

ОПТИКО-ЭЛЕКТРОННАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ МИКРОСГУСТКОВ В ПРОБАХ КРОВИ НА ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОМ ЭТАПЕ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Е. В. ГОРБУНОВА¹, А. Н. ЧЕРТОВ¹, Т. В. ВАВИЛОВА²,
Н. А. СОЛОВЬЕВА², Л. Б. ГАЙКОВАЯ³, В. В. КОРОТАЕВ¹

¹Университет ИТМО, 197101, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: a.n.chertov@mail.ru

²Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова,
197341, Санкт-Петербург, Россия

³Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова,
195067, Санкт-Петербург, Россия

Представлена разработанная оптико-электронная система для обнаружения микросгустков в пробирках с пробами крови до проведения анализа данных проб на гематологическом анализаторе или цитометре. Анализ осуществляется видеоинформационным методом, непосредственно через стенку пробирки, в тонком слое стекающей по ее внутренней стенке крови. Приведены результаты экспериментальных исследований, показывающие, что заключение о наличии микросгустков в пробе возможно осуществлять по подвижности клеток крови, на основании структуры конгломератов клеток и наличия тромбоцитов.

Ключевые слова: оптико-электронная система, анализ крови, микросгусток, клетка крови, анализ изображений

Введение. Сгусток крови — это множество клеток крови, склеенных нитями фибрина (рис. 1). Наличие микросгустков в пробах крови является одной из важных причин ошибок лабораторных гематологических исследований. Большие сгустки можно увидеть невооруженным глазом. Однако небольшие сгустки (микросгустки) визуально определить невозможно, результатом чего могут быть затруднения в диагностике заболеваний и неправильная лечебная тактика. Своевременное выявление микротромбообразования, не видимого при визуальной оценке пробы крови, актуально для лабораторной диагностики.

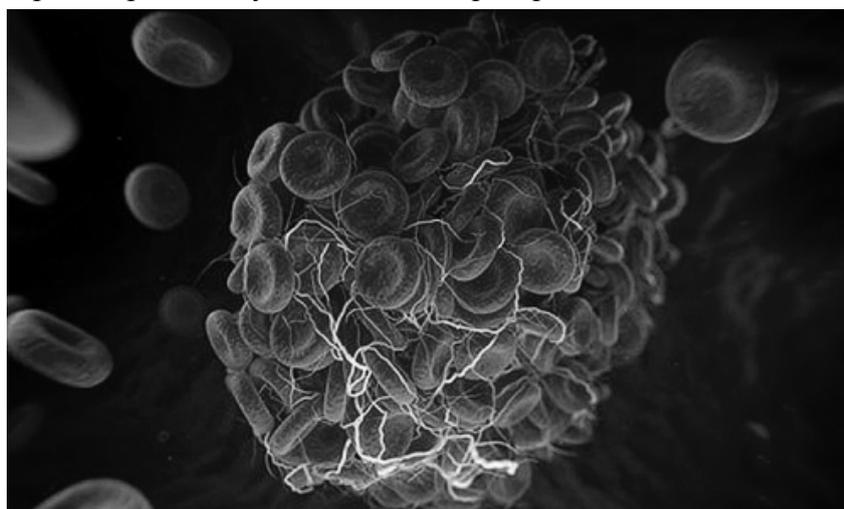


Рис. 1

Проба крови, в которой присутствуют микросгустки, непригодна для изучения клеточного состава или исследования системы свертывания, поскольку в ней запущены механизмы

коагуляции [1], а клеточные элементы потеряли свою автономность и не могут быть количественно и качественно оценены анализатором [2]. Анализ указанной пробы приведет к ошибочным результатам исследования (если микросгустки соизмеримы по размерам с большими клетками крови) или будет сопряжен с риском выхода из строя прибора из-за засорения рабочих элементов цитометра [3].

