



УДК 621.317.799  
ББК 32.842

## АНАЛИЗАТОР СТОЙКОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

*В.К. Игнатьев, А.В. Никитин, С.В. Храмов*

Описан разработанный цифровой прибор для определения стойкости эритроцитов. Устройство позволяет регистрировать и наглядно отображать кинетику гемолиза эритроцитов по отношению к стандартному гемолитику – соляной кислоте. Проведено практическое сравнение результатов работы прибора с результатами, полученными на стандартном лабораторном оборудовании.

**Ключевые слова:** эритрограмма, гемолиз, анализатор, резистентность, эритроцит.

Для детального анализа структурных свойств эритроцитов может быть применен метод эритрограмм [9]. Эритрограмма представляет собой графическое отображение последовательного вовлечения эритроцитов различной стойкости в процесс гемолитической трансформации. Вступление эритроцитов в процесс гемолиза представляет функциональную зависимость вида  $G = f(t)$ , где  $G$  – количество гемолизированных эритроцитов в %, то есть степень гемолиза;  $t$  – время, с. Принцип метода заключается в динамической фотометрической регистрации изменения оптической плотности взвеси эритроцитов в гипосмотических условиях. Однако для практического получения эритрограмм в условиях медицинской лаборатории требуется достаточно много предварительных процедур (стерилизация пробирок, разведение растворов, термостатирование, подготовка спектрофотометра и т. д.), делающих этот метод громоздким и трудоемким. А с учетом сложной последующей обработки полученных данных для их интерпретирования и анализа этот метод неприменим для экспресс-диагностики состояния организма человека. На основе данного метода были разработаны специальные изобретения [1] и приборы [2], позволяющие устранить некоторые его недостатки. Однако портативного прибора, пригодного для применения в домашних и полевых условиях, на данный момент так и не существует.

Использование современных технологий позволило создать специальный портативный медицинский прибор, способный получать готовые графические эритрограммы. Блок-схема прибора приведена на рисунке 1.

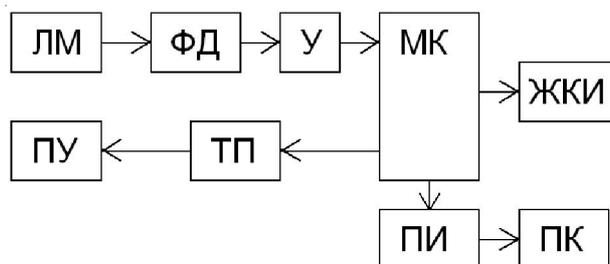


Рис. 1. Блок-схема прибора

Так как метод предполагает фотометрирование только на одной длине волны, было решено отказаться от стандартной оптической схемы, используемой в стандартных лабораторных фото-

электрических колориметрах (галогеновая лампа – система линз – светофильтр). В качестве источника светового излучения было решено использовать лазерный модуль (ЛМ) HLDP10-650 [11] с длиной волны излучения 650 нм и мощностью 3 мВт. Малая угловая расходимость лазерного пучка и монохроматичность излучения позволяет обойтись без сложной оптической системы, тем самым удешевляя прибор и делая его малогабаритным. Свет от источника, пройдя через фокусирующую линзу и кювету с исследуемым раствором, попадает на фотоприемник. Приемником излучения является кремниевый фотодиод (ФД) с большой площадью оптической поверхности ФД-24К [7]. Использование этого фотодиода существенно облегчает его установку и обеспечивает меньшую критичность к настройке оптической системы. Фотодиод подключен через усилитель (У) к встроенному АЦП микроконтроллера (МК) ADuC847 [4]. Микроконтроллер обрабатывает полученные значения по алгоритму, описанному ниже, и в режиме реального времени строит на графическом жидкокристаллическом индикаторе (ЖКИ) график зависимости оптической плотности от времени. По окончании процесса гемолиза на ЖКИ выводится готовая графическая эритрограмма и основные параметры гемолитического процесса. В приборе также реализована возможность обмена данными с персональным компьютером (ПК) с помощью преобразователя интерфейсов (ПИ), что еще более повышает комфортность работы с большим потоком данных.

