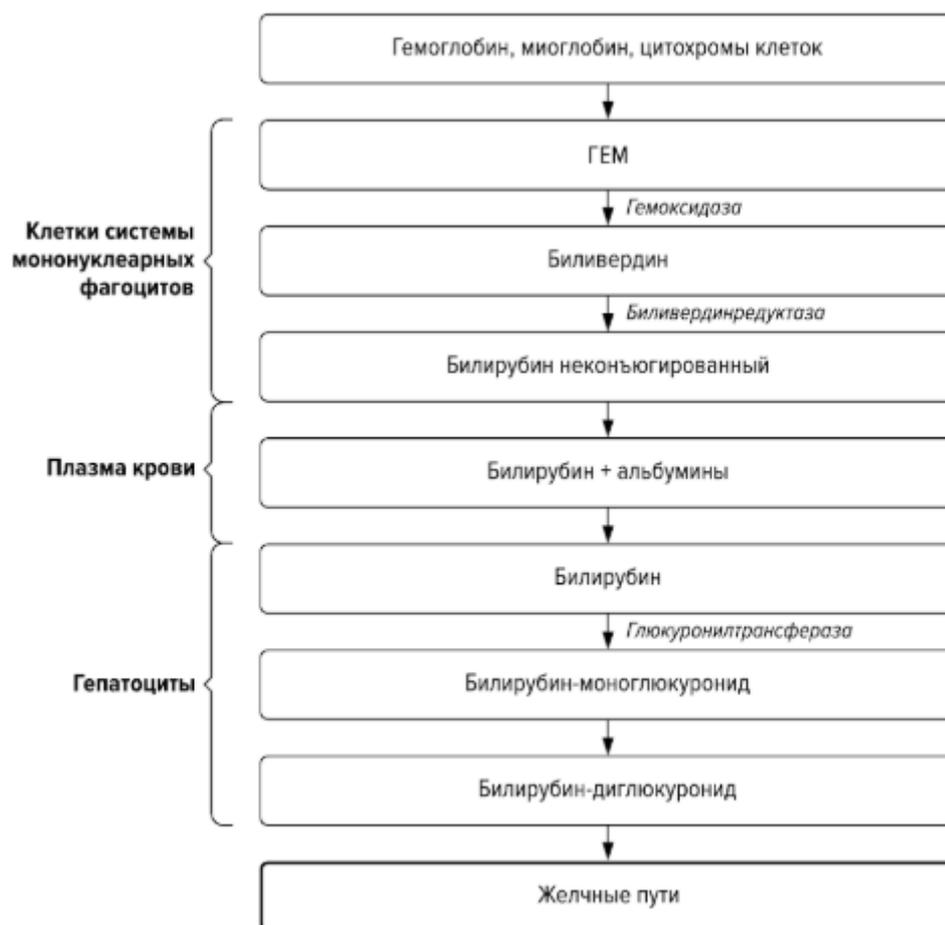


Рисунок 2 – Схема выведения билирубина

Билирубин, как описано выше, подразделяется на несколько фракций: общий, прямой и непрямой. Главным различием прямого (рисунок 3) и непрямого (рисунок 4) билирубина является скорость их химических реакций. Также прямой билирубин хорошо растворим в воде и не токсичен в отличие от непрямого. Непрямой билирубин может легко проникать в клетки и нарушать их жизнедеятельность. Главным отличием прямого билирубина является быстрая реакция с диазореактивом. Непрямой же билирубин начинает взаимодействовать с диазореактивом только после добавления ускорителя, например, кофеинового реактива или спирта для осаждения белка [5].

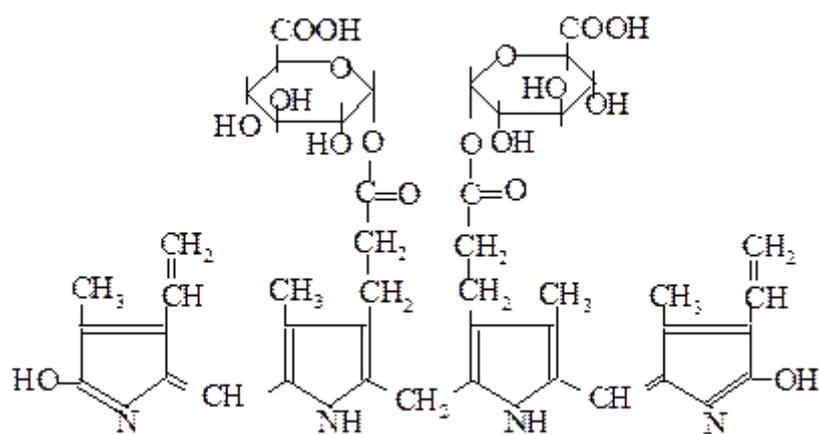


Рисунок 3 – Химическое строение прямого билирубина

Часть непрямого билирубина, которая реагирует без добавления ускорителя крайне мала – около 2%. Чем меньше рН среды, тем хуже свойство билирубина вступать в диазореакции. Для того, чтобы этого избежать, обычно предварительно проводят инкубирование в течении 5 минут путем добавления соляной кислоты в пробу и после этого происходит добавление диазосмеси. Фотометрирование производится после инкубирования на длине волны 540 нм. При добавлении щелочного тартрата, фотометрирование проводят на длине волны 598 нм. Предварительное инкубирование в кислой среде необходимо для того, чтобы минимизировать влияние неконъюгированного билирубина на результат определения прямого.

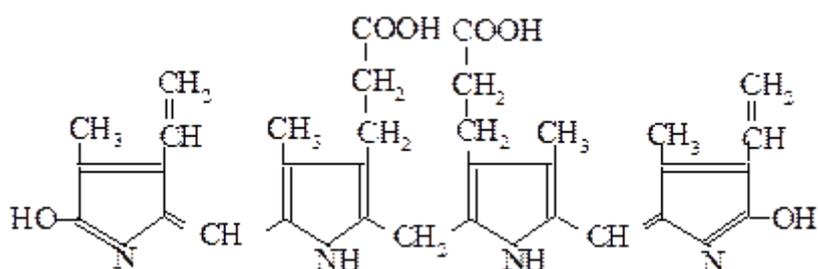


Рисунок 4 – Химическое строение непрямого билирубина

Но последствием минимизации служит уменьшение способности прямой фракции билирубина к реакции. С клинической точки зрения слегка заниженное значение прямого билирубина является более предпочтительным, чем ложно завышенное из-за неконъюгированного билирубина, которое может быть ошибочно интерпретировано как конъюгированная гипербилирубинемия.

Общий билирубин - это прямой и непрямой билирубин, который определяется диазореагентом с ускорителем. На настоящий момент не существует референтного метода определения прямого билирубина. При использовании фотометрических и биохимических методов на точность результата определения билирубина влияют некоторые компоненты крови. Эти компоненты либо меняют оптические характеристики пробы напрямую (поглощение и рассеяние), либо меняют ход аналитической реакции. К первому типу интерференции можно отнести мутность пробы. Гемоглобин, попадающий в пробу при лизировании эритроцитов, может влиять на результат как напрямую, из-за поглощения, так и за счет ингибирования аналитической реакции. Оптическую часть интерференции можно компенсировать дополнительным измерением контрольной пробы образца или измеряя оптическую плотности пробы на двух длинах волн, частично компенсируя гемолиз и мутность. Кроме интерференции, реагенты могут значительно отличаться по верхнему диапазону линейности. В неонатальной практике встречаются очень высокий уровень билирубина. Поэтому, желательно выбирать реагенты с диапазоном линейности превышающем 340 мкм/л. Диапазон линейности обычно соответствует 10% отклонению от линейной калибровки. Следует принимать во внимание появления систематической ошибки при измерении пробы с концентрацией билирубина значительно отличающейся от концентрации стандарта.

## 1.2 Склеральная оболочка

Склеральная оболочка и кожа относятся к сильно рассеивающим биологическим тканям. Их свойства могут быть описаны при помощи модели многократного рассеяния скалярных волн в случайно-неоднородной среде с поглощением. Их оптические свойства (коэффициенты пропускания, отражения и т.д.) описываются через оптические параметры, такие как: коэффициент рассеяния, коэффициент поглощения и фактор анизотропии, значение которого изменяется от -1 до 1.

Склера глазного яблока – это фиброзное образование, то есть относится к соединительной ткани организма. Содержание воды колеблется от 65% до 69%, на коллагеновые волокна приходится 75% сухого веса, 10% составляют протеины и 1% - мукополисахариды. Склеральная оболочка покрывает 80-90% поверхности глазного яблока и образует сегмент сферы около 22 мм в диаметре [2].

На рисунке 5 изображено строение молекулы коллагена, который является основным веществом в составе фиброзных и соединительных тканей. Коллаген имеет волокнистую структуру, состоит из отдельных волокон, образованных микроволокнами. Молекула коллагена в свою очередь состоит из трех полипептидных цепей, которые образуют структуру тройной спирали. Длина молекулы коллагена примерно равна 280 нм.