В настоящее время существует множество медицинских лабораторных приборов, позволяющих оценить клеточный состав крови [4] и его патологические изменения (микроскоп, гемоцитометр, цитофлюориметр, полуавтоматические и автоматические гемоанализаторы) и провести коагулологические исследования (коагулометр, агрегометр и т.д.). Для этих приборов критично отсутствие клеточных агрегатов или необходимость учитывать факторы свертывания в процессе анализов *in vitro* [4, 5].

Для исходной пробы крови при проведении любого из указанных исследований существуют требования, одним из которых является отсутствие микросгустков [6, 7]. В то же время не существует технологии или приборов, реализующих объективный, быстрый и эффективный анализ пробы крови на наличие/отсутствие микросгустков на этапе оценки и подготовки пробы для дальнейших исследований. Следовательно, актуальной задачей является разработка системы обнаружения микросгустков в пробе крови на преаналитическом этапе.

В настоящей статье представлена разработанная коллективом авторов опτικο-электронная система, позволяющая быстро (в течение нескольких минут) обнаруживать микросгустки в пробе крови через стекло пробирки в лабораторных условиях перед проведением исследований.

Постановка задачи обнаружения микросгустка. Для определения наличия микросгустка в анализируемой пробе необходимо знать клеточный состав крови, поскольку минимальный допустимый размер определяемого микросгустка не должен превышать средний размер клетки крови. В крови присутствуют различные виды клеток [4]: лейкоциты, эритроциты и тромбоциты.

Распределение клеток крови по видам и размерам показано на рис. 2.

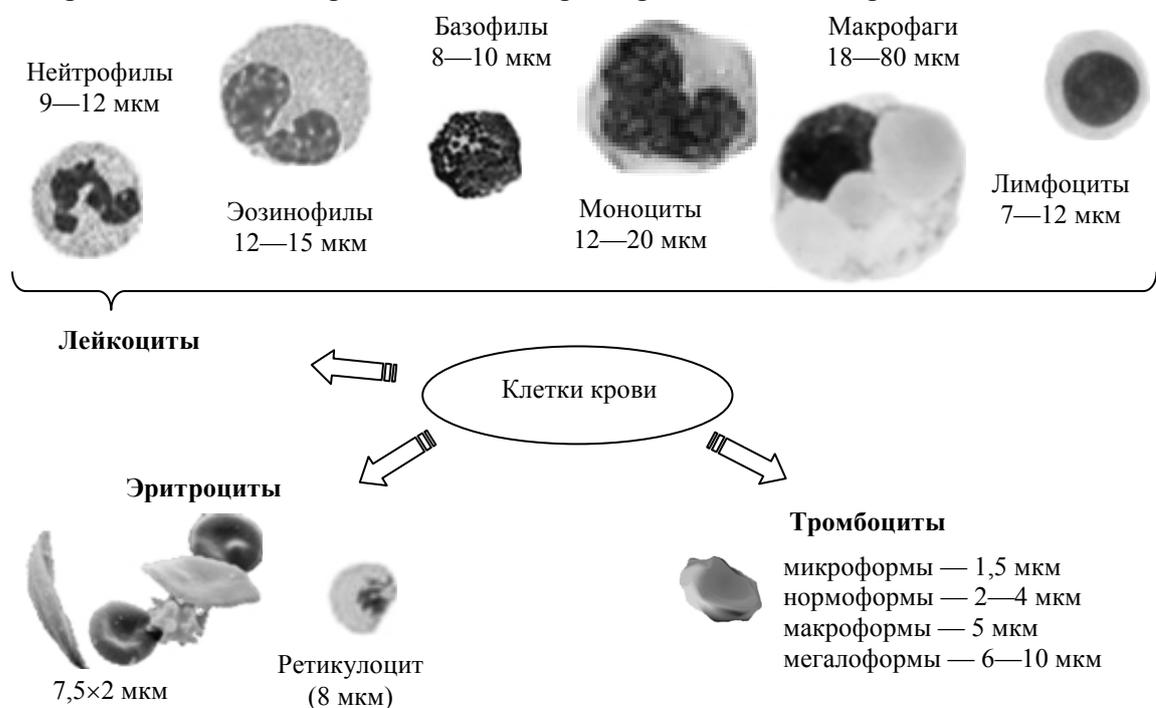


Рис. 2

Лейкоциты — класс клеток крови, включающий несколько их разновидностей, различающихся по форме, строению и размерам [8]:

