

РАДИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В МЕДИЦИНЕ И ЭКОЛОГИИ

УДК 539.2 + 621.315.592

ВЛИЯНИЕ РАДИАЦИОННОЙ СИЛЫ НА ПРОЦЕСС ОСЕДАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ

© 2011 г.

С.Н. Гурбатов, А.В. Клемина

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

annet17@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.04.2011

Разработан безреагентный акустический способ определения скорости оседания эритроцитов в цельной крови человека, основанный на измерениях скорости ультразвука в цельной крови в зависимости от времени. Проведены лабораторные и клинические испытания способа. Выявлена высокая степень корреляции с традиционными методами.

Ключевые слова: ультразвуковой интерферометр, радиационная сила, скорость оседания эритроцитов.

Введение

Еще в XIX веке было известно, что объект в звуковом поле подвергается воздействию радиационной силы. В классическом эксперименте Kundt и Lehman частицы пыли в трубке подвергали воздействию поля стоячей волны [1]. Частицы пыли собирались в нескольких линиях вдоль трубки, разделенных расстоянием, соответствующим половине длины звуковой волны. Однако только в последние десятилетия это явление нашло широкое применение [2–4]. Радиационная сила возникает из-за нарушения непрерывности фазы распространения волны, например, из-за наличия в среде частиц, клеток, пузырьков воздуха, что приводит к возникновению зависящего от положения объекта акустического потенциала [5]. Суспендированные частицы имеют тенденцию концентрироваться в местах с минимальной потенциальной энергией (рис. 1) [6].

Радиационная сила является результатом (следствием) нелинейного эффекта усредненного по времени радиационного давления вокруг объекта в звуковой волне, известного также как усредненное по времени акустическое давление Бернулли. Следуя теоретическим выкладкам Горькова, который получил полезную потенциальную функцию U для средней по времени радиационной силы, действующей на сферический объект радиуса r в поле стоячей волны [7]

$$U = V \left(f_1 E_n - \frac{3}{2} f_2 E_{кин} \right), \quad (1)$$

где V – объем сферы $\left(\frac{4\pi r^3}{3} \right)$, E_n и $E_{кин}$ – усредненные по времени плотности потенциальной и кинетической энергий. Плотности энергии определяются выражениями:

$$E_n = \frac{\langle p^2 \rangle}{2\rho_0 c_0^2}, \quad E_{кин} = \frac{\rho \langle v^2 \rangle}{2}, \quad (2)$$

где $\langle p^2 \rangle$ и $\langle v^2 \rangle$ – среднеквадратические флуктуации падающего давления и скорости акустического поля в точке, где находится объект, ρ_0 и c_0 – плотность и скорость звука (фазовая) в среде.

Скорость v акустического поля относится к скорости осциллирующего элемента среды акустической волны. Множители f_1 и f_2 являются безразмерными и даются выражениями:

$$f_1 = 1 - \frac{\rho_0 c_0^2}{\rho c^2}, \quad f_2 = \frac{2(\rho - \rho_0)}{2\rho + \rho_0}, \quad (3)$$

где ρ и c – плотность и скорость звука в веществе сферы. В случае твердой сферы $f_1 = f_2 = 1$. Уравнение (1) справедливо при определенных условиях для размера сферы, а именно: $r \gg \lambda$, $r \gg s_0$, где λ – длина волны звука в среде и s_0 – амплитуда смещения элемента среды.

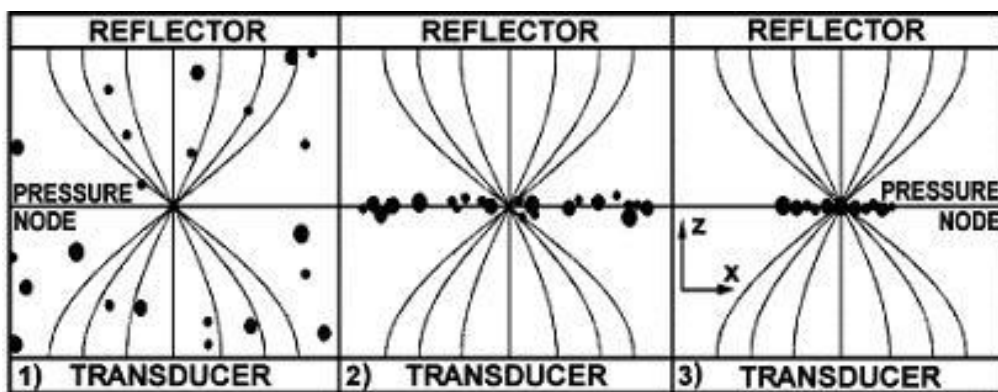


Рис. 1. Схема распределения эритроцитов в поле стоячей акустической волны под действием радиационной силы с течением времени