В зависимости от возраста и индивидуальных особенностей организма, толщина склеры имеет различное значение и изменяется с течением жизни. Наибольшую толщину склера имеет у заднего полюса глазного яблока– 1 мм, по направлению к экватору ее величина постепенно уменьшается до 0.4-0.6 мм. Под прямыми мышцами, позади линии их прикрепления, склера самая тонкая (0.3 мм), спереди от места прикрепления сухожилий толщина склеры возрастает до 0.6 мм и такой остается до роговицы.

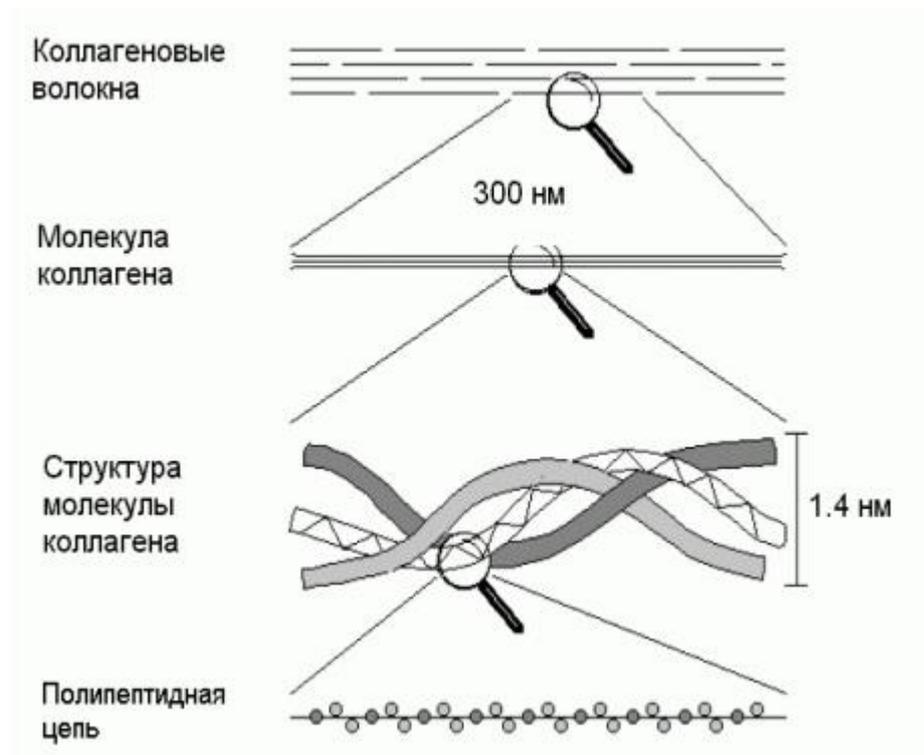


Рисунок 5 – Различные уровни структурной организации коллагена, образующего фиброзные ткани

У молодых людей базовое вещество склеры – это зернистая масса, расположенная между волокнами и клетками. В экваториальном отделе склеры слои базового вещества уже, чем в заднем отделе. Коллагеновые фибриллы имеют разное направление, диаметр их колеблется от 30 до 140 нм. Около фибропластов располагаются тонковолокнистые структуры диаметром 7.5-20 нм. Возможно, что тонковолокнистые структуры, расположенные около фибропластов, представляют собой проколлагеновые волокна, которые потом превращаются в коллагеновые волокна. В склеральной оболочке молодых людей находится множество клеточных элементов. С возрастом, к 50-60 годам, базовое вещество склеры приобретает зернисто-волоконистый характер, являясь более плотным, нежели у молодых, его количество становится больше. Коллагеновые фибриллы имеют разное направление, их диаметр от 50 до 150 нм. Наряду с коллагеновыми фибриллами, имеющими нормальное строение, наблюдаются конгломераты из слипшихся коллагеновых фибрилл неясной

формы. Количество клеточных элементов становится значительно меньше [13].

При помощи световой микроскопии возможно выделить в три слоя фиброзной оболочки: эписклеру, склеральную строму, или собственно склеру, и темную пластинку – ретинальный эпителий.

Частью поверхностной стромы является передняя эписклера, которая сливается со склеральной стромой и теноновой капсулой, прилежащей к ней. Эписклеральный коллаген имеет аналогичное строение с большинством соединительных тканей. Коллагеновые волокна склеры больше, чем коллагеновые волокна эписклеры. Эписклера более богата базовым веществом, чем собственно склера.

Состав склеральной стромы: волокнистые структуры (коллагеновые и эластиновые волокон) и базовая цементирующая субстанция, представленная нейтральными и кислыми мукополисахаридами. Строма является жесткой фиброзной тканью, которая в основном состоящей из соединительных коллагеновых волокон, которые упакованы в пучки в виде прямоугольных ламелей. Коллагеновые волокна окружены аморфным базовым веществом, содержащим гликозаминогликаны, белково-полисахаридные комплексы и белки, и составляют межклеточный матрикс. Состояние этих веществ определяет тургор ткани и регулирует ее проницаемость для воды и молекул других веществ.

При пересечении пучков коллагеновых волокон и образуется сложная архитектура склеры, которая специфична для каждого ее отдела, а также слоев, выделенных по толщине склеры (рисунок 6 и 7). Тесное переплетение коллагеновых структур склеры придает ей прочность и упругость. Средний диаметр коллагеновых фибрилл равен порядка 107 нм. Средний размер межцентровых промежутков коллагеновых волокон склеры составляет 285 нм. В одном пучке группы волокон разделены друг от друга сравнительно большими областями, которые случайно распределены в пространстве. Пучки волокон имеют широкий

разброс по ширине от 1 мкм до 50 мкм и толщине от 0.5 мкм до 6 мкм и могут быть толще и шире во внутренних слоях склеры, при этом длина пучков достигает нескольких миллиметров. Эти лентообразные структуры, многократно пересекающиеся друг с другом во всех направлениях, но остающиеся всегда параллельными поверхности склеры.

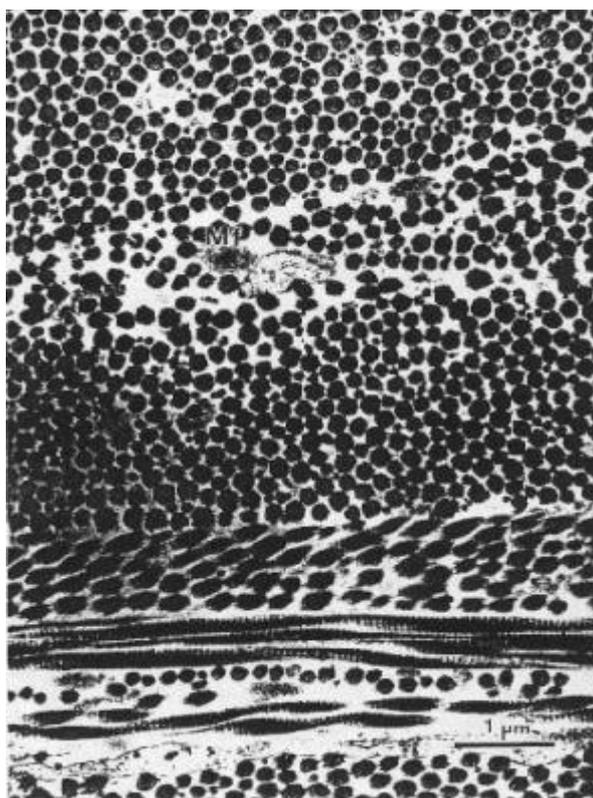


Рисунок 6 – Типичная фотография склеральной ткани глаза, сделанная с помощью электронного микроскопа (x18000)

Ретинальный эпителий склеры состоит из тонких коллагеновых пучков волокон внутренних слоев склеры. Он содержит большое количество пигментирующего вещества меланина, который в основном локализуется в пространстве между пучками коллагеновых волокон.



Рисунок 7 – Типичная фотография склеральной ткани глаза, сделанная с помощью электронного микроскопа (x2900)

С оптической точки зрения склера глаза представляет собой слабо поглощающую среду с ярко выраженными рассеивающими свойствами [3]. Основными компонентами склеры являются коллагеновые волокна и окружающее их базовое вещество. Эти компоненты в нативной склере имеют различные показатели преломления: 1.474 и 1.345 (для длины волны 589 нм) или 1.47 и 1.36. Отношение показателей преломления рассеивателей и базового вещества в склере, таким образом, составляет примерно 1.1.

### **1.3 Анализ спектров поглощения склеры глаза**

Склера – это непрозрачная часть наружной оболочки глаза, имеющая белый цвет (белочная оболочка). Склера насыщена водой (вследствие отсутствия эпителиального покрова) и непрозрачна. Сквозь склеру проходят многочисленные нервы и сосуды.

Для измерения содержания билирубина в крови с сосудистого русла конъюнктивы важен состав и спектр поглощения коллагеновых волокон, во избежание погрешности измерений.

На рисунке 8 показаны спектры полного пропускания и диффузного отражения образца склеры глаза в спектральном диапазоне 370–2500 нм.