- нейтрофилы (от 50 до 70 % от общего количества лейкоцитов);
- эозинофилы (от 1 до 5 % от общего количества лейкоцитов);
- базофилы (примерно 1 % от общего количества лейкоцитов);
- моноциты (от 2 до 10 % от общего количества лейкоцитов), самая крупная разновидность моноцита и самые большие клетки крови — макрофаги;
- лимфоциты (от 20 до 40 % от общего количества лейкоцитов).

Эритроциты — класс клеток крови, отвечающий за перенос кислорода и углекислого газа [9]. Классическую двояковогнутую форму имеют от 70 до 80 % эритроцитов. Эритроциты могут склеиваться друг с другом и формировать так называемые „столбики“, которые **не являются сгустками**. Ретикулоциты — незрелые эритроциты, способные выполнять основную функцию эритроцитов, но содержащие остатки органелл клетки.

Тромбоциты — класс клеток, отвечающий за свертываемость крови. В зависимости от размера тромбоциты подразделяются на микроформы, нормоформы, макроформы и мегалоформы.

Таким образом, если не принимать во внимание максимально возможный размер клетки макрофага, размеры клеток крови варьируются в диапазоне от 1,5 до 20 мкм.

Настоящая работа посвящена решению задачи определения опико-электронными методами наличия микросгустков, сопоставимых по размерам с большими клетками крови (от 20 мкм и больше). При этом особенность задачи, составляющая ее новизну, заключается в том, что разработанная опико-электронная система (ОЭС) контроля позволяет обеспечивать анализ пробы крови без вскрытия пробирки, чтобы не подвергать указанную пробу воздействиям, которые могут повлечь изменения результатов исследования (например, нагреву, магнитным воздействиям и т.п.).

Схема построения и общая конструкция ОЭС контроля. Исходя из вышесказанного, микроанализ пробы крови необходимо осуществлять через стенку пробирки. При современном уровне технологий создания многоэлементных приемников оптического излучения (МПОИ) и оптических систем фокусировки изображений возможно получение изображений и видеозаписи некоторого пространства за тонкой стенкой пробирки, заполненной кровью. Получаемые изображения или видеозапись можно анализировать как визуально, так и автоматически с целью выявления микросгустков.

На рис. 3 представлена обобщенная схема опико-электронной системы для проведения микроанализа крови.