Рис. 2. Акустический безреагентный анализатор «БИОМ»

Схематическое изображение акустического датчика

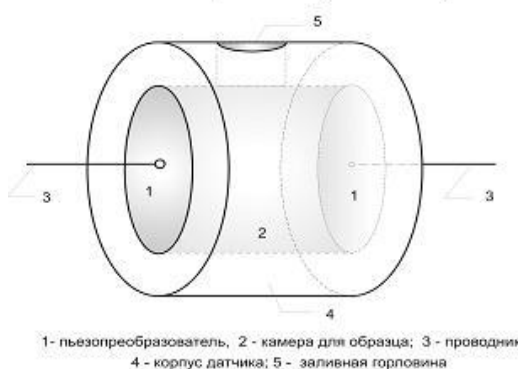


Рис. 3. Схематическое изображение акустического датчика

Если геометрия акустического поля известна, акустическая радиационная сила, действующая на сферический объект, может быть получена из выражения: $F = -\nabla U$.

Стабильная точка расположена в локальном минимуме потенциальной энергии, удовлетворяя условию $F = 0$. Если рассматривать действие только аксиальных сил, для гармонического звукового источника воздействия $F = F(z)$ дается выражением:

$$F(z) = -\frac{\partial}{\partial z} U(z) = \frac{\pi}{2\rho c_0^3} \left(f_1 + \frac{3}{2} f_2 \right) V p_0^2 v \sin\left(2\pi \frac{z}{\lambda/2} \right). \quad (4)$$

Целью настоящей работы является экспериментальное изучение влияния радиационной силы в поле стоячей ультразвуковой волны в интерферометре постоянной длины малого объема на эритроциты в цельной крови человека и определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) как важного параметра общего анализа крови на основании акустических измерений.

Методика

Метод акустического интерферометра постоянной длины, реализованный в акустическом анализаторе биологических сред (рис. 2), разработан и изготавливается фирмой «БИОМ» под руководством Клемина В.А.

Работа прибора основана на том, что столбик исследуемой жидкости, находящейся в цилиндрической полости между двумя пьезопреобразователями (рис. 3), является механическим резонатором, собственные частоты которого линейно связаны со скоростью ультразвука в исследуемой среде. Измерение скорости ультразвука в жидкости, заполняющей ячейку, сводится к определению частоты заданного резонансного пика по максимуму амплитудно-частотной характеристики или по точке перегиба на фазово-частотной характеристике.

Одновременно измеряются ширина резонансного пика на уровне 0.707 от максимума амплитуды или крутизна фазово-частотной характеристики в точке перегиба, связанные с величиной поглощения ультразвука. В приборе

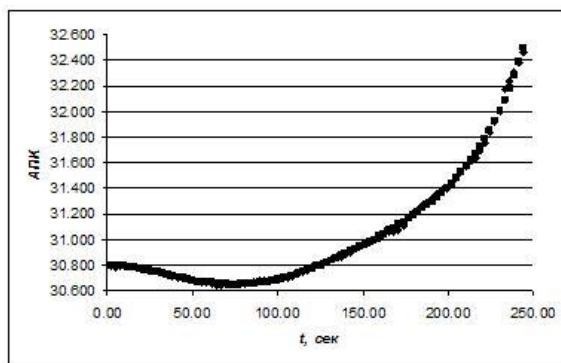


Рис. 4. Временная зависимость акустического параметра при нормальном значении СОЭ (СОЭ = 12)