Внутри кюветного отделения размещено специально разработанное для этого прибора перемешивающее устройство (ПУ). Данное устройство обеспечивает равномерное распределение крови в физиологическом растворе и гемолитике, ускорение нагревания или охлаждения (термостатирование) и обеспечивает равномерное распределение температуры по всему исследуемому раствору. Перемешивание осуществляется возвратно-поступательным движением кюветодержателя. Частота встряхивания 5–10 Гц в зависимости от режима работы прибора. Амплитуда движения платформы кюветодержателя 30 мм. Перемешивающее устройство реализовано с помощью двигателя постоянного тока с червячной передачей. При этом кюветодержатель движется по направляющим за счет вращения червячного винта. В кюветодержатель устанавливаются прямоугольные кюветы объемом 5 см<sup>3</sup> и рабочей длиной оптического пути 10 мм.

Принципиальная схема прибора представлена на рисунке 2. Фотодиод ФД-24К включен по стандартной схеме с обратным смещением. Значение сопротивления резистора R1 было выбрано таким образом, чтобы обеспечить наилучший режим смещения на фотодиоде. Ток фотодиода вызывает в нагрузке (R2) падение напряжения, пропорциональное величине светового потока, проходящего через исследуемый раствор. В электрической схеме предусмотрена возможность изменения чувствительности за счет изменения сопротивления нагрузки фотодиода. Далее напряжение усиливается операционным усилителем LM358 (DA1) [5], включенным по схеме неинвертирующего усилителя. Сопротивления, задающие коэффициент усиления, выбраны таким образом, чтобы выходное напряжение было достаточным для нормальной работы микроконтроллера.

Усиленный сигнал оцифровывается внутренним АЦП микроконтроллера ADuC847 (DD1). Микросхема этой серии является законченным контроллером для интеллектуальных датчиков, включающим в себя сигма-дельта-АЦП высокого разрешения, гибкий входной мультиплексор на 10/8 разрядов, быстрый 8-разрядный контроллер и встроенную FLASH/EE память программ и данных.

В состав микроконвертера ADuC847 включен 10-канальный 24-разрядный сигма-дельта-АЦП. Кроме того, в составе микроконвертера имеется встроенный усилитель с программно управляемым коэффициентом передачи и цифровой фильтр. Все перечисленное позволяет использовать микроконвертер для измерения низкочастотных сигналов в широком динамическом диапазоне напряжений.

Микроконтроллер работает от кварцевого резонатора 32 КГц, а высокая частота 12,58 МГц вырабатывается системой ФАПЧ. Высокая частота проходит через программно-управляющий делитель, с которого снимается частота для работы микропроцессорного ядра. Микро-

процессорное ядро является оптимизированным одноцикловым ядром 8052, дающим производительность до 12,58 MIPS, при выполнении команд, совместимых с МК 8051. ADuC847 содержит 62 КБ внутренней неразрушаемой FLASH/EE памяти программ, 4 КБ внутренней неразрушаемой FLASH/EE памяти данных и 2304 Б внутренней памяти данных с произвольным доступом (RAM).

