

БІОЛОГІЧНІ ТА МЕДИЧНІ ПРИЛАДИ І СИСТЕМИ

УДК 615.47:616.073

С. В. Павлов, В. В. Шолота

УЛЬТРАФІОЛЕТОВА СПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ ПЛАЗМИ КРОВІ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АЛЬБУМІН – ГЛОБУЛІНОВОГО КОЕФІЦІЄНТУ У ДІАГНОСТУВАННІ ПАТОЛОГІЙ МОЛОЧНИХ ЗАЛОЗ

Вінницький національний університет, м. Вінниця

Анотація. У роботі наводяться експериментальні дослідження для визначення величини альбумін - глобулінового коефіцієнту за ультрафіолетовою спектрофотометрією плазми крові людини при діагностуванні патологій молочних залоз. Специфічність методу (71%) перевищує його чутливість (69% та 64%) для діагностування відповідно доброякісних змін (мастопатії) та раку молочних залоз.

Ключові слова: ультрафіолетова спектрофотометрія, плазма крові, альбумін-глобуліновий коефіцієнт, діагностування патологій молочних залоз, номограми, спектральні залежності, чутливість, специфічність.

Аннотация. В работе приводятся экспериментальные исследования для определения величины альбумин - глобулинового коэффициента за ультрафиолетовой спектрофотометрией плазмы крови человека при диагностике патологий молочных желез. Специфичность метода (71%) превышает его чувствительность (69% и 64%) для диагностики соответственно доброкачественных изменений (мастопатии) и рака молочных желез.

Ключевые слова: ультрафиолетовая спектрофотометрия, плазма крови, альбумин-глобулиновый коэффициент, диагностирование патологий молочных желез, номограммы, спектральные зависимости, чувствительность, специфичность.

Abstract. In the paper presents experimental researches for determining the magnitude of the albumin-globulin coefficient for ultraviolet spectrophotometry of human plasma in the diagnosis of breast pathologies. The specificity of the method (71%) exceeds its sensitivity (69% and 64%) for the diagnosis of benign changes (mastopathy) and breast cancer, respectively.

Key words: ultraviolet spectrophotometry, blood plasma, albumin-globulin coefficient, diagnosis of breast pathologies, nomograms, spectral dependencies, sensitivity, specificity.

Вступ

Рак молочної залози є найпоширенішим злоякісним новоутворенням серед жінок, яке займає перше місце в структурі онкологічної захворюваності та онкологічної смертності жінок в Україні [1]. Створення нових оптичних лабораторних методів та оптико-електронних засобів для діагностування виникнення патологічних змін в молочних залозах, в тому числі й раку, обумовлюється необхідністю встановлення факторів ризику наявності чи відсутності ракових захворювань, використовуючи високоінформативні додаткові методи лабораторної діагностики, менш травматичні, ніж біопсія біологічних тканин.

Так, біологічні рідини є більш доступнішими та безпечнішими для безпосереднього лабораторного аналізу у порівнянні із класичними методами дослідження гістологічних зрізів біологічних тканин. Відомо, що зміна біохімічної структури плазми крові внаслідок виникнення відхилень від нормального фізіологічного стану людини супроводжуються зміною концентрації амінокислот альбуміну і глобуліну у плазмі крові (альбумін-глобуліновий коефіцієнт), що обумовлює відповідні зміни спектральних характеристик плівки плазми крові при патологічних захворюваннях людини.

Плазма, як і цільна кров, є оптично неоднорідним середовищем [2], і для врахування розсіювання в ній при проведенні спектрофотометричних досліджень необхідно користуватися методикою з використанням сферичного фотометра [3-4]. За літературними даними на спектральну область 190 – 320 нм припадає поглинання основних білків плазми крові – альбумінів і глобулінів [5]. В роботах [6, 7] продемонстровано значні можливості ультрафіолетової спектрофотометрії плазми крові у діагностиці туберкульозу та гострих запальних процесів органів черевної порожнини.

Тому доцільно в зазначеній спектральній області 190 – 320 нм за методом ультрафіолетової спектрофотометрії дослідити величини альбумін – глобулінового коефіцієнту для плазми крові людини при різних станах молочних залоз.