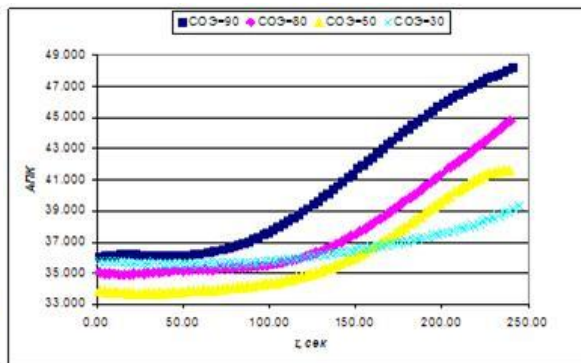


Рис. 5. Временная зависимость АПК при патологических значениях СОЭ

ре «БИОМ» применяется метод интерферометра постоянной длины, основанный на использовании плоских стоячих ультразвуковых волн в цилиндрическом резонаторе. Термостатирование акустических ячеек выполняет специализированный ультратермостат. Точность поддержания температуры в ячейках объемом 80 мкл составляет 0.005°C . Погрешность измерения относительной скорости ультразвука в сыворотке крови на приборе «БИОМ» составляет величину порядка $3 \cdot 10^{-5}$.

Калибратором для данного прибора является дистиллированная вода, которая помещается в акустические ячейки двух измерительных устройств прибора, находящихся соответственно при двух конкретных температурах. В термостатируемых ячейках поддерживается строго заданная температура из диапазона $15\text{--}40^{\circ}\text{C}$. На акустические датчики подается сигнал с частотой, изменяющейся на 10 МГц, из любой части диапазона $2\text{--}20$ МГц (например, от 5.0 до 15.0 МГц). В результате обработки данных, получаемых с пьезоприемников акустических датчиков, в памяти компьютера фиксируются центральные частоты всех резонансных пиков в выбранном диапазоне частот для дистиллированной воды. Затем в ячейку прибора помещают исследуемую биологическую среду (цельная кровь), а в памяти компьютера фиксируются центральные частоты всех резонансных пиков для этой среды. Компьютер вычисляет среднюю разность частотного расстояния между резонансными пиками и номер выбранного резонансного пика. Затем компьютером выбираются значения центральных частот резонансных пиков одного и того же номера для дистиллированной воды и исследуемой среды. Скорость ультразвука может быть вычислена по формуле [8]:

$$V^{(s)} = \frac{2lf_j^{(s)}}{j}, \quad (5)$$

где $V^{(s)}$ – скорость в исследуемой биологической среде, $f_j^{(s)}$ – резонансные частоты в исследуемой биологической среде, j – номер резонансного пика, l – эффективная длина ячейки. Также прибор дает возможность зафиксировать временную зависимость относительной скорости ультразвуковых волн в цельной крови.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) – показатель, входящий в общий анализ крови. Определение этого показателя активно проводится во всем мире с начала 20-х годов двадцатого века. Международным комитетом по стандартизации в гематологии для определения СОЭ рекомендован метод Вестергрена. Однако в нашей стране более распространенным является метод Панченкова. В данном методе используют пипетки внутренним диаметром 1 мм, которые заполняют до высоты 100 мм стабилизированной капиллярной кровью. Через час после заполнения измеряют высоту столбика чистой плазмы над столбиком оседающей красной крови и регистрируют значение СОЭ в мм/час. Метод Панченкова не удовлетворяет современным требованиям к лабораторным исследованиям, так как он имеет много источников ошибок, не автоматизирован, время анализа составляет порядка 1 часа.

Результаты и обсуждение

В качестве материала исследования использовалась цельная кровь пациентов Нижегородского областного клинического диагностического центра, взятая из локтевой вены натощак в специальные пробирки с антикоагулянтом (10% трилон В). К 0.4 мл этой крови добавлялся 0.1 мл 5% раствора цитрата натрия (это стандартное соотношение 4:1 при определении