Форма представленных спектров в основном определяется спектральной зависимостью коэффициента рассеяния коллагеновых волокон склеры и полосами поглощения воды внутритканевого матрикса. Как в видимом, так и в ИК спектральных диапазонах форма спектра полного пропускания достаточно хорошо коррелирует с формой спектра диффузного отражения, т.е. с ростом длины волны наблюдаются одновременный подъем и спад коэффициентов диффузного отражения и полного пропускания биоткани с резкими провалами в области полос поглощения воды.

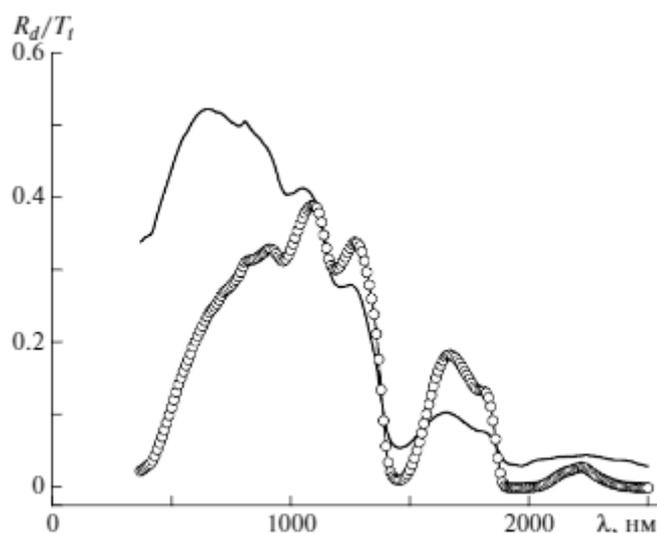


Рисунок 8 – Спектры диффузного отражения и полного пропускания образца склеры глаза человека. Сплошная линия – спектр диффузного отражения, символы – спектр полного пропускания.

Толщина образца  $1.0 \pm 0.05$  мм

На рисунке 9 представлена спектральная зависимость транспортного коэффициента рассеяния склеры глаза. Данная зависимость получена

усреднением спектров транспортного коэффициента каждого из 10 образцов биоткани. Хорошо видно, что транспортный коэффициент рассеяния в области 370–1300 нм довольно плавно спадает в сторону больших длин волн, что в целом соответствует общему характеру спектрального поведения рассеивающих характеристик биотканей. Однако начиная с 1300 нм, с ростом длины волны транспортный коэффициент рассеяния увеличивается и наблюдается искажение формы спектра рассеяния, т.е. отклонение его от монотонной зависимости в области полос поглощения.

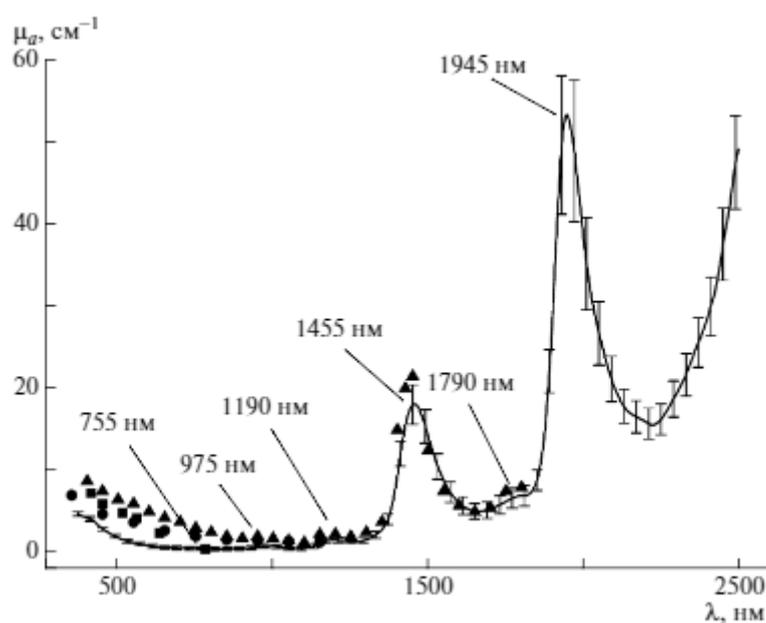


Рисунок 9 – Спектральная зависимость коэффициента поглощения склеры глаза человека. Вертикальные линии показывают среднеквадратичные отклонения

Спектр поглощения воды в настоящее время является хорошо исследованным. В видимом диапазоне длин волн поглощение воды пренебрежимо мало. В ближнем ИК спектральном диапазоне вода является основным хромофором, имеющим полосы поглощения с максимумами на 754, 975, 1196, 1455, 1790 и 1930 нм. Из рисунка 9 видно, что провалы, соответствующие полосам поглощения воды, наблюдаются как в спектре

полного пропускания, так и в спектре диффузного отражения образца ткани склеры глаза.

В склере присутствуют достаточно крупные рассеиватели, в качестве которых выступают пучки коллагеновых волокон и узлы их сплетения. Показатель преломления коллагеновых волокон склеры равен 1.47, а показатель преломления внутритканевой жидкости равен 1.36, позволяет оценить средний размер рассеивателей в склере как  $0.5 \pm 0.05$  мкм, что достаточно хорошо согласуется со структурно-морфологическими особенностями данной биоткани. Элементарными рассеивателями в склере глаза являются тонкие коллагеновые волокна размером от 30 до 300 нм со средним диаметром порядка 133 нм, которые упакованы в лентообразные жгуты толщиной от 0.5 до 6 мкм и шириной от 1 до 50 мкм.

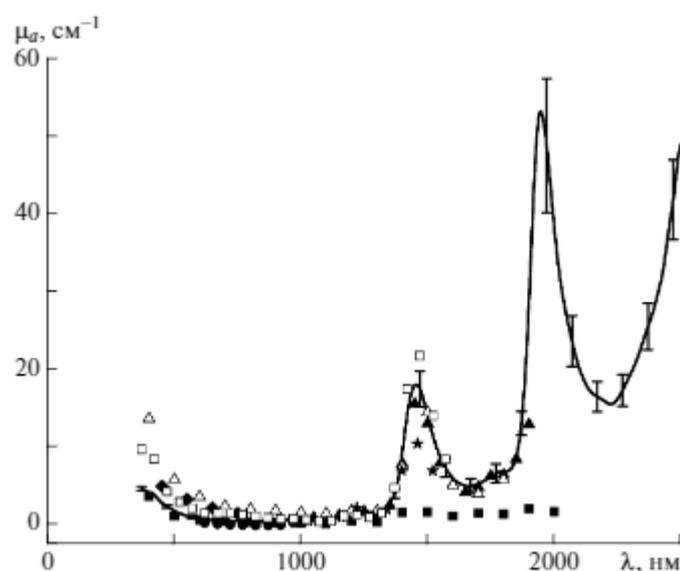


Рисунок 10 – Спектральные зависимости коэффициентов поглощения склеры глаза и обескровленной дермы кожи. Вертикальные линии показывают среднеквадратичные отклонения

При сравнении оптических характеристик склеры и обескровленной дермы кожи, которая по своей структуре также относится к фиброзным тканям, так как обе эти ткани в основном образованы крупными жгутами

коллагеновых волокон, расположенными параллельно поверхности биоткани, и не содержат сколько-нибудь крупных кровеносных сосудов, заметных включений липидов или других компонентов. Сопоставимым является и содержание воды в этих тканях. Так, для дермы кожи объемная доля воды в среднем составляет  $68.2 \pm 5.2\%$ . В свою очередь, в склере содержание воды оценивается как  $67.1 \pm 4.9\%$ . Показатели преломления данных биотканей также имеют близкие значения. Показатель преломления склеры глаза человека (на длине волны 589 нм) равен  $1.385 \pm 0.005$ . Показатель преломления дермы кожи человека на этой длине волны равен 1.388. Данное соответствие позволяет предположить, что объемные доли рассеивающих частиц также одинаковы (или близки) для склеры глаза и дермы кожи человека, то есть объемные доли рассеивателей в данных биотканях равны 21%.

Сравнение оптических характеристик склеры глаза и обескровленной дермы кожи позволяет подтвердить сделанное выше утверждение о схожести строения данных биотканей и близости их оптических характеристик, несмотря на определенные отличия (рисунок 10 и 11).