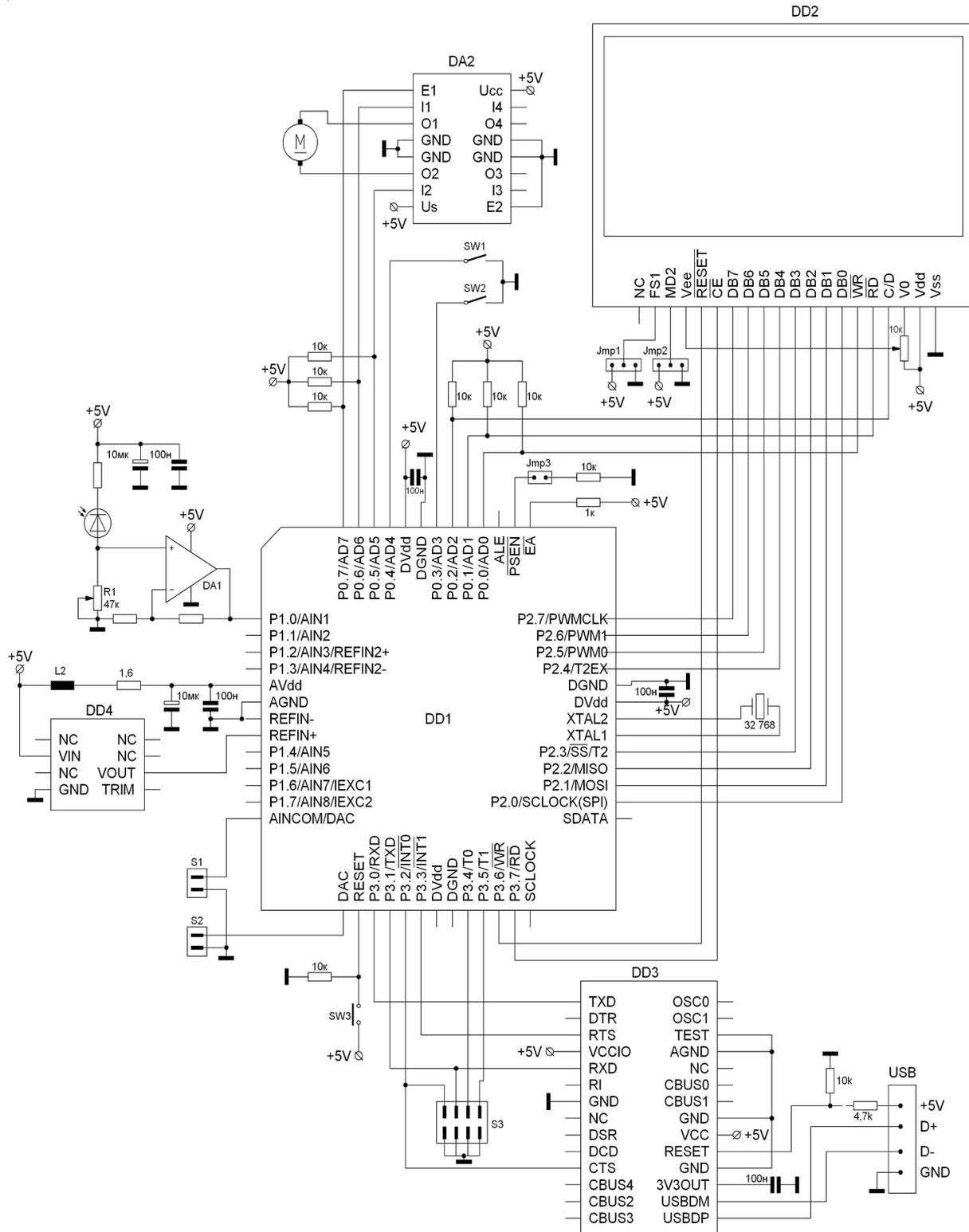


Рис. 2. Принципиальная схема анализатора стойкости эритроцитов

АЦП работает в однополярном режиме. Опорное напряжение для АЦП (+2,5 В) задается с помощью микросхемы ISL21007 (DD4) [6], характеризующейся низким уровнем шума на выходе – с амплитудой не более 4 мкВ и нестабильностью выходного напряжения не более 0,5 мВ.

Используемый в данном приборе ЖКИ WG240128A [10] (DD2) разрешением 240 на 128 точек, имеет в составе встроенный контроллер управления ЖКИ T6963C [8]. LCD контроллер T6963C фирмы TOSHIBA является одним из наиболее популярных контроллеров для использования в небольших графических дисплеях. T6963 использует простую 8-битную шину данных для передачи команд и данных, как на, так и от дисплея. После инициализации контроллер готов к приему и отображению информации. Информация должна быть в соответствующем виде, либо бит-матрица графических данных, либо текстовые данные в псевдо-ASCII-формате. Текстовая информация может быть записана в псевдо-ASCII-формате и отображается знаком с матрицей  $5 \times 7$ . Графика и текст пишутся отдельно. Контроллер имеет отдельные зоны или страницы в памяти встроенной RAM. Существует возможность программно выбирать один из трех путей объединения текстовых и графических страниц на дисплее, или единый режим отображения, графический или текстовый. В предложенной схеме на рисунке 2 8051 микропроцессор соединен с контроллером LCD через параллельный порт входов/выходов.