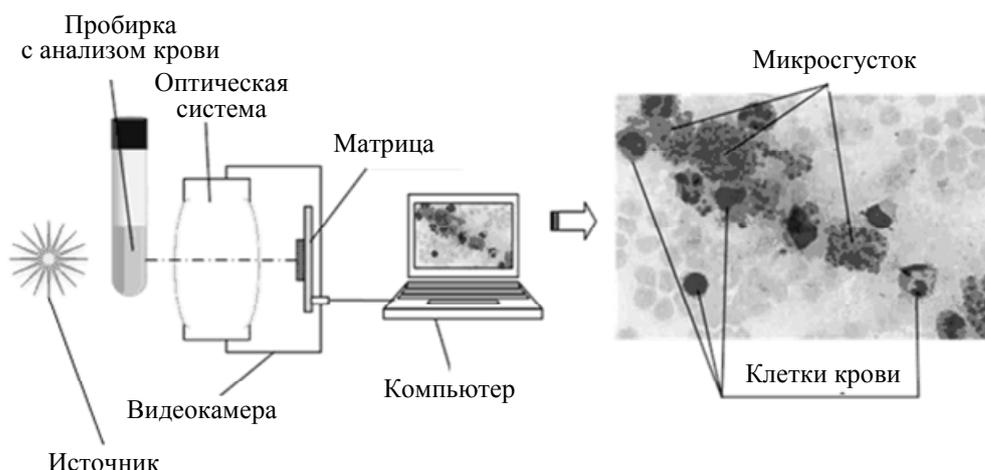


Рис. 3

Для физической реализации предложенной обобщенной схемы ОЭС необходимо рассчитать оптическую систему формирования изображения, которая будет обладать достаточным увеличением, чтобы на стандартной матрице МПОИ 1280×960 элементов (при размере

пиксела 5 мкм) [10] получить изображение зоны анализа размером 80×60 мкм. Такой размер зоны анализа выбран в связи с необходимостью визуализации самых маленьких клеток крови (микроформы тромбоцитов в 1,5 мкм). На стандартной матрице с указанными параметрами изображение микроформы тромбоцитов занимает прямоугольник 24×24 элемента. Таким образом, увеличение V оптической системы определяется в соответствии со следующим правилом:

$$V = \frac{\sqrt{(l_m a)^2 + (h_m a)^2}}{\sqrt{l_{im}^2 + h_{im}^2}},$$

где l_m и h_m — количество элементов вдоль и поперек матрицы МПОИ, a — размер элемента матрицы МПОИ, l_{im} и h_{im} — длина и ширина зоны анализа.

Следовательно, увеличение оптической системы формирования изображения должно быть примерно $80\times$.

Для реализации оптической системы с указанными параметрами был выбран микрообъектив ахромат с уменьшенной кривизной изображения и хроматической разностью увеличений. Микрообъектив предназначен для использования в микроскопах с конечной (160 мм) оптической длиной тубуса, рассчитан для работы с покровным стеклом толщиной 0,17 мм и обладает следующими техническими характеристиками: увеличением $20\times$, числовой апертурой 0,4 и рабочим отрезком 1,04 см (рис. 4). Данный микрообъектив в сочетании с линзой, фокусное расстояние которой 10,6 мм, толщина 3,4 мм и диаметр 7,8 мм, обеспечивает необходимое увеличение.

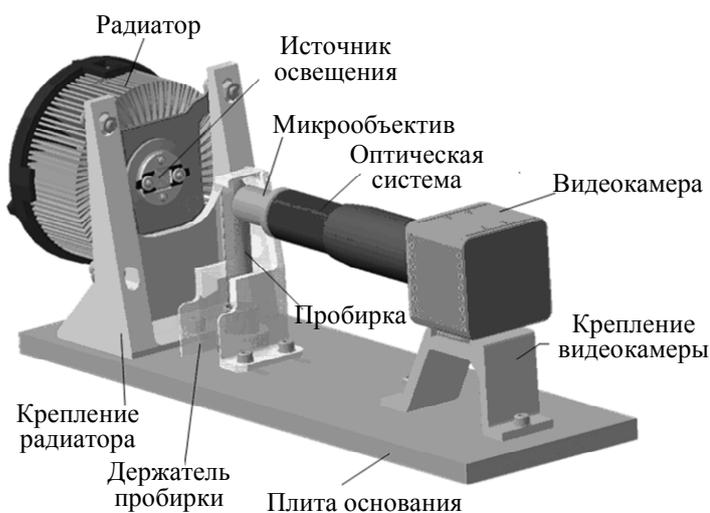


Рис. 4

В силу того, что реализация разработанной ОЭС для обнаружения микросгустков в пробах крови на преаналитическом этапе осуществляется с использованием микрообъектива и оптической схемы, в основу которой положена оптическая схема цифрового микроскопа, в качестве источника освещения выбран компактный и мощный светодиодный модуль — модель X10 производства фирмы „Оптоган“ (Россия). Поскольку этот источник освещения очень сильно нагревается при работе, дополнительно был рассчитан соответствующий радиатор, обеспечивающий необходимый теплоотвод с возможностью программного управления скоростью вращения вентилятора. Радиатор с зафиксированным светодиодным модулем крепится на кронштейне.