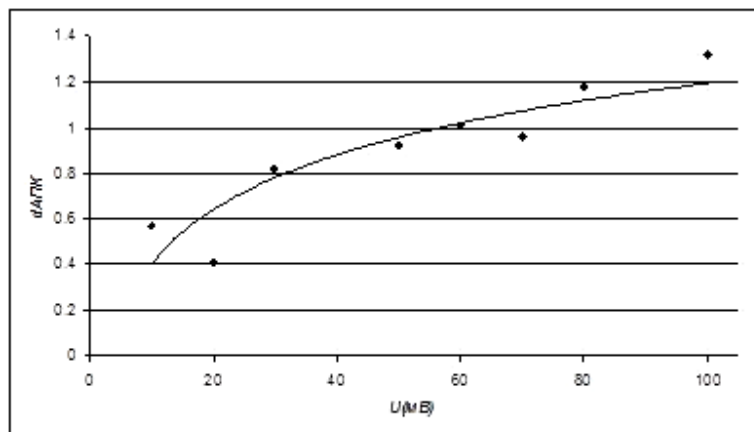
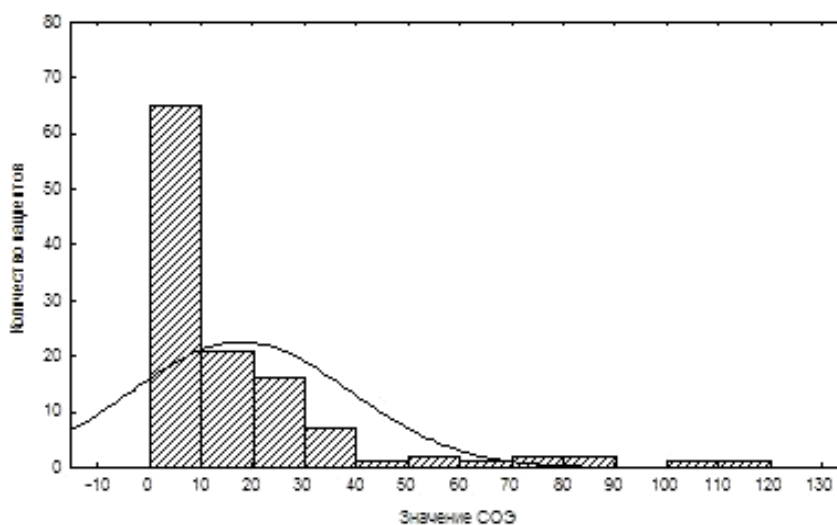
Рис. 6. Зависимость $dAPK$ от амплитуды сигнала

Рис. 7. Распределение данных по СОЭ (метод Вестергрена)

СОЭ). Параллельно у этих пациентов забиралась кровь в специальные пробирки для определения СОЭ по методу Вестергрена [9].

Под влиянием радиационной силы эритроциты собираются в узлы стоячей ультразвуковой волны и интенсивно агрегируют. Нормальный эритроцит — это отрицательно заряженная частица, поэтому агрегации в узлах стоячей ультразвуковой волны противостоит сила электрического отталкивания, и эритроциты оседают как отдельные частицы. Результирующее поведение эритроцитов крови в поле стоячей ультразвуковой волны регистрируется как изменение во времени акустического параметра крови (АПК):

$$APK = \left(\frac{v_{kp}}{v_{H_2O}} - 1 \right) \cdot 10^3, \quad (6)$$

v_{kp} — скорость ультразвуковых волн в цельной крови.

В случае нормального значения СОЭ (от 2 до 20) зависимость АПК от времени имеет вид,

представленный на рис. 4. При патологии (воспалении в организме, опухоли, артрите и т.д.) эритроциты теряют заряд и агрегируют в узлах стоячей ультразвуковой волны интенсивно, в этом случае изменение во времени акустического параметра имеет вид, представленный на рис. 5.

При исследовании явления ускорения оседания эритроцитов при воздействии радиационной силы на эритроциты цельной крови человека была обнаружена существенная зависимость величины изменения во времени акустического параметра $dAPK$ от амплитуды сигнала, подаваемого на пьезопреобразователь. Данная зависимость представлена на рис. 6, из которого видно, что, начиная с определенной амплитуды сигнала, эритроцитарные агрегаты разрушаются, и процесс оседания эритроцитов замедляется.