Для подключения созданного прибора к персональному компьютеру было решено использовать получившую широкое распространение шину USB. Для реализации подключения используется микросхема FTDI FT232RL [12] (DD3). Данная микросхема является высокоинтегрированным переходником USB – RS232, позволяющим, используя минимум внешних компонентов (пассивные компоненты), организовать последовательный обмен данными с шиной USB компьютера.

Двигатель перемешивающего устройства управляется с помощью четырехканального полумостового токового переключателя KP1128KT3 [13] (DA2). Входы микросхемы согласуются с TTL-логикой, что позволяет управлять ей с помощью микроконтроллера с 5-вольтовым питанием без дополнительных преобразователей уровня. Программно осуществляется переключение направления и задается длительность вращения двигателя, тем самым реализуются возвратно-поступательные движения кюветодержателя. Частота помешивания задается микроконтроллером в зависимости от режима работы прибора (от 5 до 10 Гц). Кюветодержатель может фиксироваться на направляющих в двух положениях. Первое положение – фиксирование кюветы в световом пучке. Второе положение удобно для работы с кюветой при открытой крышке кюветного отделения. Фиксирование кюветодержателя осуществляется на основе данных, полученных от датчиков положения (контактные концевые датчики без фиксации SW1 и SW2).

Работает прибор по следующему алгоритму. Перед измерением производится настройка нуля с помощью переменного резистора R2, являющегося нагрузкой для фотодиода. После этого прибор готов к измерению. В кюветное отделение вставляется кювета с 2 мл физиологического раствора. На ЖКИ высвечивается измеряемая в режиме реального времени оптическая плотность раствора и подсказка о примерном необходимом объеме крови, необходимой для установления исходной концентрации эритроцитов (для нормальной крови это разведение 1 : 1000). При этом для ускорения процесса разведения можно производить помешивание кюветы с помощью нажатия кнопки на лицевой панели прибора. После достижения значения 0,7 по шкале оптической плотности на ЖКИ отображается информация о необходимых дальнейших действиях оператора. Из кюветы, содержащей теперь стандартную концентрацию эритроцитов, специальной дозируемой пипеткой отбирается 2 мл, излишек жидкости удаляется, а отобранные 2 мл взвеси эритроцитов возвращаются в кювету.

Отдельной пипеткой отбирается 2 мл стандартного гемолитика (0,004 N HCl) и быстро вводится в кювету. После введения необходимо нажать кнопку на лицевой панели прибора. На 3 с включается перемешивающее устройство для лучшего разведения гемолити-

ка и взвеси эритроцитов. В этих стабильных условиях начинается распад эритроцитов, который измеряется по падению светорассеивания их взвеси. После этого начинается процесс измерения оптической плотности исследуемого раствора. В режиме реального времени на графическом ЖКИ отображается график зависимости оптической плотности от времени. Каждые 2 с происходит помешивание кюветы и затем происходит измерение оптической плотности. АЦП микроконтроллера измеряет входное напряжение, пропорциональное световому потоку, прошедшему через кювету. Измерение производится 5 раз и затем считается среднее значение. Это сделано для уменьшения влияния сгустков крови, присутствующих в исследуемом растворе.

Отсчеты ведутся до тех пор, пока не будет получено 2–3 совпадающих показаний, что служит признаком конца гемолиза (для нормальной крови это 6,5–7 минут от введения гемолита). В результате в памяти микроконтроллера имеется ряд значений оптической плотности  $D[n]$ , где  $n$  – номер отсчета времени, в который произведено измерение оптической плотности. Следующий этап – математическая обработка полученных данных, имеет целью получение из цифровых данных оптической плотности распределения эритроцитов по стойкости. В результате на ЖКИ строится график. По оси абсцисс откладывается время гемолиза, являющееся мерой стойкости, по оси ординат – процент эритроцитов, подсчитанный по формуле:

$$\%Э[n] = \frac{D[n] - D[n+1]}{\sum_{k=0}^N (D[k+1] - D[k])},$$

где  $N$  – общее количество произведенных измерений.