Мета статті

Мета статті - дослідження можливостей ультрафіолетової спектрофотометрії визначення альбумін – глобулінового коефіцієнту у діагностиці виникнення та диференціації ступеня важкості патології молочної залози.

Схема і методика спектрофотометричних вимірювань

У результаті взаємодії спрямованого пучка випромінювання з оптично неоднорідними об'єктами має місце просторово – кутове (в межах 4π) розсіювання його інтенсивності. Досліджувати таке поле

розсіяного випромінювання можна за допомогою спеціального фотометричного пристрою у вигляді порожнистої сфери. Внутрішня поверхня такої сфери вкривається шаром білої рівномірно розсіюючої фарби для вимірювання коефіцієнтів відбивання, пропускання та поглинання світлорозсіюючих об'єктів у спектральному інтервалі від 220 нм до 1800 нм.

Методи проведення спектрофотометричних вимірювань і теорія фотометричної сфери (ФМС) описані в численних публікаціях, наприклад [3, 4]. Оптична схема та експериментальна конструкція фотометричної сфери у двох площинах перерізу зображена на рис. 1.

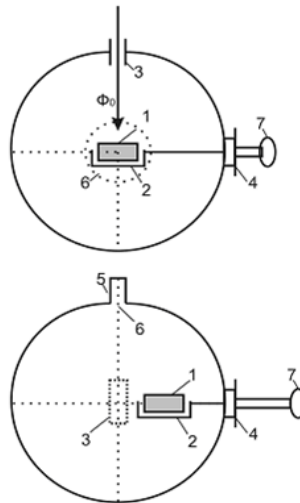


Рисунок 1 - Схема і конструкція фотометричної сфери: 1 – касета з досліджуваним зразком; 2 – світлопроникний ковпачок; 3 – вхідний отвір; 4 – кругла шкала; 5 – приймач випромінювання; 6 – вхідний отвір для приймача випромінювання; 7 – ручка

Ковпачок 2 з різних боків вкритий білим розсіюючим шаром із того ж матеріалу, що і внутрішня поверхня сфери, а з боку зразка на ньому наклеєний чорний поглинаючий бархат. За допомогою рукоятки 7 зразок плазми крові може фіксуватися в центрі сфери або навпроти вхідного отвору. Кути повороту касети відраховуються за шкалою 4. Приймач випромінювання 5 знаходиться перед отвором 6 у площині касети із зразком.

Такий фотометричний пристрій використовується як приставка до заводських спектрофотометрів СФ-4; СФ-5 і т. ін. Він закріплюється на виході спектрофотометрів замість фотометричної головки з фотоелементом.

Методика вимірювання спектрального коефіцієнта поглинання τ така: з касети знімають світлопроникний ковпачок 2; опромінюючий потік світла посилають на внутрішню поверхню сфери і вимірюють відлік приймача N_1 ; спрямовують опромінюючий потік на досліджуваний об'єкт - у цьому випадку сигнал приймача N_2 буде зумовлюватися, як відбитим від об'єкта потоком, так і потоком, що пройшов крізь нього; згідно з теорією фотометричної сфери, в цьому випадку коефіцієнт поглинання τ буде визначатись як [7]

$$\tau = 1 - \frac{N_2}{N_1}. \quad (1)$$

Експериментальні дослідження концентрації альбумінів і глобулінів у плазмі крові та величини альбумін - глобулінового коефіцієнту

Розглянемо аналітичну методику визначення альбумін – глобулінового коефіцієнту методом ультрафіолетової спектроскопії зразків плазми крові. В основу нами було взято експериментальний підхід, детально проаналізований і представлений у роботах [5-7].