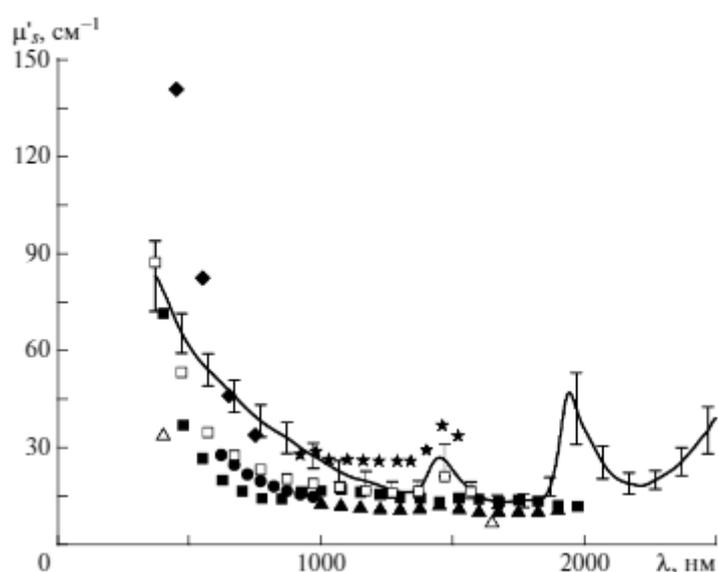


Рисунок 11 – Спектральные зависимости транспортных коэффициентов рассеяния склеры глаза и обескровленной дермы кожи. Вертикальные линии показывают среднеквадратичные отклонения

Таким образом, средний размер рассеивателей в склере глаза равен  $0.5 \pm 0.05$  мкм, что является сравнительно малым показателем, а объемные доли рассеивателей равны 21%.

В результате анализа литературы было получено, что физико-химическое строение билирубина позволяет применить спектрофотометрический метод для определения его уровня с конъюнктивы глаза. Свойства склеральной оболочки глаза могут значительно упростить и ускорить данную процедуру за счет отсутствия необходимости забора крови пациента и внесения дополнительных коэффициентов.

## **2 Физическое обоснование метода**

### **2.1 Приборы для определения содержания билирубина**

В клинической практике используются различные методы определения билирубина и его фракций в сыворотке крови.

Биохимический метод Эндрассика-Клеггорна-Грофа – фотометрический количественный метод определения прямого и непрямого билирубина в сыворотке крови.

Принцип метода заключается в том, что при взаимодействии сульфаниловой кислоты с азотистокислым натрием образуется диазофенилсульфоновая кислота, которая с билирубином-глюкуронидом, так называемым прямым билирубином сыворотки крови дает розово-фиолетовое окрашивание. По интенсивности окраски определяют количество прямого билирубина.

При добавлении к сыворотке крови кофеинового реактива несвязанный (непрямой) билирубин превращается в растворимый (прямой) и определяется количественно с диазореактивом. По интенсивности окрашивания определяют концентрацию в сыворотке крови общего билирубина, а по разности между общим и связанным (прямым) билирубином определяют количество несвязанного билирубина.

Для определения связанного билирубина измерение проводят спустя 5—10 мин после добавления диазосмеси, так как при длительном стоянии в реакцию вступает несвязанный билирубин. Для определения общего билирубина пробу для развития окраски оставляют стоять 20 мин, после чего измеряют на фотометре. При дальнейшем стоянии окраска не изменяется. Измерение проводят при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя в 0.5 см против воды. Из показателей, полученных при измерении общего и связанного билирубина, вычитают показатель холостой пробы. Расчет производят по калибровочному графику. Находят

содержание общего и связанного билирубина. Метод Ендрассика-Клеггорна-Грофа прост, удобен в практике, не связан с применением дефицитных реактивов и является наиболее приемлемым для практических лабораторий. Определение рекомендуется приводить сразу же после забора проб, чтобы избежать окисления билирубина на свету. Гемолиз сыворотки снижает количество билирубина пропорционально присутствию гемоглобина. Следовательно, сыворотка крови не должна быть гемолизирована. Ряд веществ — гидрокортизон, андрогены, эритромицин, глюкокортикоиды, фенобарбитал и аскорбиновая кислота вызывают интерференцию.

Определение билирубина в сыворотке крови прямым фотометрическим методом.

В случае общего билирубина прямым фотометрическим методом чрезвычайно просто, удобно не требует венепункции (исследуется капиллярная кровь) может повторяться неоднократно в течение суток. Недостатком метода является невозможность определить фракции билирубина и меньшая точность при выраженном гемолизе.

Несмотря на то, что при этом определяется только общий билирубин, этот подход представляет значительный интерес в неонатологии, так как у новорожденных детей преобладает одна производная билирубина, практически равная концентрации общего билирубина. Билирубин представляет собой пигмент с ярко выраженной желтой окраской. Его спектральная кривая поглощения имеет максимум на длине волны 460 нм (синяя область спектра). Измеряя поглощение на этой длине волны можно было бы определить концентрацию общего билирубина в крови. Однако ряд факторов усложняют такое измерение. Билирубин является сильным поглотителем, и поэтому оптимальная для построения фотометра плотность 0.3-0.5 оптической плотности достигается в кювете с длиной оптического пути примерно 250 микрометров (0.25 мм).

Изготовить такую кювету непросто. Кроме того, фотометрирование непосредственно крови усложняется присутствием форменных элементов

крови, рассеянием света на них, а также интерференцией билирубина с гемоглобином, который частично поглощает свет в синей области спектра. Поэтому для фотометрирования необходимо, во-первых, получить образцы плазмы крови, а во-вторых, нужно исключить влияние гемоглобина, присутствующего в небольшом количестве в плазме. Плазму для фотометрирования получают на лабораторных центрифугах в гепаринизированных гематокритных капиллярах.

Фотометрирование можно проводить на спектрофотометрах на двух длинах волн - 460 и 550 нм, на которых гемоглобин имеет одинаковые коэффициенты поглощения, а билирубин имеет максимум поглощения на длине волны 460 нм и не поглощает на длине волны 550 нм. Именно это позволяет исключить влияние гемоглобина при измерении концентрации билирубина. Однако спектрофотометры общего назначения мало пригодны для таких рутинных измерений, так как необходимо иметь специальные кюветы с малой оптической длиной. Примером такого специализированного фотометра может служить фотометр «Билимет» - К-анализатор билирубина фотометрический неонатальный (тип средства измерения АБФ-04).

Определение концентрации общего билирубина анализатором БИЛИМЕТ К производится методом прямого фотометрирования плазмы крови в тонком стеклянном капилляре. Для разделения крови в капилляре на фракции используется устройство для получения плазмы крови УППК-01-НПП ТМ или подходящая гематокритная центрифуга. Оптическая плотность исследуемого образца вычисляется как логарифм отношения световых потоков на двух длинах волн. Двухволновая методика измерения выбрана для уменьшения погрешностей измерения и устранения влияния присутствия в капилляре остаточной лизированной крови, которая даёт окраску раствора в красной части спектра.

Перед определением билирубина на анализаторе Билимет К необходимо наполнить капилляр кровью (чаще всего из пятаки новорожденного) и получить на центрифуге плазму дисплея.

Фотометрирование пробы длится доли секунды. После фотометрирования каретка автоматически выдвигается из прибора. Результат измерения фиксируется либо вручную, либо распечатывается печатающим устройством УП-02 [11].

Значительный прогресс в области анализа гипербилирубинемии новорожденных был достигнут с появлением в 1980 г. транскутанного билирубинометра фирмы «Минолта» (Япония). Десятилетний опыт применения прибора фирмы «Минолта» в ряде стран показал, что врач пользующийся прибором обладает несомненно эффективным средством диагностики.

Положительный опыт медицинского применения транскутанного билирубинометра фирмы «Минолта» обусловил разработку и серийное производство отечественного аналога - фотометрического анализатора гипербилирубинемии «Билитест» (типа АГФ-02). Прибор «Билитест» прошел в установленном порядке все необходимые испытания и рекомендован к промышленному выпуску решением комиссии Минздрава СССР от 25 июня 1991 г.

Транскутанная билирубинеметрия основывается на явлении обратной диффузии билирубина из крови в окружающую ткань (дерма). Увеличение концентрации билирубина в крови приводит к увеличению концентрации билирубина в дерме и наоборот уменьшение концентрации билирубина в крови (например, при переливании крови) приводит к обратному движению билирубина из дермы в кровь до тех пор пока между этими двумя системами не наступит равновесие.

Поскольку билирубин обладает ярко выраженной желтой окраской цвет кожи меняется в зависимости от содержания билирубина в дерме. Желтая окраска билирубина связана с наличием в нем полосы поглощения света в синей области спектра с максимумом на длине волны 460 нм.

Как известно существует логарифмическая зависимость между концентрацией поглощающего вещества и интенсивностью прошедшего

через него света. Прибор «Билитест» по своему принципу является фотометром отраженного света и измеряет логарифм отношения интенсивностей отраженного света на двух длинах волн. Прибор снабжен миниатюрной лампой-вспышкой и двумя фотоприемниками с узкополосными светофильтрами, позволяющими выделять из всего отраженного потока света излучение на длинах волн 460 и 550 нм. Выбор второй длины волны в желто - зеленом диапазоне обусловлен отсутствием в нем поглощения света билирубином и одновременно наличием примерно такого же как на длине волны 460 нм поглощения в гемоглобине крови. Это позволяет практически полностью исключить влияние капиллярных подкожных сосудов на результаты измерений.

Важной особенностью прибора является то что он регистрирует свет отраженный только из глубины тканей и не допускает попадания на фотоприемники света отраженного от поверхности кожи за счет плотного прилегания к ней подвижной световодной головки. Тем самым значительно ослабляется мешающее влияние пигментации кожи.

