

Винахід відноситься до технічних засобів для проведення люмінесцентного аналізу і може бути використане з метою діагностики (біологічні рідини - кров, сироватка, плазма крові, слина, сеча), а також вивчення структурно-функціональної організації біологічних мембран, функціональної активності клітинних популяцій, для рішення науково-практичних і фундаментальних задач медицини, біології (біохімії, біофізики, імунології, мікробіології), фармакології, токсикології, екології, сільського господарства (тваринництва, селекція) і т.д.

Одним з найважливіших напрямків у біології і медицині є вивчення біологічних мембран - багатокomпонентних надмолекулярних систем, що забезпечують структурну відособленість і цілісність кліток і їх внутрішньоклітинних органелл. Практично усі функціональні, життєво важливі процеси - такі як біоенергетика, розподіл кліток, транспорт речовин, збудливість і проведення нервового імпульсу, імунна відповідь, рухова активність і т.д. - здійснюється з прямою чи непрямою участю біологічних мембран. Ці різноманітні аспекти їхньої функції визначаються, насамперед, структурно-динамічним станом основних компонентів мембран - білків і ліпідів.

Для вивчення біологічних мембран широко використовуються біофізичні методи дослідження. До них відносяться і люмінесцентні методи, зокрема хемілюмінесцентний.

Встановлено, що біологічні мембрани хемілюмінесцирують. Світіння зв'язують з перебігом окислюванням ліпідів і вважають, що воно містить інформацію про рівень радикально-ланцюгових реакцій, що протікають у мембранах, про ступінь насиченості жирних кислот, що входять до складу ліпідів, про рівень антиокислюваної активності антиоксидантів, що контролюють інтенсивність радикально-ланцюгових реакцій.

Основу хемілюмінесценції складають хімічні реакції, у ході яких виникають короткоіснуючі збуджені молекули - радикали, що швидко переходять в основний (незбуджений) стан, а енергію порушення виділяють у вигляді фотонів світла.

Відомий вітчизняний прилад - Хемілюмінометр медичний ХЛМ1Ц-01 (Сидорик Е.П., Карнаух І.М., Баглей Е.А. і ін. Хемілюмінометр медичний ХЛМ1Ц-01 // Засоби виміру, допущені до випуску в обіг в СРСР. Опис затверджених зразків М: Вид-во стандартів, 1979. Вип. 54. С.21-27.), що дозволяє реєструвати інтенсивність зверхслабкого світіння в діапазоні 200-600нм, що працює в режимі рахунка фотонів.

Недоліком цього приладу є надмірно великі габарити, велика маса (360кг), споживає велику кількість електроенергії (2кВ), що економічно невигідно. При експлуатації часто виходить з ладу. У силу цього в даний час прилад не випускається промисловістю.

Відомий також прилад (Ципін А.Б., Рогатський Г.Г., Журавльов А.І. і ін. «Пристрій для виміру зверхслабкого світіння біологічних субстратів», А.З № 457892 СРСР // Б. І. 1975. № 3. С.94), призначений для виміру надслабкого світіння біологічних рідин у режимі рахунка фотонів. Містить світлонепроникну камеру з вікном для фотокатода фотоумножника, затвор, виконаний у виді сектора зі світлонепроникного нелюмінесцируючого матеріалу, світлодіод, установлений на внутрішній поверхні затвора, сальник, виконаний зі світлонепроникного матеріалу, усередині якого проходить вісь рукоятки повороту затвора, оксамитні щічки ущільнення, розташовані паралельно в корпусі камери, а також термостатуючу кювету для досліджуваного зразка.

Недоліком пристрою є вертикальне розташування блоку, що містить ФЕУ, що розташований зверху над кюветою і практично не дозволяє вводити в кювету в момент реєстрації хемілюмінесценції різні дозуючі добавки. Крім того, від частого руху пластини затвора, оксамитні щічки швидко виходять з ладу, що може привести до засвітки ФЕУ.

Найбільш близьким, узятим як прототип є Біолюмінометр БЛМ-8703М, (Академія наук СРСР, ордена Леніна Сибірське відділення спеціальне конструкторсько-технологічне бюро «Наука», 1990р.), призначений для реєстрації біохемілюмінесцентних реакцій. Прилад працює в аналоговому режимі. Результати виміру виводяться на 12-ти розрядний цифровий індикатор, а також на самописний прилад і цифродрукуючий пристрій. Наявність інтерфейсу RS-232 у приладі забезпечує роботу з мікро-ЕОМ, типу ДВК, IBM і іншими обчислювальними комплексами.

Основними недоліками цього приладу є низька чутливість, оскільки прилад працює в аналоговому режимі, а незадовільний світлозахист не дозволяє використовувати ФЕУ типу 130, 140 і ін., що призначаються для зверхслабких світіннь. У силу цей прилад не уловлює настільки слабке світіння, що характерно для сироватки, сечі й інших біологічних рідин. Призначений тільки для виміру люмінозалежної хемілюмінесценції і при використанні системи люциферин-люцифераза.

Метою дійсного винаходу є створення приладу настільного типу, що працює в режимі рахунка фотонів, що володіє високою чутливістю завдяки застосуванню ФЕУ-130, ФЕУ-140 і інших високочутливих фотоумножників.