З точки зору абсорбційного спектрального аналізу плазму крові можна наближено розглядати як двокомпонентну суміш. Щоби кількісно визначити концентрації альбумінів і глобулінів у плазмі крові, необхідно мати два рівняння для оптичних густин, складені для характеристичних довжин хвиль λ_1 (перша компонента) і λ_2 (друга компонента), а саме

$$\begin{aligned} D_{\lambda_1} &= \varepsilon_{\lambda_1}^a \cdot c^a \cdot l + \varepsilon_{\lambda_2}^b \cdot c^b \cdot l, \\ D_{\lambda_2} &= \varepsilon_{\lambda_2}^a \cdot c^a \cdot l + \varepsilon_{\lambda_1}^b \cdot c^b \cdot l, \end{aligned} \quad (2)$$

де $\varepsilon_{\lambda_1}^a$ і $\varepsilon_{\lambda_2}^a$ - значення екстинкцій компоненти «альбумін» для першої та другої довжини хвиль; $\varepsilon_{\lambda_1}^b$ і $\varepsilon_{\lambda_2}^b$ - значення екстинкцій компоненти «глобулін» для першої та другої довжини хвиль; c^a і c^b - шукані концентрації компонент; l - товщина кювети; $D_{\lambda_1}, D_{\lambda_2}$ - визначені експериментально оптичні густини рідини для характерної довжини хвилі λ_1 та λ_2 .

Розв'язавши систему рівнянь (2), отримуємо вирази для визначення відповідних концентрацій альбумінів і глобулінів у зразках плазми крові

$$\begin{aligned} c^b &= \frac{\varepsilon_{\lambda_1}^a \cdot D_{\lambda_2} - \varepsilon_{\lambda_2}^a \cdot D_{\lambda_1}}{(\varepsilon_{\lambda_1}^a \cdot \varepsilon_{\lambda_2}^b - \varepsilon_{\lambda_2}^b \cdot \varepsilon_{\lambda_1}^b) \cdot l}, \\ c^a &= \frac{D_{\lambda_1}}{\varepsilon_{\lambda_1}^a \cdot l} - \frac{\varepsilon_{\lambda_1}^a \cdot \varepsilon_{\lambda_1}^b \cdot D_{\lambda_2} - \varepsilon_{\lambda_2}^a \cdot \varepsilon_{\lambda_1}^b \cdot D_{\lambda_1}}{(\varepsilon_{\lambda_1}^a)^2 \cdot \varepsilon_{\lambda_2}^b \cdot l - \varepsilon_{\lambda_1}^a \cdot \varepsilon_{\lambda_1}^b \cdot \varepsilon_{\lambda_2}^a \cdot l}. \end{aligned} \quad (3)$$

Досліджувалися спектри коефіцієнта пропускання τ у спектральному інтервалі $\lambda = 220 - 320$ нм через кожні 5 нм з наступним розрахунком оптичної густини D згідно з формулою $D = -\lg \tau$.

Характеристичними у сенсі екстремального поглинання альбумінів і глобулінів довжинами хвиль для плазми крові є $\lambda_1 = 230$ нм і $\lambda_2 = 280$ нм, відповідно. Виходячи з цього система рівнянь (3) набуває вигляду

$$\begin{aligned} c_G &= \frac{\varepsilon_A^{230} \cdot D_{280} - \varepsilon_A^{280} \cdot D_{230}}{(\varepsilon_G^{280} \cdot \varepsilon_A^{230} - \varepsilon_A^{280} \cdot \varepsilon_G^{230}) \cdot l}, \\ c_A &= \frac{D_{230} - c_G \cdot \varepsilon_A^{230} \cdot l}{\varepsilon_A^{230} \cdot l}, \end{aligned} \quad (4)$$

де ε_A^{230} і ε_A^{280} - значення величини екстинкції для альбумінів для вказаних характерних довжин хвиль; ε_G^{230} і ε_G^{280} - екстинкція для глобулінів для вказаних довжин хвиль.

Величини показника ослаблення або екстинкції двох основних білків плазми крові визначалися шляхом дослідження залежностей оптичної густини рідини для характерної довжини хвилі λ_1 або λ_2 окремо для набору розчинів глобулінів і набору розчинів альбумінів з наперед відомими їх концентраціями. Для визначення таких табуляційних кривих – номограм досліджувалися спектри поглинання для кожного із білків на розчинах 6-7 різних концентрацій.