По существу, прибор «Билитест» определяет концентрацию билирубина в дерме путем прямого фотометрирования. Поскольку стандарты концентрации билирубина в дерме отсутствуют (и вряд ли могут быть созданы) прибор отградуирован в условных единицах, которые названы в соответствии с международной практикой «транскутанным билирубиновым индексом» (ТБИ). Клиническая значимость ТБИ определяется его хорошей корреляцией с концентрацией билирубина в крови новорожденных.

Прибор откалиброван таким образом, чтобы при измерении в области лба новорожденного концентрация общего билирубина в сыворотке (плазме) крови (в микромолях на 1 л) примерно соответствовала показателю ТБИ умноженному на 10. Эта калибровка прибора «Билитест» устанавливалась для новорожденных без ярко выраженной пигментации кожи (белая раса). В других случаях соответствие между ТБИ и концентрацией билирубина в

крови должно определяться пользователями прибора самостоятельно путем сравнения показаний с данными лабораторных исследований.

## 2.2 Спектрофотометрический метод исследования

Фотометрический метод анализа основан на способности определяемого вещества поглощать электромагнитное излучение оптического диапазона. Концентрацию поглощающего вещества определяют, измеряя интенсивность поглощения. Поглощение при определенной длине волны является информацией о качественном и количественном составе определяемого вещества и составляет аналитический сигнал [10].

Фотометрический анализ относится к молекулярному абсорбционному анализу, т. е. анализу, основанному на поглощении света молекулами анализируемого вещества и сложными ионами в ультрафиолетовой (УФ), видимой и инфракрасной (ИК) областях спектра.

Спектрофотометрический метод анализа основан на поглощении монохроматического излучения, т. е. излучения с одной длиной волны в видимой и УФ областях спектра.

С помощью фотометрического анализа можно определять малые количества вещества, например, содержание примесей не ниже  $5 \times 10^{-5} \%$  (спектрофотометрически) при погрешности определения 1—3 % [19].

Для определения количества билирубина самой оптимальной методикой является абсорбционный спектральный анализ, который основывается на измерении ослабления светового потока, происходящего вследствие избирательного поглощения света анализируемым веществом (системой).

Абсорбционный спектральный анализ проводят в различных областях спектра:

– в видимой области спектра ( $\lambda = 400\text{--}760$  нм,  $\nu = 4 \cdot 10^{-5} - 7,6 \cdot 10^{-5} \text{с}^{-1}$ ,  $\nu' = 2,5 \cdot 10^4 - 1,3 \cdot 10^4 \text{см}^{-1}$ ) - фотометрия и спектрофотометрия;

– в инфракрасной области ( $\lambda = 760\text{--}1100$  нм,  $\nu = 7,6 \cdot 10^{-5} \text{--} 1,1 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ ,  $\nu' = 2,5 \cdot 10^3 \text{--} 9,0 \cdot 10^4 \text{ см}^{-1}$ ) - ИК - спектроскопия;

– в ультрафиолетовой области спектра ( $\lambda = 200 \text{--} 400$  нм,  $\nu = 2,0 \cdot 10^{-5} \text{--} 4 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ ,  $\nu' = 5 \cdot 10^4 \text{--} 1,3 \cdot 10^4 \text{ см}^{-1}$ ) - УФ - спектроскопия.

При взаимодействии белого света (всех световых лучей в диапазоне 400-760 нм) с различными телами наблюдается следующее:

1) все лучи проходят сквозь прозрачное тело - оно кажется бесцветным,

2) все лучи отражаются от непрозрачного - тело кажется белым,

3) все лучи полностью поглощаются - тело кажется черным,

4) все лучи частично поглощаются - тело серое;

5) тело избирательно поглощает некоторые лучи видимой части спектра, остальные проходят сквозь него либо отражаются телом – тело кажется цветным, и цвет определяется воздействием всех световых лучей за вычетом поглощенных, так называемый дополнительный цвет. Например, если тело поглощает свет с длиной волны 500-560 нм (зеленый свет), его цвет кажется пурпурным и складывается из воздействия на глаз лучей с длиной волны 400-500 нм и 560-760 нм [9].

Причиной поглощения света веществом является увеличение внутренней энергии вещества за счет энергии проходящего через вещество света:

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}.$$

При прохождении излучения через прозрачный слой твердого тела, жидкости или газа происходит селективное (избирательное) поглощение (абсорбция) излучения с определенными частотами. Электромагнитная энергия излучения передается атомам и молекулам вещества и переводит их из основного в возбужденное энергетическое состояние, что можно выразить следующим образом:

$$E_0 + h \cdot \nu = E_1.$$

Внутренняя энергия вещества складывается из суммы вращательного движения молекул вокруг центра тяжести, колебательного движения атомов в молекулах и энергии движения электронов в атоме:

$$E_{\text{внутр}} = E_{\text{вращат}} + E_{\text{колеб}} + E_{\text{эл}}.$$

Соотношение величин энергий: 1:100:1000.

Различают атомную и молекулярную абсорбцию. При поглощении света веществом, содержащим атомы одного типа (например, пары ртути или натрия), поглощается лишь энергия УФ излучения, достаточная для перевода электрона на более высокий уровень, так как атом обладает только одной составляющей внутренней энергии:  $E_{\text{внутр}} = E_{\text{эл}}$ , при этом в поглощении участвуют валентные электроны, характеризующие определенный элемент. Поэтому спектр атома содержит ограниченное число пиков, которые используют для идентификации элементов (качественный анализ). По величине пика определяют содержание вещества (количественный анализ).

Метод атомно-абсорбционной спектроскопии широко используется в экоаналитических лабораториях, обладает высокой избирательностью, чувствительностью, скоростью анализа, простотой и удобством анализа [20].

### 2.3 Спектрофизические методики

Внутренняя энергия молекулы складывается из трех основных составляющих: энергии движения электронов ( $E_{\text{эл}}$ ), энергии колебаний атомов молекулы ( $E_{\text{колеб}}$ ) и энергии вращения молекулы ( $E_{\text{вращат}}$ ):

$$E_{\text{внутр}} = E_{\text{вращат}} + E_{\text{колеб}} + E_{\text{эл}}.$$

При поглощении излучения в видимой и УФ областях спектра происходит изменение электронной составляющей общей энергии. Поэтому будет рассматриваться энергия движения электронов. Если излучение определенной длины волны проходит через вещество и не поглощается, то энергическое состояние молекулы остается без изменения. Если же излучение поглощается, то молекулы вещества переходят из одного энергетического состояния с меньшей энергией ( $E_1$ ) в другое энергетическое состояние с большей энергией ( $E_2$ ). Этот процесс сопровождается поглощением кванта энергии:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} = h \cdot c \cdot \bar{\nu},$$

где  $h$  — постоянная Планка ( $6,62 \times 10^{-34}$  Дж · с),

$\nu$  — частота излучения ( $c^{-1}$ , Гц),

$c$  — скорость света ( $3 \times 10^{10}$  см/с),

$\lambda$  — длина волны, нм ( $1 \text{ нм} = 10^{-9}$  м),

$\bar{\nu}$  — волновое число ( $\text{см}^{-1}$ ).

Волновое число определяется по формуле:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}.$$

Изучая поглощение излучения веществом различных длин волн в видимой и УФ областях спектра, можно получить электронный спектр поглощения.

Спектр поглощения — зависимость показателя поглощения вещества от длины волны излучения.

Вещество поглощает волны той длины, которые оно испускает, когда является источником света. Каждый элемент таблицы Менделеева имеет

свой линейчатый спектр испускания и поглощения. На этом и стоит метод спектрального анализа:

$$\alpha = \beta/v,$$

где  $\alpha$  – коэффициент поглощения,

$\beta$  – коэффициент затухания,

$v$  – частота.

Закон Бугера:

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-\alpha x}.$$

При  $\alpha = \frac{1}{x} I = \frac{I_0}{e}$ , т.е. коэфф. поглощения - физическая величина, численно равная обратному значению толщины слоя вещества, в котором интенсивность волны убывает в  $e$  раз.