На рисунке 3 представлены эритрограммы здорового человека, полученные с помощью стандартного лабораторного фотоколориметра КФК-3 [14] (а) и с помощью разработанного прибора (б).

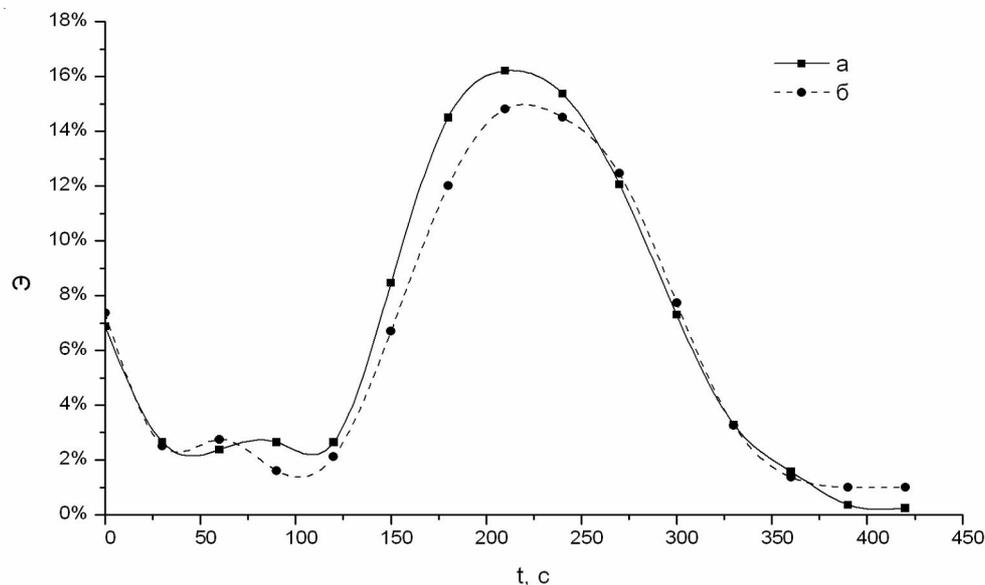


Рис. 3. Эритрограммы здорового человека, полученные с помощью фотоколориметра КФК-3 (а) и с помощью данного прибора (б)

Из рисунка 3 видно, что эритрограммы, полученные с помощью разработанного прибора, в сравнении со стандартным лабораторным фотоколориметром, воспроизводятся удовлетворительно. Для измерения статистических погрешностей получаемых эритрограмм были измерены 20 эритрограмм одного и того же человека в течение 6 часов. Результаты измерения приведены на рисунке 4.