Ціль досягається тим, що в пристрої замість заслінки-діафрагми вводиться спеціальна заслінка з двох, розділених між собою металевих пластин, що приводяться в рух за допомогою стрижня, що виходить протилежним кінцем назовні через отвір у бічній стінці кюветного блоку, що дозволяє оператору «відкривати і закривати» ФЕУ в потрібний момент. З метою виключення влучення зовнішнього світла усередину кюветного блоку через зазор між стрижнем і отвором, була використана система з двох мідних трубок, одна з яких щільно впресована в отвір бічної стінки кюветного блоку, а друга, рухлива, розташована зовні першої, зв'язана з кінцем стрижня за допомогою круглої гайки і приводиться в рух разом із заслінкою при роботі оператора.

Така конструкція заслінки разом із системою трубок виключає дифракцію зовнішнього світла, і тим самим забезпечує надійний світлозахист ФЕУ від паразитних, зовнішніх світлових потоків, робить можливим використання ФЕУ, призначених для реєстрації зверхслабких світлових потоків (ФЕУ-130, ФЕУ-140 та ін.).

Крім цього в хемілюмінометре додатково введений захист від грубої ненавмисної засвітки ФЕУ в ситуації, коли знімається кришка люка і ФЕУ відкритий (що може негайно вивести з ладу ФЕУ). Основу цього захисту складає кулісний механізм, що приводить у дію спеціальний фіксатор, притискаючи кришку люка кюветного блоку при відкритому і звільняючи її при закритому ФЕУ.

Новим також є те, що з метою вивчення впливу на параметри хемілюмінесценції досліджуваного зразка різних речовин-добавок у кришці люка кюветного блоку вмонтована мідна трубка для введення голки дозатора. При цьому конструкція кришки виконана так, щоб цілком виключити влучення зовнішнього світла усередину кюветного блоку.

Новим є те, що кювета постачена пристроєм перемішування і забезпечує відтворюваність результатів, тому що процес перемішування виключає осадження кліток і внутрішньоклітинних структур у суспензії. В основі

перемішування застосований спосіб барботування рідини повітрям. Однак, у даному випадку барботування цілком виключається завдяки використанню тонкого поліетиленового капіляра, зануреного в розчин кювети, у капілярі стовпчик рідини цілком не витісняється повітрям, що надходить імпульсами по гумовому шлангу від сифона з приводом для формування імпульсів тиску, у результаті чого стовпчик рідини поводить як поршеньок, повідомляючи навколишньої капілярі рідині імпульс. Оскільки капіляр малих розмірів він не робить істотного впливу на сигнал хемілюмінесценції.

Новизна також полягає в тому, що для градуїровки в абсолютних одиницях інтенсивності світіння ми застосували як еталон сіль - ураніацетат. З погляду метрологічної служби вирішена важлива проблема - контроль чутливості і працездатності приладів - хемілюмінометрів, а також порівняння результатів виміру, отриманих на різних приладах.

На відміну від аналога, у якому висновок у мікро-ЕОМ результатів вимірів хемілюмінесценції здійснюється за схемою: аналоговий підсилювач >аналогово-цифровий перетворювач (АЦП)>КР580ВВ55>пам'ять з відповідним драйвером, у нашому варіанті ця схема змінена: семірозрядний нагромаджувач імпульсів лічильника V > дешифратор 155 ІДЗ > ключі (КТ801, КТ315) > КР580ВВ79 (програмувальний контролер дисплею і клавіатури) у режимі набору датчиків > пам'ять. Драйвер, природно, відрізняється. Перевага цієї схеми полягає в тому, що вона дозволяє візуально контролювати по цифровому дисплею введення даних у мікро-ЕОМ VI, простіше в реалізації. Розроблено програмне забезпечення для обробки даних, їхнього аналізу і висновку на цифровий дисплей.

Убудована мікро-ЕОМ значно дешевше і менше по габаритах персонального комп'ютера. У той же час вона дозволяє не тільки зберігати в пам'яті результати вимірів, але і здійснювати відповідну математичну обробку й аналіз матеріалів.

Таким чином, у пропонованому технічному рішенні всі перераховані ознаки відрізняються як від відомого пристрою-прототипу, так і від аналога. Тому в пропонованому пристрої завдяки новим ознакам забезпечуються критерії «Істотні відмінності», «Новизна», «Позитивний ефект».

На фіг.1 приведена структурно-функціональна схема пристрою для реєстрації хемілюмінесценції, де:

- I. Кюветний блок, у якому розташовується заслінка і кварцова кювета зі зразком;
- II. Фотоелектронний умножувач (ФЕУ типу 130 чи 140);
- III. Широкополосний підсилювач імпульсів, що надходять з ФЕУ;
- IV. Аналізатор імпульсів;
- V. Семірозрядний лічильник імпульсів;
- VI. Високовольтне джерело постачання ФЕУ;
- VII. Мікро ЕОМ.

Подальший опис буде стосуватися структури кюветного блоку I, у якому і представлена новизна пропонованих рішень.

Усі приведені в тексті малюнки і їхній опис представлені в додатку.

На фіг.1.1 (а і б) і 1.2 представлені схематичні зображення деталей заслінки.