Для статистического подтверждения обнаруженных закономерностей были проведены

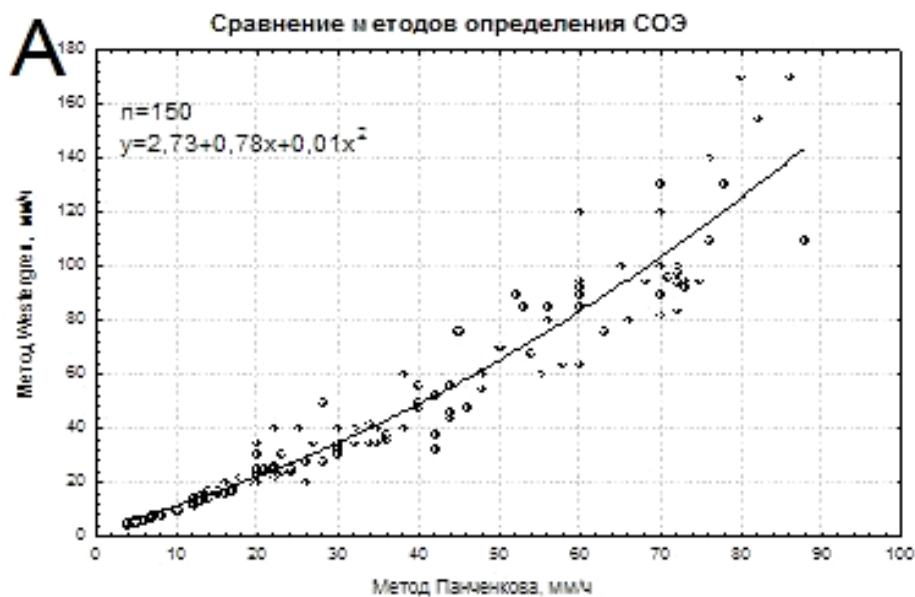


Рис. 8. Попарное сравнение данных измерений скорости оседания эритроцитов
Скорость оседания эритроцитов, мм/час

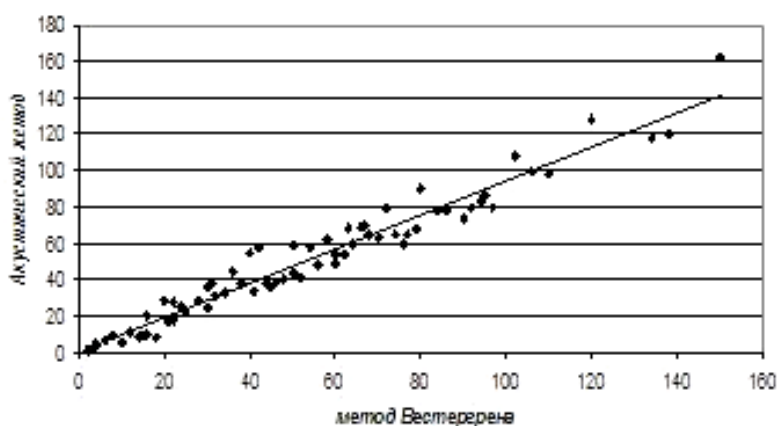


Рис. 9. Корреляционная зависимость акустического метода и метода Вестергрена

исследования образцов крови $N \sim 300$ пациентов Нижегородского областного диагностического центра тремя методами: Вестергрена, Панченкова и акустическим. Результаты, полученные каждым из методов, не имеют нормального, или гауссова, распределения, например, распределение данных, полученных методом Вестергрена, представлено на рис. 7.

Аналогичные распределения получены для результатов определения СОЭ методом Панченкова и акустическим методом. Поэтому обработка данных с целью сравнения методов проводилась непараметрическими методами. Был выбран традиционный 5% уровень значимости (p -level) для попарного сравнения методов. Данные статистической обработки попарного сравнения методов по медианному тесту представлены в таблице.

Таблица

	Кол-во пациентов	p-level
W & A	300	0.299758
W & P	300	0.009679

В таблице приняты следующие обозначения:

W – метод Вестергрена, A – акустический метод, P – метод Панченкова.

Из таблицы видно, что данные, полученные методом Панченкова, достоверно отличаются от данных, полученных методом Вестергрена (p -level = 0.9% < 5%), а акустический метод достоверно совпадает с методом Вестергрена (p -level = 29.9% > 5%).