В качестве узла регистрации использовалась цветная видеокамера VEC-545-USB производства фирмы ЭВС, обеспечивающая получение изображений размером 1280×960 пкс с частотой 14 кадров/с.

Держатель для пробирки с пробой крови спроектирован таким образом, что анализ осуществляется после переворачивания пробирки. В этом случае клетки крови и микросгустки (при их наличии) стекают под действием силы тяжести по стенкам пробирки, формируя монослой исследуемых объектов в зоне анализа.

Все основные элементы ОЭС фиксируются на общей плите основания, обеспечивающей их оптимальное положение относительно друг друга и относительно анализируемой пробирки с пробой крови.

Макет ОЭС для обнаружения микросгустков в пробах крови на преаналитическом этапе представлен на рис. 4.

Эксперимент и обсуждение. Экспериментальные исследования разработанного макета ОЭС проводились в два этапа:

— первый этап — определение настроек работы элементов макета и оптимального положения пробирки для анализа пробы крови; этот этап проводился на базе Центральной клинико-диагностической лаборатории больницы Петра Великого СЗГМУ им. И. И. Мечникова;

— второй этап — анализ проб крови параллельно с анализом на проточном цитометре; этот этап проводился на базе Центральной клинико-диагностической лаборатории НМИЦ им. В. А. Алмазова.

В ходе первого этапа экспериментальных исследований (рис. 5, а, б) были получены изображения клеток пробы крови, свободно перемещающихся в зоне анализа по внутренней поверхности пробирки под действием силы тяжести при различных режимах работы светодиодного модуля подсветки и матрицы МПОИ: ток питания светодиодного модуля $I = 300$ мА, время накопления матрицы МПОИ $t = 600$ нс — рис. 5, а; $I = 600$ мА, $t = 200$ нс — рис. 5, б; увеличение оптической системы $75\times$.

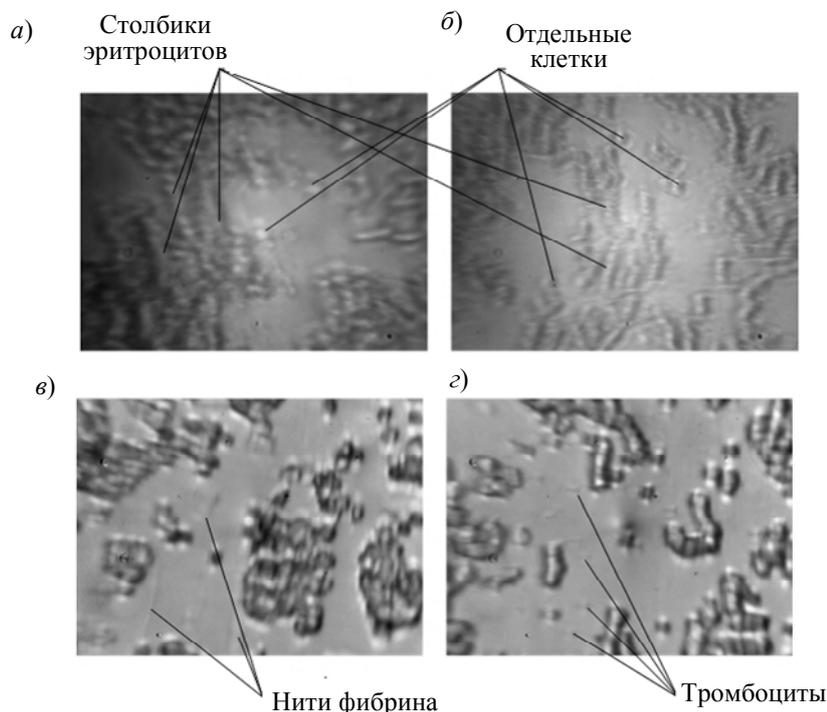


Рис. 5

Оптимальными для получения наилучшего визуального изображения при проведении анализа пробы крови являются следующие значения параметров элементов макета: $I = 600$ мА, $t = 200$ нс, расстояние от микрообъектива до наружной поверхности пробирки — 0,9 мм, увеличение оптической системы $75\times$.