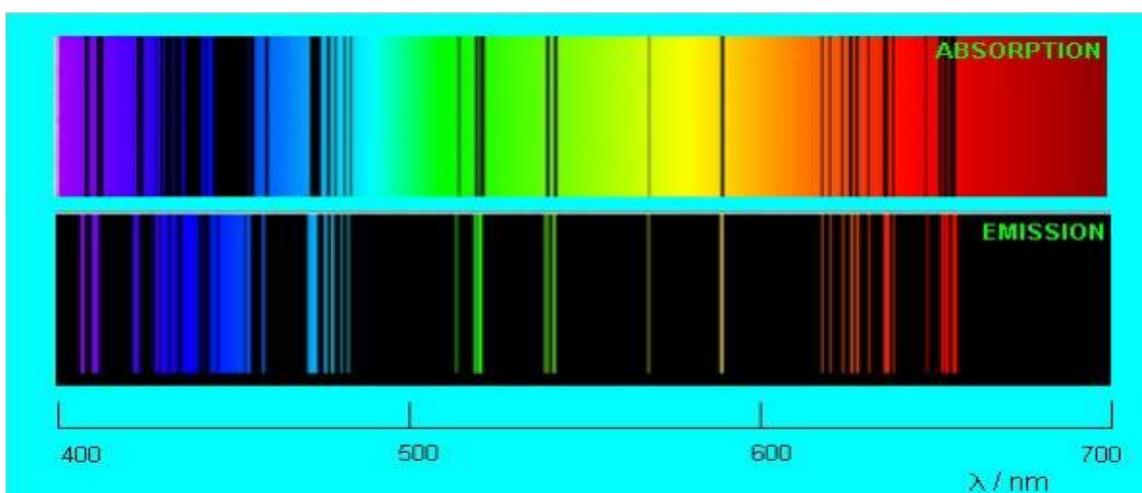


Рисунок 12 – Пример спектра испускания и поглощения одного и того же вещества

При взаимодействии излучения видимого диапазона длин волн с биологическими тканями имеют место обычные оптические эффекты, возникающие при прохождении света через неоднородную среду.

Часть падающего излучения отражается от ее поверхности. Проникающее в ткань излучение видимого диапазона подвергается

многократному рассеиванию, поглощению различными биологическими структурами и частичному преобразованию во вторичное излучение.

Величина поглощенной биотканями энергии ( $I_{\text{погл}}$ ) приближенно исчисляется как разность между падающей ( $I_0$ ) и отраженной ( $I_{\text{отр}}$ ) либо прошедшей ( $I_{\text{пр}}$ ) частями энергии светового потока:

$$I_{\text{погл}} = I_0 - I_{\text{отр}} \text{ (либо } I_0 - I_{\text{пр}}).$$

Соответственно коэфф. поглощения можно записать как:

$$\alpha = (I_0 - I_{\text{пр}}) / I_0.$$

Коэффициент пропускания:

$$\gamma = I_{\text{пр}} / I_0.$$

Поглощение света раствором вещества тем больше, чем выше концентрация вещества, толщина раствора и способность вещества поглощать свет той или иной длины волны. С учётом вышесказанного и перехода к молям закон Бугера можно записать в виде:

$$D = -\lg \alpha = \epsilon c l,$$

где  $D$  - оптическая плотность,

$\epsilon$  - молярный коэффициент поглощения,

$c$  – молярная концентрация поглощающего вещества,

$l$  – толщина поглощающего слоя.

Величина  $\epsilon$  не зависит от концентрации вещества и при отсутствии взаимодействия между молекулами является функцией длины волны света.

Оптическая плотность — мера ослабления света при прохождении прозрачными объектами или при отражении света непрозрачными

объектами. Вычисляется как десятичный логарифм отношения потока излучения, падающего на объект, к потоку излучения, прошедшего через него (отразившегося от него), то есть это есть логарифм от величины, обратной к коэффициенту пропускания (отражения):

$$D = \lg(I_0 / I_{\text{отр}}).$$

Например,  $D=4$  означает, что свет был ослаблен в  $10^4=10\,000$  раз, то есть для человека это полностью чёрный объект, а  $D=0$  означает, что свет прошёл (отразился) полностью.

Оптическая плотность  $D$ , в отличие от коэффициентов пропускания и поглощения, не пропорциональных концентрации, является величиной аддитивной. Если исследуемая система состоит из нескольких компонентов, то суммарная оптическая плотность равна сумме оптических плотностей каждого из компонентов смеси. Зависимость оптической плотности  $D$  или молярного коэффициента поглощения  $\varepsilon$  от длины волны  $\lambda$  измеряющего света называют спектром поглощения.

Спектрофотометрия широко используется в биологии для качественного и количественного анализа биомолекул. В ее основе лежит способность молекул поглощать электромагнитное излучение в ультрафиолетовом (200-400 нм), видимом (400-760 нм) и инфракрасном (>760 нм) диапазонах. Как описано выше, полная энергия молекулы состоит из электронной, колебательной и вращательной составляющих. Молекулы имеют заполненные и свободные электронные орбитали. Поглощение кванта света приводит к переходу электрона на незаполненную орбиталь с большей энергией, и молекула переходит на более высокий энергетический уровень (молекула в возбужденном состоянии), при этом увеличивается и электронная, и колебательная составляющая общей энергии молекулы (рисунок 13).

Исходя из электронной структуры молекул, можно сказать, что все они способны поглощать электромагнитное излучение. Маленькие неполимерные молекулы поглощают в ближнем (300-400 нм), среднем (200-300 нм) и дальнем (<200 нм) УФ-диапазоне.

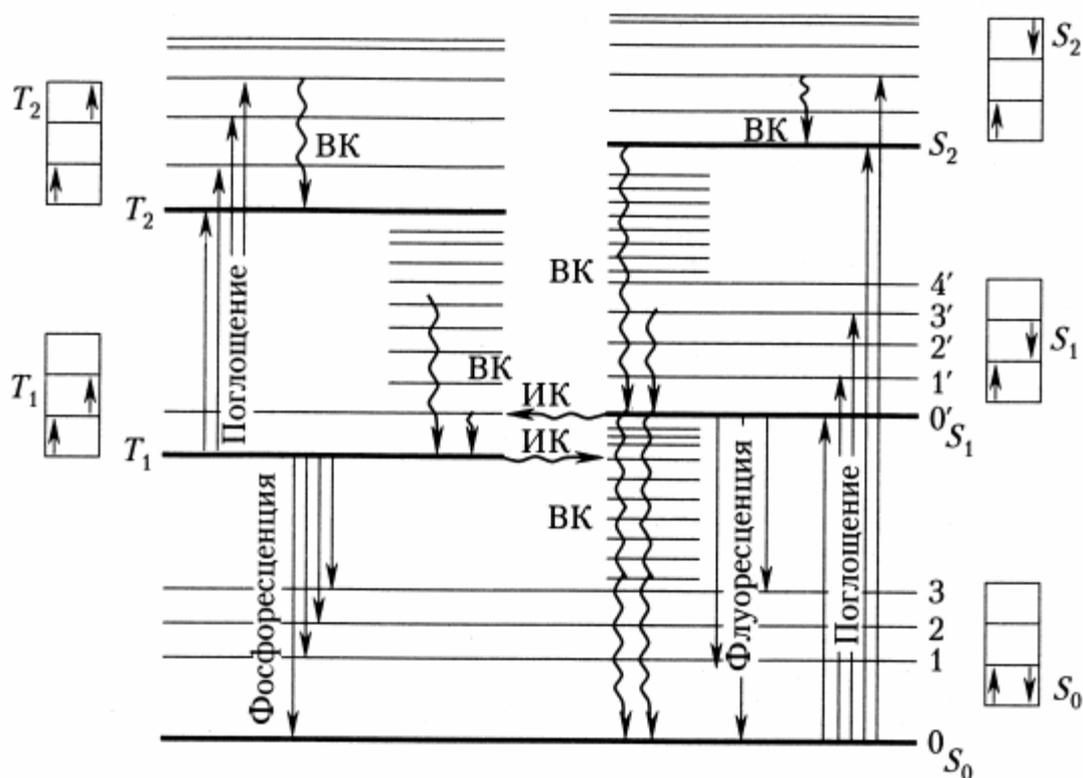


Рисунок 13 – Электронные переходы в биомолекулах (диаграмма Яблонского)  $S_0$  – основное (невозбужденное) состояние;  $S_1$ ,  $S_2$  и  $T_1$ ,  $T_2$  – возбужденные синглетные и триплетные состояния, соответственно; около каждого электронного энергетического уровня показаны направления спинов электронов в основном и соответствующем возбужденном состояниях. Жирные горизонтальные линии – электронные уровни энергии, тонкие линии (0, 1, 2... 0', 1', 2'...) – колебательные уровни, прямые стрелки – поглощательные и излучательные переходы, волнистые стрелки – безизлучательные переходы; ВК – внутренняя конверсия (переходы электрона без обращения спина); ИК – интеркомбинационная конверсия (переходы электрона с обращением спина)

Для небольших неорганических молекул хорошо разработана теория спектров поглощения. Спектры макромолекул, в том числе биомолекул, не проанализированы детально, ввиду сложности их электронной структуры. Однако это не мешает с успехом использовать оптическую спектроскопию во многих научных дисциплинах. Многие биологически важные соединения, имеющие двойные сопряженные связи, поглощают в ближнем ультрафиолетовом и видимом диапазонах, причем, чем больше в молекуле число сопряженных двойных связей, тем больше длина волны максимума поглощения данного вещества. Характеристики спектров поглощения биомолекул позволяют качественно и количественно идентифицировать вещества, исследовать механизмы биохимических реакций, особенности взаимодействия белков с лигандами, получать информацию об особенностях строения хромофорных групп, активности протетических центров белковых молекул.