На основі концентрацій альбуміну та глобуліну визначався альбумін-глобуліновий k коефіцієнт $k = c_A / c_G$.

Аналіз і обговорення експериментальних даних

Проведено порівняльні дослідження величини альбумін – глобулінового коефіцієнту для плазми крові трьох груп пацієнтів: здорові (група **A**), хворі з доброякісними змінами (група **B**) і з раком молочної залози (група **C**). Результати експериментальних досліджень концентраційних номограм для двох характерних λ в ультрафіолетовій ділянці спектру та спектральні залежності коефіцієнту поглинання плазми крові для досліджуваних груп пацієнтів приведені відповідно на рис. 2 (група **A**), рис. 3 (група **B**) і рис. 4 (група **C**).

Порівняльний аналіз одержаних даних про структуру ультрафіолетових спектрів поглинання випромінювання зразками плазми крові виявив такі їх особливості.

1. Незалежно від фізіологічного стану пацієнтів трьох (А, В, С) груп спектральні криві є залежними із двома характеристичними максимумами поглинання, що локалізовані в околі двох довжин хвиль - $\lambda_1 = 220 \text{ нм}$ (фракція білків альбумінів) і $\lambda_2 = 280 \text{ нм}$ (фракція білків глобулінів).
2. Апроксимація залежностей, приведені на серії рис. 2 (а), рис.3 (а), рис. 4 (а), методом спектрометричного абсорбційного аналізу дозволяє адекватно визначити стабільно нахилені номограми, з яких визначаються конкретні величини концентрацій альбумінів і глобулінів зразків плазми крові здорових пацієнтів (група А), хворих з доброякісними (група В) і злоякісними (група С) змінами молочної залози. Тангенси кутів нахилу концентраційних кривих – номограм індивідуальні для різних груп здорових і хворих пацієнтів.
3. Структура спектрів поглинання (рис. 2 (б), рис. 3(б), рис. 4 (б)) ультрафіолетового випромінювання зразками плазми пацієнтів з різним фізіологічним станом індивідуальна для серії досліджень у межах окремих груп пацієнтів – в залежності від типу патології змінюється співвідношення між величинами характеристичних екстремумів поглинання в околі двох довжин хвиль - $\lambda_1 = 220 \text{ нм}$ (фракція білків альбумінів) і $\lambda_2 = 280 \text{ нм}$ (фракція білків глобулінів).

Отже, можна констатувати, що альбумін – глобуліновий коефіцієнт k є величиною, залежною від фізіологічного стану людини.

У таблиці 1 представлені систематизовані у межах трьох груп А, В, С середньостатистичні значення альбумін – глобулінового коефіцієнту k та дисперсія їх розкиду.

Таблиця 1 - Альбумін - глобуліновий коефіцієнт плазми крові пацієнтів груп А, В, С

Група	А (17 пацієнтів)	В (16 пацієнтів)	С (14 пацієнтів)
k	$1,84 \pm 0,29$	$1,61 \pm 0,22$	$1,55 \pm 0,28$

З аналізу статистичних результатів дослідження співвідношення між концентраціями білків альбумінів і глобулінів плазми крові здорових (група А) та хворих з доброякісними (група В) і злоякісними змінами (група С) молочної залози випливає, що визначення альбумін-глобулінового коефіцієнту можна покласти в основу диференціації здорових і хворих пацієнтів. Як видно, середньостатистична величина і діапазон зміни вказаного коефіцієнту, визначеного в межах контрольної групи А, не перекриваються з аналогічними значеннями коефіцієнтів, що характеризують концентраційну структуру білків плазми крові хворих групи В і групи С, відповідно.

Більш детальний (всередині груп) аналіз експериментальних даних (таблиця 2) про можливість діагностичного використання величини альбумін – глобулінового коефіцієнту дозволив визначити чутливість Se та специфічність Sp методу абсорбційного спектрального аналізу при його різних застосуваннях.