При указанных параметрах на исходных изображениях отчетливо видны отдельные клетки крови и столбики слипшихся эритроцитов (см. рис. 5 а, б), которые в ходе движения по внутренней стенке пробирки рассыпаются и перегруппировываются.

Следует отметить, что изображения клеток крови отличаются от изображений, полученных с помощью микроскопа и приведенных в гематологическом атласе [4], поскольку анализируемые пробы крови внутри пробирки не подвергались действию специализированных окрашивающих сред, применяемых для анализа клеток крови под микроскопом.

В ходе второго этапа экспериментальных исследований анализировались пробы крови, для которых было заранее определено наличие/отсутствие сгустков при помощи цитометра.

Пробы крови с наличием сгустков отличались замедленной скоростью движения клеток крови в зоне анализа, наличием постоянных (не разбиваемых и не перестраивающихся) конгломератов клеток, малым количеством одиночных клеток, фактически полным отсутствием тромбоцитов в зоне анализа и наличием отчетливо видимых на изображении нитей фибрина, удерживающих клетки и клеточные конгломераты от движения в зоне анализа (рис. 5, в). Указанные изменения не визуализировались при внешнем осмотре пробирки.

Пробы крови без микросгустков обладают высокой подвижностью клеток крови в зоне анализа, отсутствием постоянных конгломератов клеток, наличием того или иного количества тромбоцитов (рис. 5, г).

Детальный анализ классификационных признаков наличия микросгустков в исследуемой с помощью разработанного макета ОЭС пробе крови планируется провести на следующих этапах исследования.

Заключение. Представлена ОЭС для определения наличия микросгустков в пробах крови на преаналитическом этапе, т.е. при поступлении в лабораторию сразу после забора. При этом для проведения анализа не нужно вскрывать пробу, поскольку предложенная концепция построения ОЭС предусматривает получение изображений клеток крови, стекающих по внутренней поверхности стенки пробирки. В ходе анализа проба крови не нагревается и не подвергается воздействию каких-либо разрушающих излучений.

Оптическая схема измерений разработанного макета ОЭС построена на базе оптической схемы цифрового микроскопа и позволяет получать контрастные изображения клеток крови пробы для реализации их визуального или автоматического анализа как в статике (при получении и анализе отдельных изображений), так и в динамике (при получении и анализе видеозаписи).

Практическая значимость полученных результатов заключается в экспериментальном подтверждении возможности оценки наличия/отсутствия микросгустков и снижения количества ошибок на преаналитическом этапе исследований в медицинской диагностической лаборатории с помощью предложенной ОЭС контроля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биохимия: Учебник / Под ред. Е. С. Северина. М.: ИГ „ГЭОТАР-Медиа“, 2004. 784 с.
2. Волкова С. А., Боровков Н. Н. Основы клинической гематологии: Учеб. пособие. Н. Новгород: Изд-во Нижегородской гос. медицинской академии, 2013. 400 с.
3. Меньшиков В. В. Достоверность лабораторной информации и клиническая безопасность пациента. М.: Изд-во „Лабора“, 2014. 158 с.
4. Луговская С. А., Почтарь М. Е. Гематологический атлас. Тверь: Изд-во „Триада“, 2004. 242 с.
5. Луговская С. А., Почтарь М. Е., Долгов В. В. Гематологические анализаторы. Интерпретация анализа крови. Тверь: Изд-во „Триада“, 2007. 112 с.