Из описанного выше следует, что по сравнению с уже существующими методиками определения содержания билирубина в крови метод спектрофотометрирования русла конъюнктивы глаза является очень перспективным, так как устраняет недостатки других методик в этой области. Процедура спектрофотометрирования наиболее удобна и проста, является неинвазивной, не требует ввода транскутанного индекса и занимает всего несколько секунд, позволяя производить измерения любому медицинскому работнику.

Для данного вида определения уровня билирубина в кровеносных сосудах склеры глаза была выбрана двухволновая абсорбционная спектрофотометрия, которая позволит при помощи двух лучей (основного и луча сравнения) на основе физического свойства склеры отражать свет производить данные измерения.

### 3 Модернизация конъюнктивного микроскопа

#### 3.1 Устройство спектрофотометров

Для измерения спектров поглощения используются спектрофотометры. Несмотря на большое разнообразие таких приборов, в их основе лежат общие принципы регистрации спектров. В сканирующем спектрофотометре свет от источника проходит через монохроматор, затем монохроматический пучок проходит через кювету и его интенсивность измеряется ФЭУ, после усиления и преобразования сигнал поступает на вход компьютера.

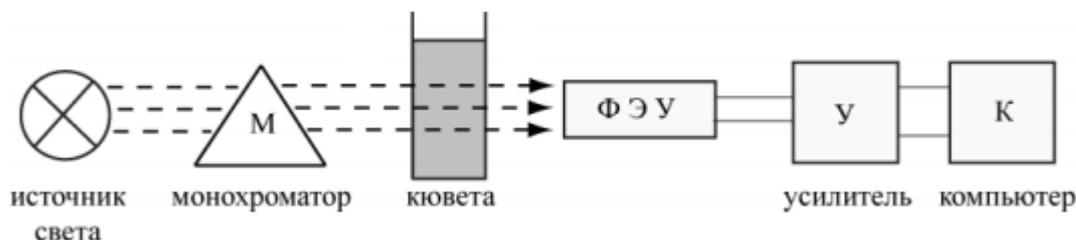


Рисунок 14 – Блок-схема однолучевого сканирующего спектрофотометра

Матричный спектрофотометр строится на базе оптического многоканального анализатора (ОМА) с диодной матрицей. В таких устройствах свет от источника проходит через кювету и поступает на ОМА, где он попадает на дифракционную решетку и происходит пространственное разложение луча света по длинам волн, затем диспергированный свет проецируется на диодную матрицу, а после измерения сигнал в цифровом виде подвергается обработке (рисунок 14).

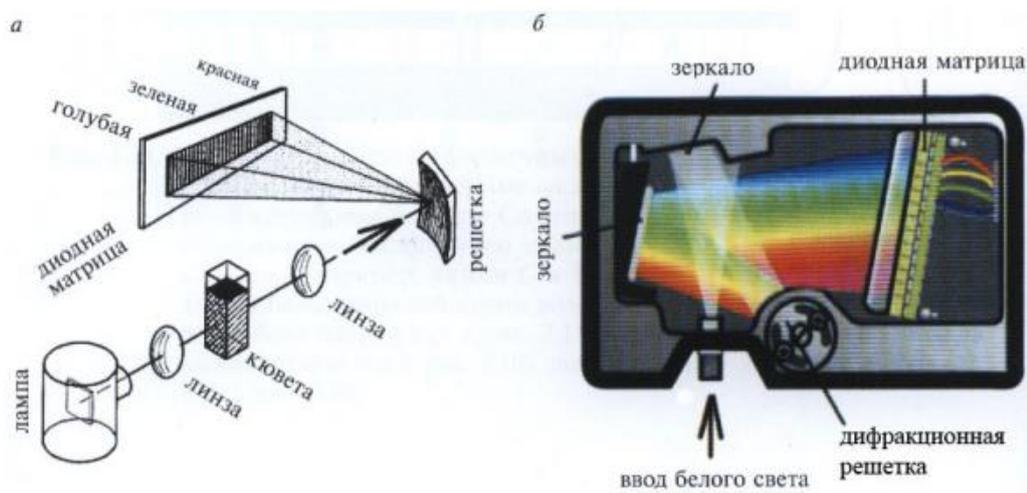


Рисунок 15 а – Схема матричного спектрофотометра (оптического многоканального анализатора – ОМА); б – Миниатюрная версия ОМА (USB 2000, Ocean Optics)

В современных однолучевых спектрофотометрах сначала записывают интенсивность света, прошедшего через кювету с растворителем во всем спектральном диапазоне. Этот сигнал запоминается и считается нулевым. Так как матричный спектрофотометр обеспечивает запись всего спектра одновременно, измерения занимают значительно меньше времени, кроме того, конструкция таких приборов значительно проще. Однако имеется ряд недостатков, среди которых более низкая чувствительность и фиксированная разрешающая способность по сравнению со сканирующими спектрофотометрами. Поэтому, быстрые измерения (например, динамические) удобно проводить на матричном спектрофотометре, а для точных измерений необходим сканирующий спектрофотометр. Существуют и другие конструкции спектрофотометров. Для увеличения точности оптических измерений используют двулучевые спектрофотометры.

Снижение интенсивности светового потока происходит не только в результате поглощения света. Другим процессом, определяющим оптическую плотность образца, является светорассеяние. Вследствие многократного отражения и рассеяния в образце (особенно в суспензиях

клеток или других мутных средах) световой пучок отклоняется от своего первоначального направления. В результате на фотоприемник попадает не весь прошедший через объект свет и измеряемая оптическая плотность повышается. Поэтому зависимость оптической плотности образца от длины волны корректнее называть спектром ослабления светового потока или спектром оптической плотности. Спектр, скомпенсированный на рассеяние или записанный на спектрофотометре, оснащенной системой сбора рассеянного света, является истинным спектром поглощения.

### 3.2 Длины волн

Основная математическая задача, решаемая в разработке данной системы измерения – это связь через коэффициент, который рассчитывается эмпирическим путем:

$$BI_L = \beta \frac{I_0 - I_G}{I_0},$$

где  $BI_L$  – значение билирубина после исследования крови мкмоль/л,

$I_0$  – прямая интенсивность света, исходящего от склеры глаза Вт/м<sup>2</sup>,

$I_G$  – интенсивность света, прошедшего через фильтр Вт/м<sup>2</sup>,

$\beta$  – коэффициент, связывающий результаты исследования.

В момент исследования происходит излучение нескольких вспышек с различными длинами волн анализируемой ткани и измерения отраженного света, производятся вычисления количества отраженного света для каждой длины волны и его приведения к значению, которое рассчитано пропорционально идентичному контрольному значению для определенной контрольной длины волны. Принцип состоит в том, что различные составляющие длин волн, образующих свет, отражаются по-разному в зависимости от составных элементов, которые свет встречает на своем пути. После тщательного и длительного анализа отраженного света было

установлено, что можно получить достаточно точный неинвазивный анализ рассматриваемой ткани.

Для спектрофотометрирования крови подходят две длины волны – 460 нм и 550 нм, именно на них гемоглобин обладает одинаковыми коэффициентами поглощения, а максимум поглощения билирубина равен 460 нм. На длине волны 550 нм билирубин не поглощает вовсе. Именно так удается при измерении уровня билирубина исключить влияние гемоглобина на показатели.

### **3.3 Конъюнктивальная микроскопия**

Биомикроскопия – метод микроскопии тканей глаза, который позволяет исследовать передний и задний отделы глазного яблока при помощи различного освещения и изменения величины изображения. Исследование проводится с помощью специального прибора - щелевой лампы, которая представляет собой комбинацию из осветительной системы и бинокулярного микроскопа.

Процедура биомикроскопии выполняется при разном освещении, зависящем от типа характера процедуры:

- прямое фокусированное освещение. Пучок света направляется на определенный небольшой участок глаза с целью обнаружить помутнения и оценить прозрачность оптических сред;

- отраженное освещение. Используется для поиска инородных тел и зон отеков. При этом происходит оценка участков, освещенных отраженным от радужной оболочки светом;

- фокусированный непрямой свет. Пучок света освещает область рядом с изучаемым участком, что позволяет провести сравнение состояний освещенного и неосвещенного участков и выявить различия между ними, что может свидетельствовать о патологиях;

- диафаноскопическое непрямое просвечивание. На границах между разными оптическими средами появляются зеркальные, отсвечивающие

участки, возникающие в результате преломления света. Метод применяется для определения участков, на которых имеются патологические изменения [13].

Основными функциями конъюнктивальной микроскопии являются экспресс-съемка микроциркуляторного русла конъюнктивы глазного яблока, также динамического определения уровня оксигенации крови, который можно применять как в условиях лечебно-профилактических учреждений, так и в экстренных случаях, и прибор является максимально щадящим для пациента.