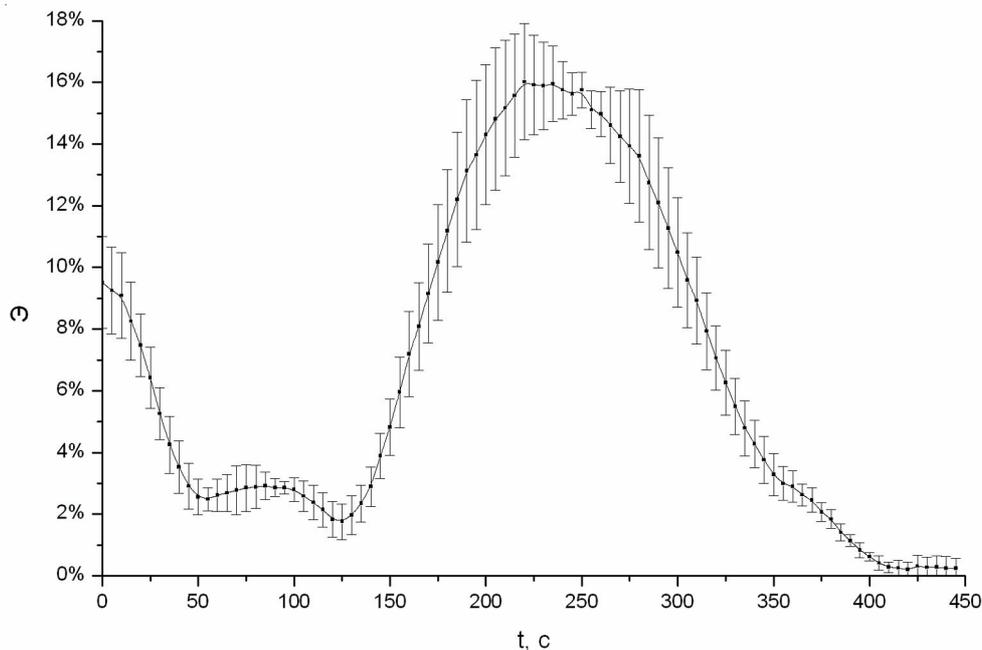


Рис. 4. Статистическая обработка 20-ти эритрограмм одного человека

Погрешности и расхождения в показаниях вызваны характерными погрешностями метода фотометрирования крови и погрешностями ручного разведения проб [3]. Из-за этого и ряда других причин, свойственных данному методу, показания прибора нельзя считать эталонными. Также были измерены температурные зависимости скорости падения оптической плотности крови под действием гемолитика (рис. 5).

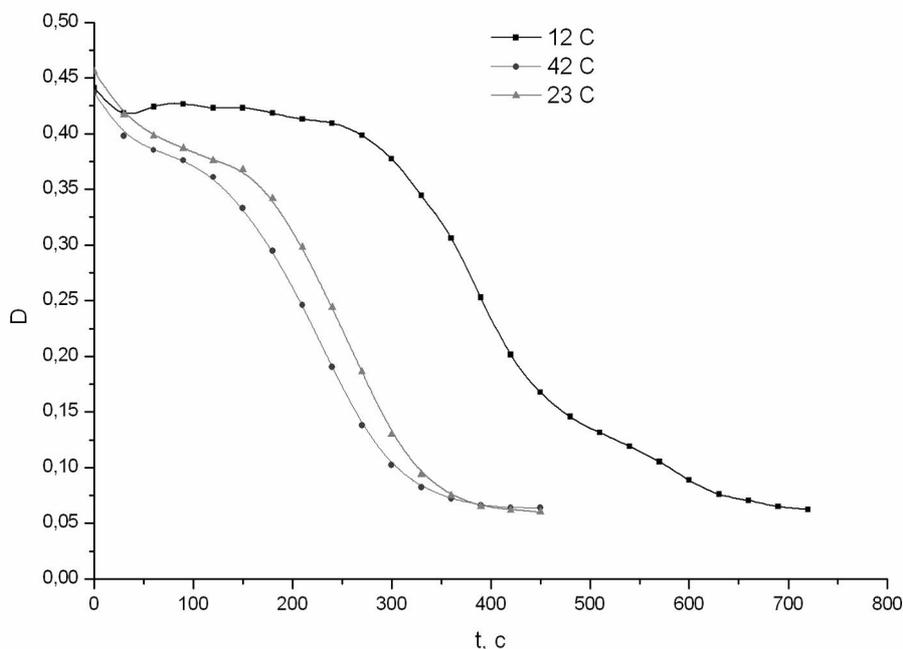


Рис. 5. Зависимость скорости падения оптической от температуры исследуемого раствора

Каждый график отображает эритрограмму, снятую при фиксированной температуре и усредненную по пяти реализациям. Из этих графиков видно, что уменьшение температуры по сравнению

с указанной в методике (24 °С) очень сильно замедляет процесс гемолиза. Это, с одной стороны, дает преимущество в детальности эритрограммы – чем дольше идет гемолиз, тем с большей точностью можно разделить эритроциты на фракции, а с другой – требует тщательного анализа и пересмотра накопленных данных по чтению эритрограмм. В любом случае стабилизация температуры необходима – это позволит получить хорошо воспроизводимые кинетики гемолиза.