6. *Меньшиков В. В., Первушин Ю. В.* Обеспечение и контроль качества клинических лабораторных исследований // Клиническая лабораторная диагностика: Национальное руководство / Под ред. В. В. Долгова, В. В. Меньшикова. М.: ИГ „ГЭОТАР-Медиа“, 2012. Т. 1. С. 42—83.
7. *Мамаев А. Н., Гильманов А. Ж., Вавилова Т. В., Момот А. П.* Преаналитический этап исследования системы гемостаза // Клиническая лабораторная диагностика. 2011. № 4. С. 35—38.
8. Гематология: Новейший справочник / Под общ. ред. К. М. Абдулкадырова. М.: Изд-во „Эксмо“; СПб: Изд-во „Сова“, 2004. 928 с.
9. *Федюкович Н. И.* Анатомия и физиология человека: Учеб. пособие. Ростов-на-Дону: Изд-во: „Феникс“, 2003. 416 с.
10. Бескорпусная цветная мегапиксельная телевизионная камера высокого разрешения. Модели VEA-545 и VEI-545. ООО ЭВС, Россия [Электронный ресурс]: <http://www.evs.ru/d_sheet/VEI-545-USB.pdf>, 27.01.2018.

Сведения об авторах

- Елена Васильевна Горбунова** — канд. техн. наук; Университет ИТМО; кафедра оптико-электронных приборов и систем; ведущий инженер;
E-mail: gorbunova@grv.ifmo.ru
- Александр Николаевич Чертов** — канд. техн. наук; Университет ИТМО; кафедра оптико-электронных приборов и систем; E-mail: a.n.chertov@mail.ru
- Татьяна Владимировна Вавилова** — д-р мед. наук, профессор; НМИЦ им. В. А. Алмазова, кафедра лабораторной медицины и генетики Института медицинского образования; E-mail: vtv.lab.spb@gmail.com
- Наталья Андреевна Соловьева** — НМИЦ им. В. А. Алмазова, кафедра лабораторной медицины и генетики Института медицинского образования; клинический ординатор; E-mail: Solovec.solovec@yandex.ru
- Лариса Борисовна Гайковская** — д-р мед. наук, старший научный сотрудник; СЗГМУ им. И. И. Мечникова, Центральная клиничко-диагностическая лаборатория, кафедра биологической и общей химии; заведующая лабораторией; E-mail: Larisa.Gaikovaya@szgmu.ru
- Валерий Викторович Коротаев** — д-р техн. наук, профессор; Университет ИТМО; кафедра оптико-электронных приборов и систем; заведующий кафедрой; E-mail: korotaev@grv.ifmo.ru

Поступила в редакцию
20.08.18 г.

Ссылка для цитирования: Горбунова Е. В., Чертов А. Н., Вавилова Т. В., Соловьева Н. А., Гайковская Л. Б., Коротаев В. В. Оптико-электронная система для обнаружения микросгустков в пробах крови на преаналитическом этапе лабораторного исследования // Изв. вузов. Приборостроение. 2018. Т. 61, № 9. С. 788—795.

OPTICAL-ELECTRONIC SYSTEM FOR DETECTING TINY CLOTS IN BLOOD TESTS AT THE PREANALYTICAL STAGE OF LABORATORY STUDY

E. V. Gorbunova¹, A. N. Chertov¹, T. V. Vavilova²,
N. A. Solovyova², L. B. Gaikovaya³, V. V. Korotaev¹

¹ITMO University, 197101, St. Petersburg, Russia
E-mail: a.n.chertov@mail.ru

²V. A. Almazov National Medical Research Center,
197341, St. Petersburg, Russia

³I. I. Mechnikov North-Western State Medical University,
195067, Санкт-Петербурге, Россия

An optical-electronic system is designed to detect tiny blood clots directly in test tubes with blood samples prior to processing the samples with hematology analyzer or cytometer. The analysis is carried out directly through the test tube wall, in a thin layer of the blood flowing down the inner tube wall. Relying on results of experimental studies, it is inferred that a conclusion on the presence of tiny blood clots in a blood sample can be made based on the blood cells mobility, as well as on the structure of conglomerates of cells and the presence of platelets.