Были проведены эксперименты по попарному сравнению метода Панченкова и метода Вестергрена, а также метода Вестергрена и разработанного акустического метода. Приведем

график сравнения данных измерений СОЭ по методу Панченкова и методу Вестергрена (рис. 8). Видно, что данные двух методов различаются очень значительно, особенно для патологических значений СОЭ. При увеличении значений СОЭ метод Вестергрена дает более высокие цифры (до 200 мм/ч), метод же Панченкова имеет измерительную шкалу лишь до 100 мм/ч.

На рис. 9 представлен график сравнения данных, полученных на приборе «БИОМ» и методом Вестергрена.

Коэффициент корреляции для данной зависимости составляет 0.94 ($N \sim 300$ пациентов).

При разработке акустической методики определения СОЭ была определена оптимальная интенсивность ультразвуковой волны, которая минимизировала время определения СОЭ. Оно составило 120 с для одного образца, при двухканальном варианте определения СОЭ на СОЭ-метре «БИОМ» время выполнения анализа составляло 70 с в расчете на одного пациента.

Расходные материалы для определения СОЭ акустическим методом не требуются, в то время как специальная пробирка для определения СОЭ по методу Вестергрена стоит не менее 25 рублей, и длительность определения СОЭ составляет 1 час для 10 пациентов, т.е. 6 мин в расчете на одного пациента.

Выводы

Полученные зависимости СОЭ от измеряемых акустических параметров позволили предложить новый акустический способ определения СОЭ за интервал времени порядка 120 с в отличие от традиционного метода, для которого требуется не менее 1 часа.

Клинические испытания акустического метода определения СОЭ были проведены в ведущих медицинских центрах России. Испытания подтвердили воспроизводимость и правильность акустического метода определения

СОЭ. Акустический метод определения СОЭ на акустическом анализаторе «БИОМ» рекомендован к применению в клинических лабораториях лечебно-профилактических учреждений.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования № 11.G34.31.0066.

Список литературы

1. Kundt A., Lehmann O. Longitudinal vibrations and acoustic figures in cylindrical columns of liquids // Ann. Phys. Chem. 1874. V. 153. P. 1–11.
2. Hertz H.M. Standing-wave acoustic trap for non-intrusive positioning of microparticles // J. Appl. Phys. 1995. V. 78. P. 4845–4849.
3. Groschl M. Ultrasonic separation of suspended particles. Part I: Fundamentals // Acustica. 1998. V. 84. P. 432–447.
4. Gavrilov L.R., Tsirolnikov E.M., Davies I. Application of focused ultrasound for the stimulation of neural structures // Ultrasound Med. Biol. 1996. V. 22. № 2. P. 179–192.
5. Садикова Д. Г., Андреев А. А., Шкидченко А. Н., Пашовкин Т. Н. Динамики концентрирования клеток в поле стоячей ультразвуковой волны // Биомедицинская радиоэлектроника. 2006. № 8–9. С. 95–99.
6. Kuznetsova L.A., Martin S.P., Coakley W.T. Sub-micron particle behavior and capture at an immunosensor surface in an ultrasonic standing wave // Biosensors and bioelectronics. 2005. № 21. P. 940–948.
7. Горьков Л.П. О силе, действующей на маленькие частицы в акустическом поле в идеальной жидкости // ДАН. 1961. Т. 120. № 1. С. 88–91.
8. Яронене Г., Сукацкас В., Лукашавичус А., Волейшис А. Вопросы ультразвуковой диагностики крови. В сб.: Проблемы техники в медицине. Томск, 1983. С. 196–197.
9. Тиц У. Клиническое руководство по лабораторным тестам. М.: ЮНИМЕД-пресс, 2003. 721 с.

EFFECT OF RADIATION FORCE ON ERYTHROCYTE SEDIMENTATION

S.N. Gurbatov, A.V. Klemina

A reagentless acoustic method for determining the erythrocyte sedimentation rate in human whole blood has been developed. The method is based on time-dependent measurements of ultrasonic velocity in whole blood. Laboratory and clinical trials of the method have shown a high degree of correlation with traditional methods.

Keywords: ultrasonic interferometer, radiation force, erythrocyte sedimentation rate.