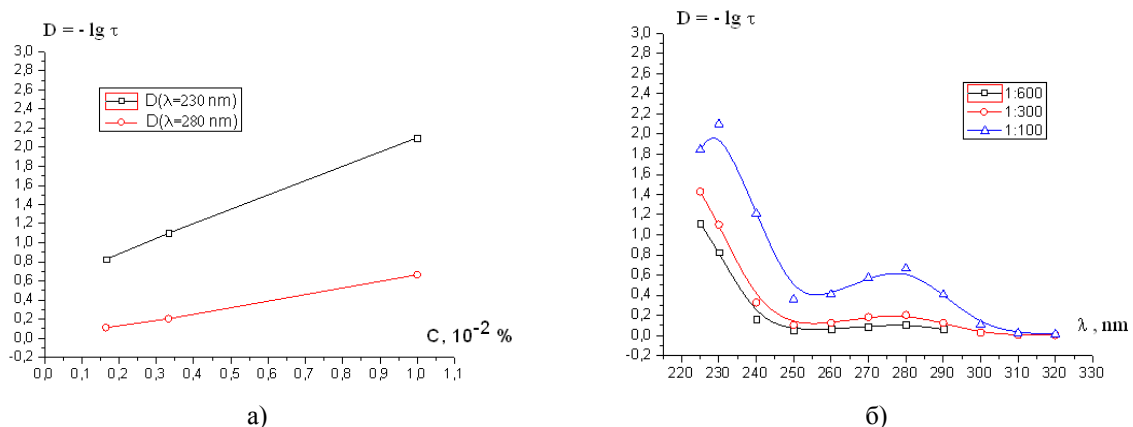


Рисунок 2 - Номограми концентрацій альбумінів і глобулінів (а) та спектральні залежності коефіцієнту поглинання (б) плазми крові здорової людини з групи А

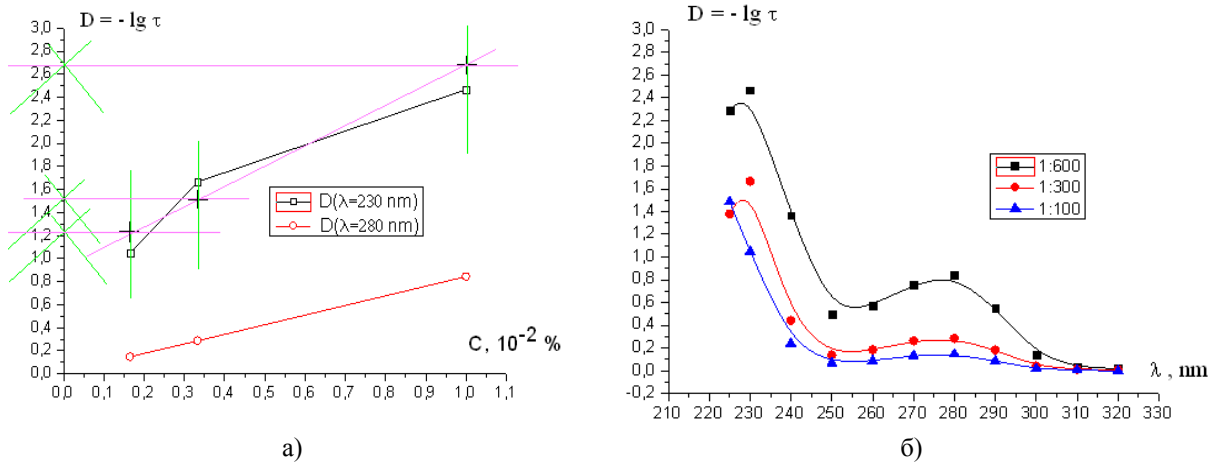


Рисунок 3 - Номограми концентрацій альбумінів і глобулінів (а) та спектральні залежності коефіцієнту поглинання (б) плазми крові людини з доброякісними змінами молочної залози з групи В