Keywords: optical-electronic system, blood analysis, tiny clot, blood cell, image processing

REFERENCES

1. Severin E.S., ed., *Biokhimiya* (Biochemistry), Moscow, 2004, 784 p. (in Russ.)
2. Volkova S.A., Borovkov N.N. *Osnovy klinicheskoy gematologii* (Fundamentals of Clinical Hematology), Nizhniy Novgorod, 2013, 400 p. (in Russ.)
3. Men'shikov V.V. *Dostovernost' laboratornoy informatsii i klinicheskaya bezopasnost' patsiyenta* (Reliability of Laboratory Information and Clinical Safety of the Patient), Moscow, 2014, 158 p. (in Russ.)
4. Lugovskaya S.A., Pochtar' M.E. *Gematologicheskiy atlas* (Hematological Atlas), Tver', 2004, 242 p. (in Russ.)
5. Lugovskaya S.A., Pochtar' M.E., Dolgov V.V. *Gematologicheskiye analizatory. Interpretatsiya analiza krovi* (Hematology Analyzer. Interpretation of Blood Test), Tver', 2007, 112 p. (in Russ.)
6. Men'shikov V.V., Pervushin Yu.V. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika: Natsional'noye rukovodstvo* (Clinical Laboratory Diagnostics: National leaders), Moscow, 2012, vol.1, pp. 42–83. (in Russ.)
7. Mamayev A.N., Gil'manov A.Zh., Vavilova T.V., Momot A.P. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, 2011, no. 4, pp. 35–38. (in Russ.)
8. Abdulkadyrov K.M., ed., *Gematologiya: Noveyshiyy spravochnik* (Hematology: The Latest Reference Book), Moscow–St. Petersburg, 2004, 928 p. (in Russ.)
9. Fedyukovich N.I. *Anatomiya i fiziologiya cheloveka* (Anatomy and Human Physiology), Rostov-on-Don, 2003, 416 p. (in Russ.)
10. http://www.evs.ru/d_sheet/VEI-545-USB.pdf. (in Russ.)

Data on authors

- Elena V. Gorbunova** — PhD; ITMO University, Department of Optical-Electronic Devices and Systems; Leading Engineer; E-mail: gorbunova@grv.ifmo.ru
- Alexander N. Chertov** — PhD; ITMO University, Department of Optical-Electronic Devices and Systems; E-mail: a.n.chertov@mail.ru
- Tatiana V. Vavilova** — Dr. Sci., Professor; V. A. Almazov National Medical Research Center, Department of Laboratory Medicine and Genetics Educational; E-mail: vtv.lab.spb@gmail.com
- Natalya A. Solovyova** — V. A. Almazov National Medical Research Center, Department of Laboratory Medicine and Genetics Educational; Clinical Resident; E-mail: Solovec.solovec@yandex.ru
- Larisa B. Gaikovaya** — Dr. Sci., Senior Scientist; I. I. Mechnikov North-Western State Medical University, Central Clinical Diagnostic Laboratory, Department of Biological and General Chemistry; Head of the Laboratory; E-mail: Larisa.Gaikovaya@szgmu.ru
- Valery V. Korotaev** — Dr. Sci., Professor; ITMO University, Department of Optical-Electronic Devices and Systems; Head of the Department; E-mail: korotaev@grv.ifmo.ru

For citation: Gorbunova E. V., Chertov A. N., Vavilova T. V., Solovyova N. A., Gaikovaya L. B., Korotaev V. V. Optical-electronic system for detecting tiny clots in blood tests at the preanalytical stage of laboratory study. *Journal of Instrument Engineering*. 2018. Vol. 61, N 9. P. 788–795 (in Russian).

DOI: 10.17586/0021-3454-2018-61-9-788-795