На фіг.1.1 представлено заслінку (а), що складається з двох металевих пластин 9 (в) і між ними 2-х металевих прокладок 8 (б), розмірами, зазначеними на фіг. Заслінка жорстко за допомогою гвинтів кріпиться до металевої стінки 4 кюветного блоку (фіг.3А і Б), що розділяє ФЕУ і кварцову кювету 20 (фіг.3А). Перегородка 4 і пластини 9 мають оптичне вікно 5, що розташовується перед фотокатодом ФЕУ II. Пластини 9 і прокладки 8 спільно утворюють пази 10, у які вдвигаються рухливі пластини 11 заслінки, закриваючи, і висувають, відкриваючи, відповідно оптичне вікно 5, дві (фіг. 1.2а). Пластини 11 заслінки і між ними металева прокладка 12, за допомогою гвинтів кріпляться до металевої планки 13 (б), до якої у свою чергу одним кінцем угвинчується металевий стрижень 14, а інший кінець стрижня 14 виходить назовні кюветного блоку усередині мідної трубки 16 (фіг.3А і Б). Трубка 16 жорстко зв'язана зі стінкою 15. Зовнішній кінець стрижня 14 за допомогою круглої гайки 18 кріпиться до мідної трубки 17, що спільно зі стрижнем 14 вільно рухається по поверхні трубки 16 і в такий спосіб надає руху пластини 11 заслінки.

На фіг.1.3А (вид зверху) і Б (вид збоку) зображений кюветний блок у зібраному стані. Розміри блоку і його частин, зображених на фіг. відповідає масштабу 1:1:

1. Світлонепроникний сталевий кожух, усередині якого розташований ФЕУ (2).
3. Металева гайка, що кріпить кожух 1 до пластини 4, що розділяє ФЕУ 2 і кварцову кювету 20.
5. Оптичне вікно.
6. Кварцова короткофокусна лінза.
- 7.15 і 12 - бічні металеві стінки кюветного блоку.
8. Металева прокладка.
9. Металева пластина, що разом із прокладкою 8 утворює нерухому, жорстко фіксовану частину заслінки (фіг.1.1А, Б).
10. Пази, утворені прокладкою 8 і пластиною 9 (фіг.1.1А).
11. Рухлива пластина заслінки (дві) (фіг.1.2А).
13. Металева планка, до якої кріпляться пластини 11 і стрижень 14. (фіг.1.2А, Б).
16. Внутрішня мідна трубка діаметром 5 мм, жорстко зв'язана зі стінкою 15.
17. Зовнішня мідна трубка діаметром 6 мм, що вільно рухається по поверхні трубки 16.
18. Кругла гайка, за допомогою якої стрижень 14 жорстко, кріпиться до трубки 17, і в такий спосіб надає руху рухливим пластинам 11 заслінки (фіг. 1.2А).

Наявність мідних трубок 16 і 17, а також гайки 18 виключає доступ зовнішнього світла до фотокатода ФЕУ в момент реєстрації хемілюмінесценції досліджуваного зразка, тобто коли оптичне вікно 5 відкрите для ФЕУ.

19. Мідна труба, що виконує функцію люка, завдяки якому вводиться усередину кюветного блоку і витягається назовні кварцова кювета 20 з досліджуваним зразком.

21. Фіксатор положення кварцової кювети 20 усередині кюветного блоку.

22. Металева пластина, що служить підставою для кварцової кювети 20. На фіг.1.4А (вид збоку) і фіг.1.4Б (вид зверху) зображений механізм захисту ФЕУ від ненавмисної грубої засвітки. Основу цього захисту складає кулісний

механізм, що приводить у дію фіксатор 30, притискаючи кришку 19 при відкритому (фіг.1.4Б) і звільняючи її при закритому ФЕУ (фіг.1.4А). На фіг.1.4А зображені:

1. Кожух для ФЕМ;
3. Гайка, що закріплює кожух 1 до пластини 4;
5. Оптичне вікно;
17. Зовнішня трубка, на яку надіто і закріплене бронзове кільце 26, що у свою чергу зв'язано з важелем 27.

28. Г-образний важіль, що об обертається навколо осі 29 і один кінець його рухливо з важелем 27, а на протилежному кінці жорстко закріплена пластина-фіксатор 30. При відкритому ФЕУ (фіг.1.4Б) фіксатор 30 притискає кришку 19 і не дозволяє її знімати. При закритому ФЕУ фіксатор 30 займає положення, що зображено на фіг.1.4 А. У цьому положенні кришку люку 19 можна знімати, чи уводити витягати назовні кварцову кювету 20 зі зразком.

На фіг.1.5 зображено дозатор з голкою і кришка люку кюветного блоку. На шток 37 комерційного дозатора ємністю 0,05мл на клеї надіта з нержавіючої сталі трубка 38, у протилежному кінці якої впресована голівка медичної голки діаметром 1,6мм. Між голівкою голки 39 і внутрішньою стінкою трубки утворений паз 40, у який входить трубка кришки 33 люка й таким чином зовнішнє світло не попадає усередину кюветного блоку і, отже, на фотокатод ФЕУ в момент реєстрації хемілюмінесценції. Кінець голки 39 з добавкою розташовується на висоті 10 мм від поверхні досліджуваного розчину, добавка вводиться в будь-який момент по розсуду оператора. Оскільки стінки штока 37 дозатора прозорі для зовнішнього світла шток 37 покритий пековим лаком.