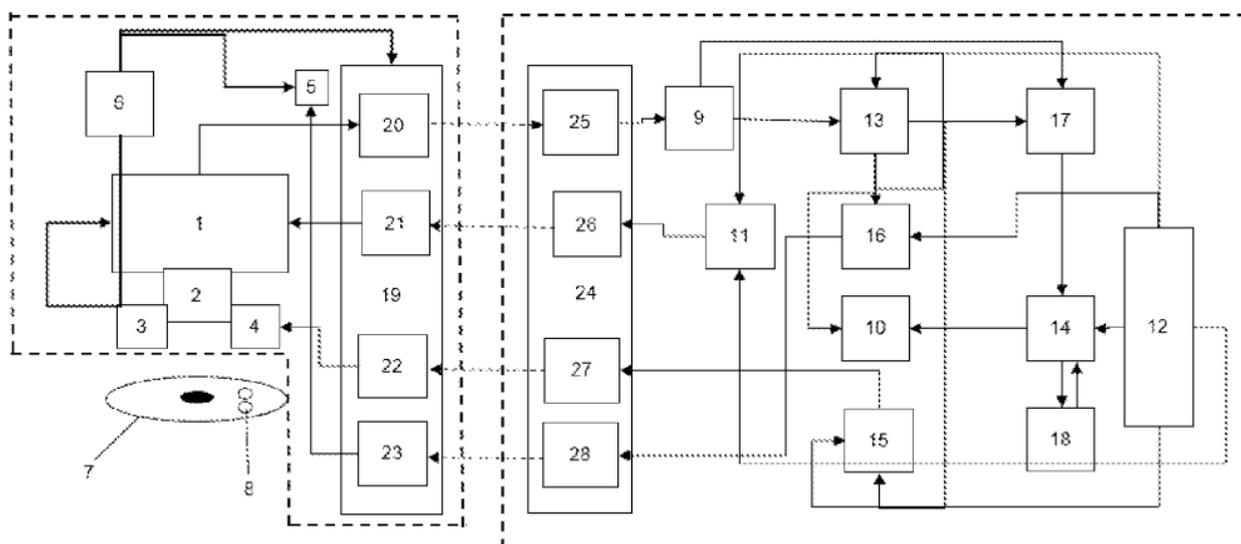


Рисунок 16 – Блок-схема беспроводного устройства для конъюнктивальной микроскопии

На рисунке 16 показаны: 1 - видеокамера, 2 - блок переноса изображений, 3 и 4 - осветители, 5 - блок оповещения, 6 - блок питания, 7 - конъюнктура глаза, 8 - световое пятно на конъюнктиве глаза 7, 9 - буфер изображения, 10 - блок отображения видео, 11 - блок управления передаточными характеристиками видеокамеры 1, 12 - блок ввода параметров, 13 - блок предварительного анализа изображений, 14 - блок морфологического анализа, 15 - блок управления яркостью осветителей, 16 - счетчик записанных кадров, 17 - блок записи изображения, 18 - блок записи

результатов морфологического анализа, 19 - узел беспроводной связи оптической системы, 20 - первый элемент беспроводной трансляции изображения, 21 - первый элемент беспроводной трансляции характеристик изображения, 22 - первый элемент беспроводного контроля характеристик освещения, 23 - первый элемент беспроводного канала оповещения, 24 - узел беспроводной связи анализатора, 25 - второй элемент беспроводной трансляции изображения, 26 - второй элемент беспроводной трансляции характеристик изображения, 27 - второй элемент беспроводного контроля характеристик освещения, 28 - второй элемент беспроводного канала оповещения.

Оптическая система располагается вблизи от глаза пациента таким образом, чтобы на выбранном участке конъюнктивы (7) были совмещены световые пятна (8) от осветителей (3). Далее выбираются параметры анализа в блоке (12) ввода параметров, и происходит периодическое включение осветителей (3) или (4). Видеокамера (1) через блоки (20,25) беспроводной трансляции изображения циклически заполняет буфер (9) изображения таким образом, что на каждую пульсовую волну в каждом цикле на один спектр освещения приходится два изображения микроциркуляторного русла конъюнктивы глаза (7), после чего происходит автоматическая смена спектров излучения и регистрация изображений [18].

На основании данной блок-схемы конъюнктивального микроскопа путем добавления диодов с длиной волны 460 нм и 550 нм в блок 3 и 4 произведена модернизация прибора для определения уровня билирубина в крови со склеральной оболочки глазного яблока с применением спектрофотометрического метода.

### **3.4 Нормативные документы**

Основным документом, описывающим нормы эксплуатации спектрофотометра, является ГОСТ Р 56092-2014.

ГОСТ Р 56092-2014. Приборы офтальмологические. Часть 2. Общие требования к офтальмологическим приборам и методы испытаний. Защита от световой опасности. Стандарт устанавливает общие требования к безопасности оптического излучения офтальмологических приборов, а также методы испытаний. Настоящий стандарт применим ко всем офтальмологическим приборам, в том числе вновь разрабатываемым, направляющим оптическое излучение непосредственно в глаз или в зону около него [8].

Таким образом, спектрофотометрическая методика для определения содержания билирубина в крови строится на основе прибора для конъюнктивальной микроскопии, что позволит путем небольших корректировок определять содержание вещества в крови, основываясь не на оптическом разрешении, а на разрешении по длине волны, что делает возможным количественный анализ.

## Заключение

В данной работе был проведён литературный обзор химических и физических свойств билирубина, выполнен сравнительный анализ существующих методик определения билирубина в крови и новой методики на основе объединения спектрофотометрии и конъюнктивальной микроскопии.

В итоге теоретического исследования были получены следующие результаты:

- разработана неинвазивная спектрофотометрическая методика определения уровня билирубина с сосудистого русла конъюнктивы, которая является более быстрой, удобной и безопасной для пациента процедурой по сравнению с уже существующими методиками и позволяет проводить измерения напрямую, что исключает необходимость ввода транскутанного индекса;

- произведен выбор необходимой длины волны для определения уровня билирубина и гемоглобина в крови, что является наиболее подходящим методом определения содержания билирубина со склеры глаза и позволяет производить измерения напрямую, что в будущем позволит определять и другие вещества, содержащиеся в крови;

- на основе анализа существующих патентов по данной теме был модернизирован конъюнктивальный микроскоп для определения содержания билирубина в крови с использованием абсорбционной спектрофотометрической методики, а также создано техническое задание, на основе которого стала реальной аппаратная реализация данного метода.

## Список использованных источников

1. Анисимов, А.А. Основы биохимии / 1986. - 551 с.
2. Башкатов, А. Н. Управление оптическими свойствами биотканей при воздействии на них осматически активными иммерсионными жидкостями / 2002. – 168 с.
3. Башкатов, А. Н., Генина, Э. А., Кочубей, В. И., Тучин, В. В. Биомедицинская оптика и спектроскопия. Оптические свойства склеры глаза человека в спектральном диапазоне / 2010. – 8 с.
4. Березов, Т.Т. Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник / 1998. – 680 с.
5. Большая Медицинская Энциклопедия (БМЭ), под редакцией Петровского Б.В., 3-е издание
6. ГОСТ ISO 10993-18-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 18. Исследование химических свойств материалов.
7. ГОСТ Р 55039-2012 Оптика офтальмологическая. Линзы очковые нефацетированные готовые. Технические требования к пропусканию света и просветляющим покрытиям. Методы испытаний.
8. ГОСТ Р 56092-2014 Приборы офтальмологические. Часть 2. Общие требования к офтальмологическим приборам и методы испытаний. Защита от световой опасности
9. Дмитриевич, И.Н., Пругло, Г.Ф., Фёдорова, О.В., Комиссаренков, А.А. Физико-химические методы анализа Часть II Оптические методы анализа / 2014. – 39 с.
10. Иродов, И.Е. Волновые процессы. Основные законы / 2012. – 457с.
11. Кешишян, Е.С., Антонов, А.Г., Байбарина, Е.Н., Антонов, В.С., Анализатор гипербилирубинемии фотометрический "Билитест"/ 1992. – 15с.
12. Кожохина, Е.В. Неинвазивные методы измерения билирубина, гемоглобина и глюкозы.

13. Косарев, С.Н., Бражалович, Е.Е. Исследование глазного дна в диагностической практике врача-офтальмолога / 2011. – 64с.
14. Костюков, Д.В., Лагутина, Н. К., Павлушкина, Л. В., Сецко, И.В., Терешков В.П. Спектральные исследования плазмы и крови новорожденных / 2011. – 6с.
15. Литвицкий, П.Ф. Клиническая физиология / 2015. – 776 с.
16. Литвицкий, П.Ф. Патофизиология: учебник / - 4-еизд., - 2009. - 496 с.
17. Овчинников, И.М. Обзор методов определения билирубина в крови и тканях человека / 2010. – 10с.
18. Патент номер 2619387 Недобыльская, Ю.П., Рева, И.В., Гумовский, А. Н., Тулаев, А.В., Бондарь, А.В., Рева, Г.В., Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Дальневосточный федеральный университет" (ДВФУ)
19. Тучин, В.В Оптическая биомедицинская диагностика / 2005. – 53с.
20. Чакчир, Б. А., Алексеева, Г. М. Фотометрические методы анализа: Методические указания — СПб.: Изд-во СПХФА / 2002.— 44с.