Все вышесказанное приводит к выводу, что данный прибор позволяет применить метод, разработанный в середине прошлого века как в современных лабораториях, так и в полевых и домашних условиях. Экспресс-оценка состояния организма, полученная с помощью прибора, может применяться для быстрой диагностики параметров как в спортивной, так и клинической медицине.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голенда, И. Л. Автоматизированная многопараметрическая оценка состояния здоровья жителей Кузбасса в зависимости от окружающей среды / И. Л. Голенда, О. В. Овчинникова, Р. Г. Драпезо, Е. М. Гурьянова // Экологические проблемы угледобывающей отрасли в регионе при переходе к устойчивому развитию : тр. Междунар. науч.-практ. конф. – Кемерово, 1999. – Т. 2. – С. 255–262.
2. Голенда, И. Л. Свидетельство РФ № 2000610333 от 25.04.2000 г. «Об официальной регистрации программы для ЭВМ: Математическое моделирование функционального состояния организма (“Гемолиз”)» / И. Л. Голенда, А. И. Голенда, В. И. Иванов [и др.].
3. Наумов, В. Ю. Классификация погрешностей гематологических исследований / В. Ю. Наумов, Ю. П. Муха // Радиотехника. Биомедицинская радиоэлектроника. – 2007. – № 5. – С. 37–44.
4. Описание микроконтроллера ADUC847. – Режим доступа: [http://www.analog.com/static/imported-files/data\\_sheets/ADUC845\\_847\\_848.pdf](http://www.analog.com/static/imported-files/data_sheets/ADUC845_847_848.pdf) (дата обращения: 27.09.2009).
5. Описание операционного усилителя LM358. – Режим доступа: <http://www.national.com/ds/LM/LM158.pdf> (дата обращения: 27.09.2009).
6. Описание источника опорного напряжения ISL21007. – Режим доступа: <http://www.intersil.com/data/fn/FN6326.pdf> (дата обращения: 29.12.2009).
7. Основные технические данные фотодиода ФД-24К. – Режим доступа: <http://www.rezonance.ru/news/tehinfo/277.pdf> (дата обращения: 27.09.2009).
8. Т6963. БИС управления графическими ЖКИ. Техническое руководство. – Режим доступа: <http://www.gaw.ru/html.cgi/txt/lcd/chips/t6963/index.htm> (дата обращения: 27.09.2009).
9. Терсков, И. А. Метод химических (кислотных) эритрограмм / И. А. Терсков, И. И. Гительзон // Биофизика. – 1957. – Т. 11. – Вып. 2. – С. 259–266.
10. Техническое описание жидкокристаллического индикатора WG240128. – Режим доступа: <http://www.winstar.com.tw/download.php?ProID=71> (дата обращения: 27.09.2009).
11. Техническое описание лазерного модуля HLDPM10-650. – Режим доступа: <http://pmo.fs.cvut.cz/wiki/images/f/fe/Hldpm10.pdf8> (дата обращения: 27.09.2009).
12. Техническое описание микросхемы преобразователя интерфейсов USB-UART FT232RL. – Режим доступа: [http://www.ftdichip.com/Documents/DataSheets/DS\\_FT232R.pdf](http://www.ftdichip.com/Documents/DataSheets/DS_FT232R.pdf) (дата обращения: 27.09.2009).
13. Техническое описание 4-канального полумостового коммутатора KP1128KT3. – Режим доступа: <http://www.sitsemi.ru/kat/1128kt3.pdf> (дата обращения: 27.09.2009).
14. Фотометр фотоэлектрический КФК-3-01-«ЗОМЗ» : руководство по эксплуатации. БШ 2.853.021-02 РЭ. – Режим доступа: <http://varban.airbase.ru/oldairbase/rtfm/kfk3-01.pdf> (дата обращения: 27.09.2009).

### THE ANALYZER OF RESISTANCE OF ERYTHROCYTES

*V.K. Ignatjev, A.V. Nikitin, S.V. Khrarov*

The portable digital one-wavelength photometer with registration of the chemical hemolysis of erythrocytes. It was a comparison of the obtained erythrograms with a standard laboratory method.

**Key words:** erythrograms, hemolysis, a digital analyzer, osmotic resistance, erythrocyte.