У кришку люка кюветного блоку умонтована світлонепроникна трубка 41, на яку надівається гумовий шланг (фіг.1.6) для подачі до капіляра пульсуючого тиску повітря від гумової груші з клапаном (від пульвізатора) і відповідним приводом (електродвигун 45 і шатун 46). У тонкому капілярі 44, зануреному в розчин кювети стовпчик рідини цілком не витісняється повітрям, що надходить імпульсом по гумовому шлангу 42, у результаті чого стовпчик рідини в капілярі 44 поводить як поршеньок, повідомляючи навколишньої капіляр рідини імпульс і, таким способом, здійснюючи необхідне перемішування розчину, при цьому капіляр 44 у силу малих розмірів не робить істотного впливу на хемілюмінесценцію.

Для градуировки в абсолютних одиницях інтенсивності світіння ми застосували як еталон сіль ураніацетату. На фіг.1.7А представлена пробірка 47 діаметром 12мм і висотою 40мм, у якій знаходиться сіль ураніацетату 48. Висота наповнення солі 48 у пробірці 10мм, а вага 340мг. На фіг.1.7Б пробірка 1.7А поміщена у світлонепроникний циліндр 49 з чорного паперу з бічним отвором 50 діаметром 0,8мм і площею 0,5мм² на рівні оптичної осі; цей варіант дає можливість вимірювати граничне світіння еталона і прийняти це світіння як вихідний стандарт.

У таблиці 1 представлені результати вимірів світіння ураніацетату в пробірці а) і б) при напрузі 1300В, що подається на ФЕУ (6 послідовних вимірів по 10 секунд кожне) при температурі 20°C, а також ураніацетату у повному обсязі й обмеженому отворі.

Таблиця 1

Показники хемілюмінесценції еталону (ураніацетату) і сироватки крові людини

Еталон			ХЛ сироватки крові людини			
темн. струм	Пробірка а/	Пробірка б/	темн. струм	Спонтанна ХЛ	ХЛ інд. Fe ²⁺	ХЛ інд. H ₂ O ₂
4655	143457	5623	4053	4624	5283	24975
4606	144115	5619	3999	4571	4749	20035
4601	143779	5516	4099	4341	4893	17691
4585	144036	5639	4053	4323	4793	18757
4535	145315	5559	4041	4329	4981	17929
4649	144621	5601	4032	4429	5053	18576
Σ =27671	Σ =865323	Σ =33557	Σ =24277	Σ =26617	Σ =29692	Σ =117963
461імг/с	14422імг/с	559імг/с	405імг/с	444імг/с	4949імг/10с	19660імг/10с
	13961фотон/с	98фотон/с		39фотон/с	90фотон/с	1561фотон/с

Ці показники при експлуатації приладу повинні бути порівнянні з хемілюмінесценцією (ХЛ) зразків сироватки чи крові інших біологічних субстратів. Як видно з таблиці, погіршеність вимірювань не перебільшує 2%.

В другій частині таблиці 1 представлений зразок результатів вимірів ХЛ сироватки крові людини (1мл трисбуфера + 0,3мл сироватки людини, як добавку використовували 0,05мол 1мг % розчину FeSO₄ і 0,05мл 3% розчину H₂O₂).

Таким чином, вирішена важлива проблема метрологічної служби: контроль чутливості і працездатності хемілюмінометрів, а також можливості порівнювати між собою результати вимірів, отриманих на різних приладах. Показники хемілюмінесценції, тобто рівень інтенсивності світіння ХЛ, індукованої Fe²⁺ і H₂O₂ апробовані на групі контрольних осіб, що зіставлені з працюючими що піддавалися впливу електромагнітних випромінювань СВЧ-діпазону і хворими хронічним пиловим бронхітом (ХПБ). Дані представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Показники хемілюмінесценції сироватки крові у осіб контрольної групи, хворих ХПБ і працюючих на СВЧ-установках (імг/с)

Групи обстежених	n	Інтенсивність хемілюмінесценції		
		Спонтанна ХЛ	Індуційована Fe ²⁺	Індуційована H ₂ O ₂

			«Швидкий» спалах	Светосума	«Швидкий» спалах	Светосума
Практич. здорові	44	52,6±4,3	161,1±7,8	122,2±7,5	2710±241	2018±111
Працюючі з СВЧ	34р	89,8±27,8>0,05	239,4±12,6<0,001	165,4±10,5<0,001	4826±294<0,001	2871±170<0,001
Хворі на ХПБ	43р	145,2±15<0,001	217,6±11,7<0,001	326,9±17,2<0,001	3791±215<0,001	2270±189>0,05

З таблиці випливає, що в здорових осіб контрольної групи інтенсивність ХЛ за всіма показниками значно нижче і, навпроти, у хворих ХПБ і працюючих у шкідливих умовах праці представилося можливим виявити в основній своїй масі достовірні відмінності в порівнянні з цифрами контролю.

Сигнал з ФЕУ II поступає на посилювач на базі польового транзистора, а потім на широкополосний підсилювач III із коефіцієнтом підсилення 3500-4000. Сигнал з підсилювача в свою чергу поступає на блок логічного відбору IV, який здійснює амплітудно-часовий аналіз імпульсів. В блок логічного відбору IV входять чотири інтегральних дискримінатора - два верхнього і два нижнього порогів. Віддискримінований сигнал після блоку логічного відбору поступають на семирозрядний лічильник імпульсів V.

Для перевірки працездатності лічильника V в ньому знаходиться генератор імпульсів частоти 10кГц.

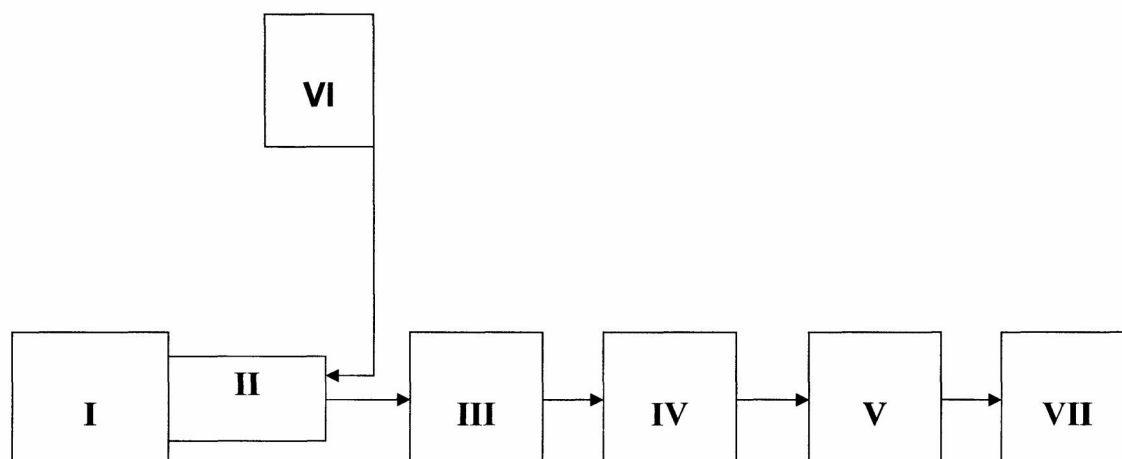
Таким чином, у цілому по заявленому винаході варто укласти:

1) Розроблено прилад - хемілюмінометр для виміру хемілюмінесценції біологічних рідин (крові, сироватки, плазми крові, слини, сечі), а також для вивчення структурно-функціональної організації біологічних мембран, функціональної активності клітинних популяцій, а також для рішення науково-практичних і фундаментальних задач медицини, біології, фармакології, токсикології, екології, сільського господарства і т.д.

2) Вирішено проблему світлозахисту фотоелектронного умножителя від зовнішнього паразитного світла, що дозволяє використовувати ФЕУ-130, призначеного для реєстрації зверхслабких потоків світла.

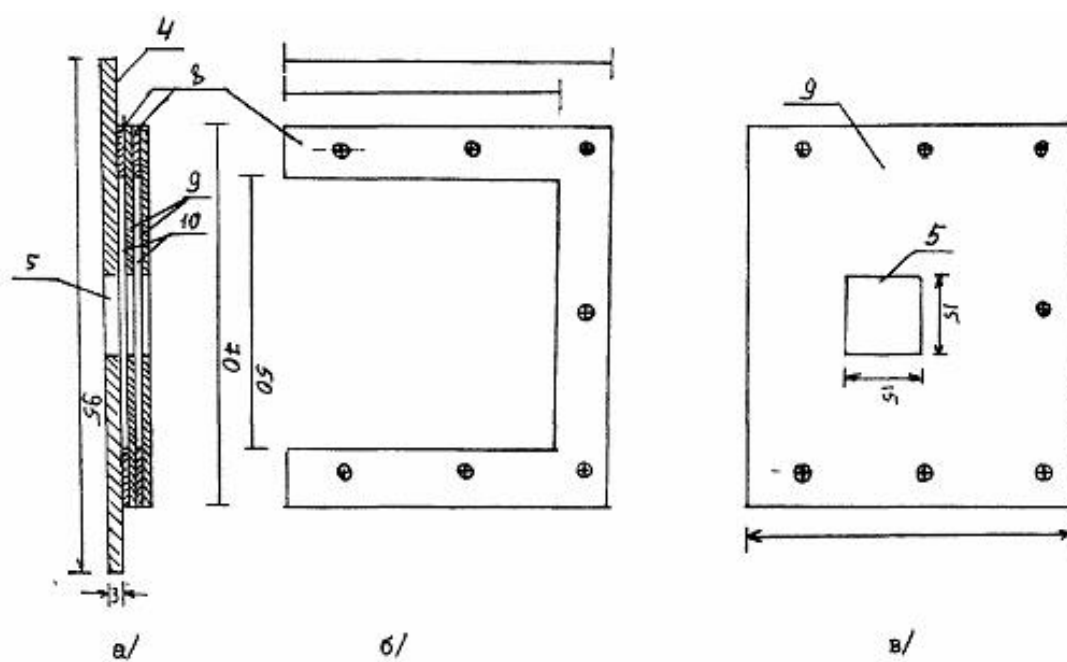
3) Застосування солі ураніацетату дозволило вирішити проблему еталона для метрологічної перевірки чутливості приладу і порівняння результатів вимірів, отриманих на різних приладах. Установлено мінімальний стандарт порога світіння еталона з площі еталона 0,5мм², рівних 198 фотонів, що перевищує світіння сироватки приблизно в 2 рази.

4) Прилад може використовуватися в науково-дослідних інститутах і клінічних лабораторіях.

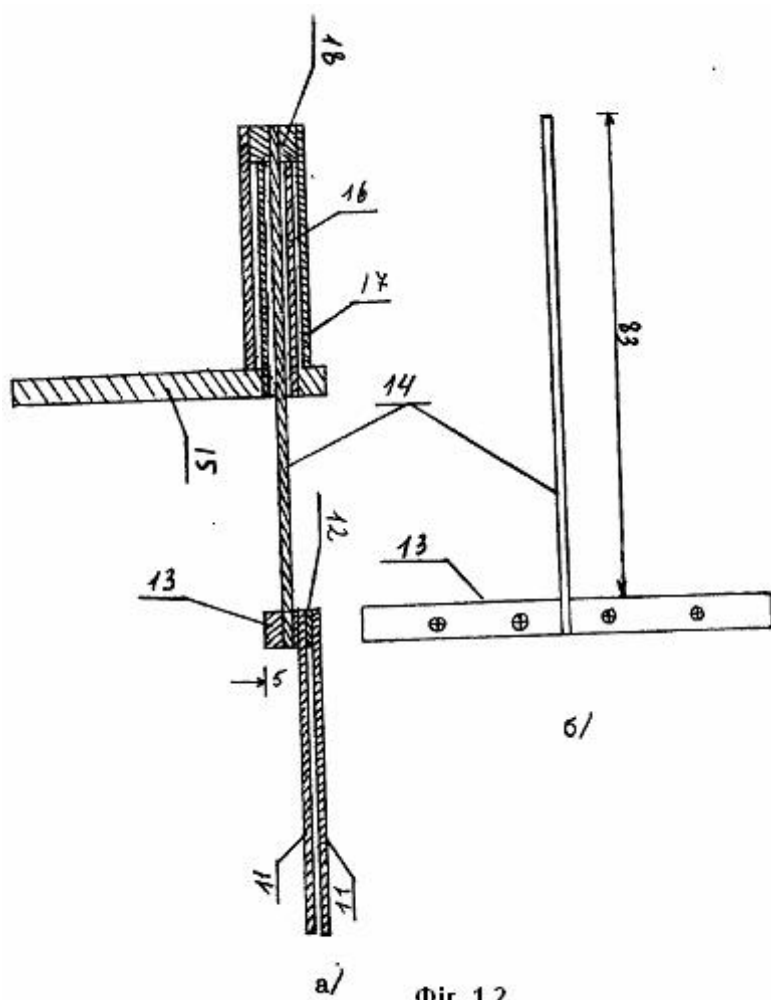


Фіг.1 Структурно-функціональна схема пристрою для реєстрації хемілюмінесценції біологічних рідин:

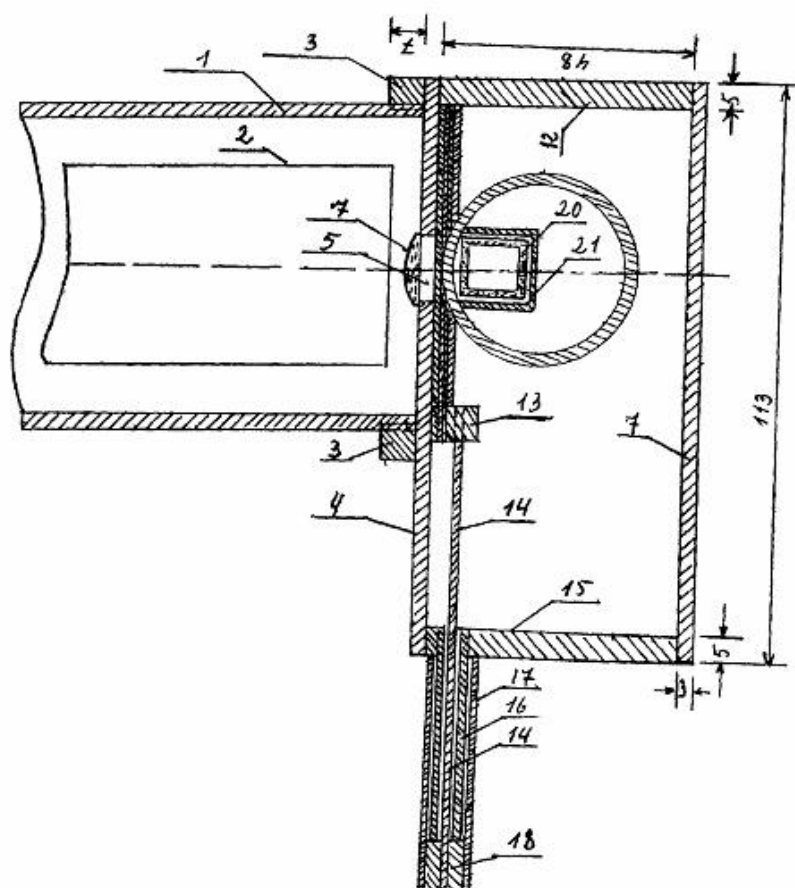
I - Кюветний блок; II - фотоелектронний умножитель (ФЕУ типу 130 чи 140); III - широкополосний підсилювач імпульсів, що надходять з ФЕУ; IV - аналізатор імпульсів; V - лічильник імпульсів; VI - високовольтне джерело постачання ФЕУ; VII – мікро-ЕОМ.



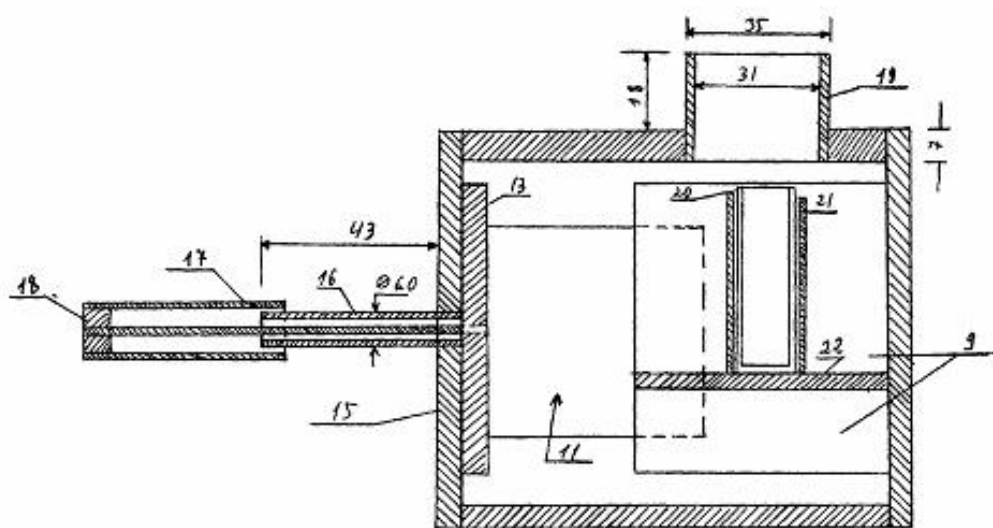
Фиг. 1.1



Фиг. 1.2



Фиг. 1.3А (масштаб: 1:1)



Фиг. 1.3Б (масштаб 1:1)

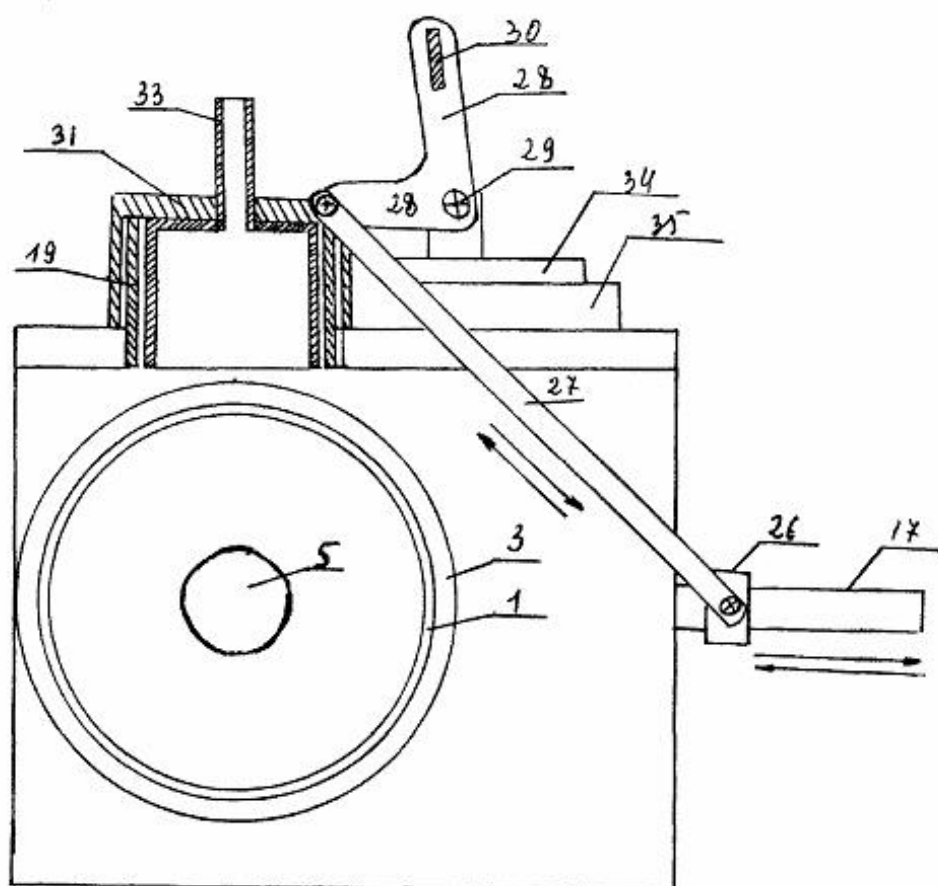
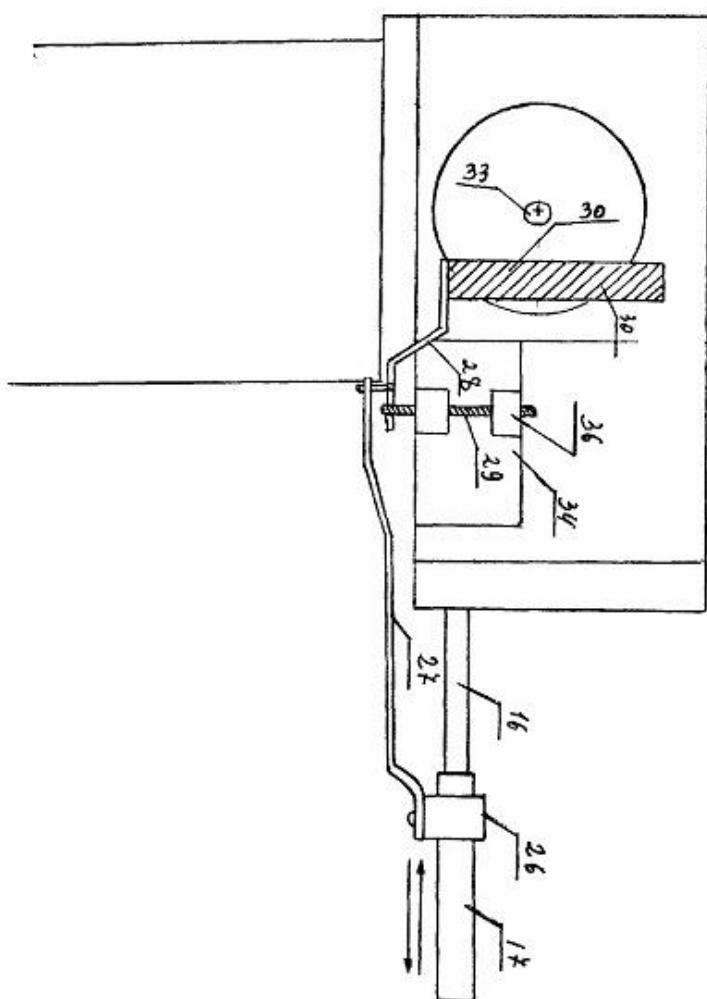


Fig. 1.4A



Фиг. 1.4Б

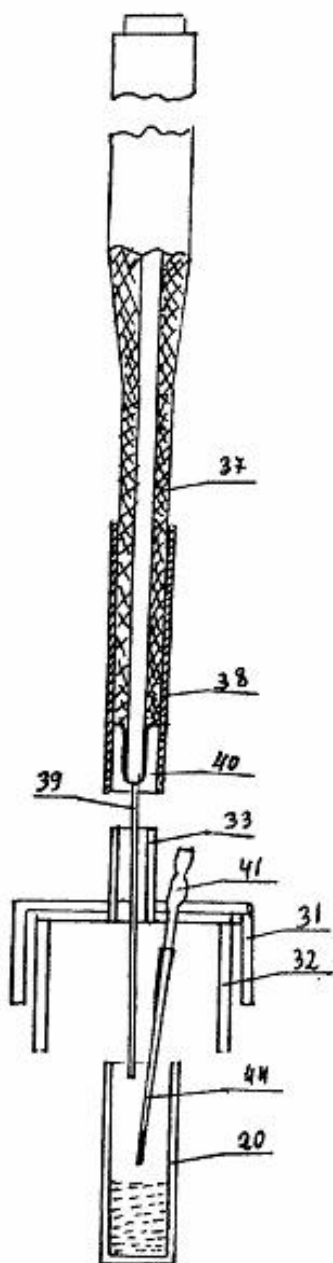


Fig. 1.5

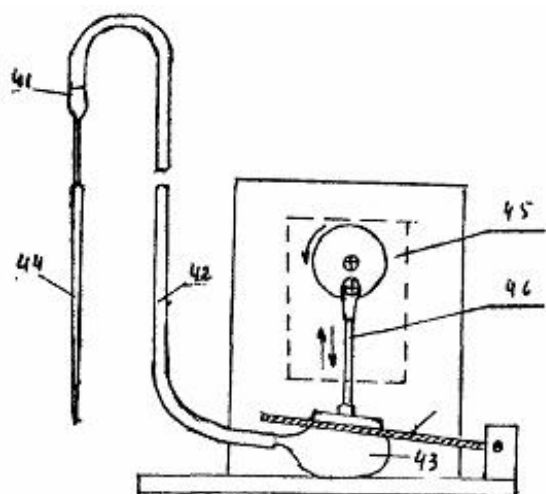


Fig. 1.6

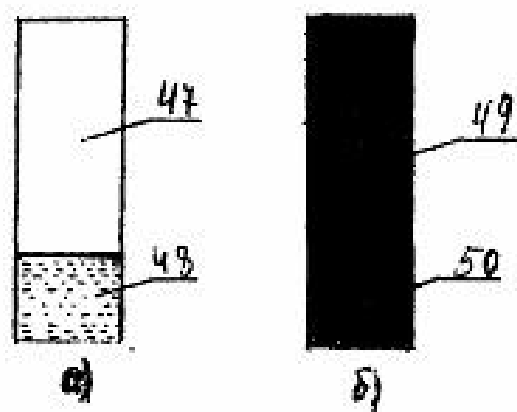


Fig. 1.7