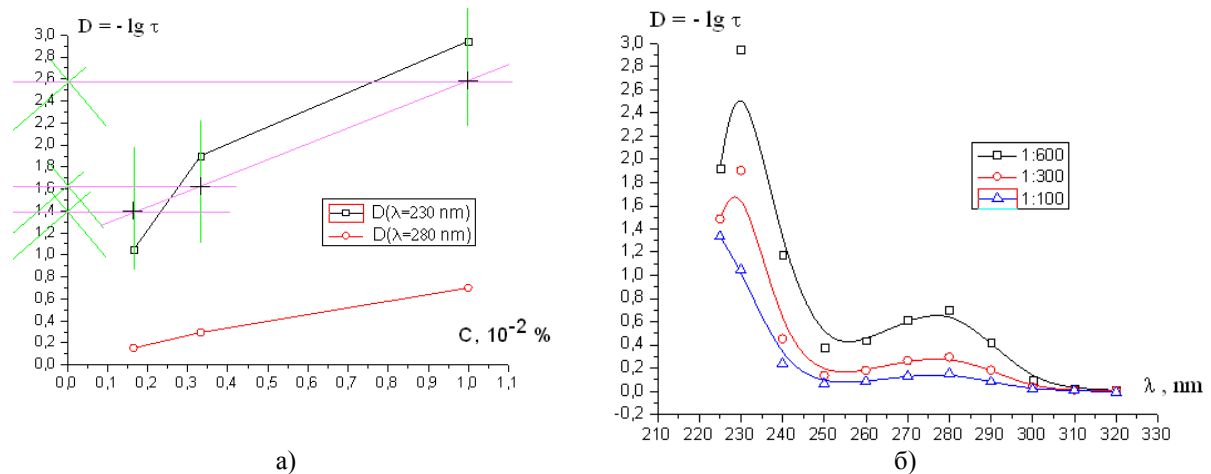


Рисунок 4 - Номограми концентрацій альбумінів і глобулінів (а) та спектральні залежності коефіцієнту поглинання (б) плазми крові людини з раком молочної залози з групи С

Таким чином, чутливість Se і специфічність Sp методу абсорбційного спектрального аналізу в ультрафіолетовій спектрофотометрії для визначення доброякісних змін молочної залози є найвищими і складають: $Se = \frac{a}{a+c} = 69\%$ і $Sp = \frac{b}{d+b} = 71\%$.

Таблиця 2 – Внутрішньогруповий розподіл зразків за наявністю захворювання на основі значення альбумін-глобулінового коефіцієнта

Група (кількість зразків)	Здорові	Хворі
Група А (17 зразків)	$b = 12$	$d = 5$
Група В (16 зразків)	$c = 5$	$a = 11$
Група С (14 зразків)	$c^* = 5$	$a^* = 9$

Чутливість та специфічність спектрофотометричного методу абсорбційного аналізу плазми крові для діагностики раку молочної залози склали $Se = \frac{a^*}{a^* + c} = 64\%$ та $Sp = \frac{b}{d + b} = 71\%$.

Специфічність методу у диференціації патологічних станів груп В і С склала $Sp = \frac{a^*}{a^* + a} = 45\%$.

Отже, альбумін-глобуліновий коефіцієнт може бути покладено в основу лише формування групи ризику запального або онкологічного стану молочної залози.

Висновки

1. Проведене дослідження можливостей ультрафіолетової спектрофотометрії визначення альбумін – глобулінового коефіцієнту плазми крові людини у діагностиці виникнення та диференціації ступеня важкості патології молочної залози дозволило встановити, що даний метод може бути застосований як додатковий метод діагностики запального або онкологічного стану молочних залоз. Метод відрізняється від відомих методів меншою травматичністю для організму людини, простотою реалізації у порівнянні із відомими гістопатологічними лабораторними методами та засобами діагностики молочних залоз.

2. Оцінено інформативність методу ультрафіолетової спектрофотометрії для визначення альбумін – глобулінового коефіцієнту плазми крові людини при діагностуванні патологічних станів (запальні процеси, рак) молочних залоз у вигляді показників чутливості та специфічності. Визначено, що розглянутий метод за показниками специфічності (71%) переважає показники чутливості (69% та 64%) для діагностування відповідно доброякісних змін (мастопатії) та раку молочної залози. Це означає, що розглянутий метод більш ефективний тоді, коли потрібно з більшою впевненістю довести наявність хвороби молочних залоз.

Список літератури

1. Михайлович Ю.Й., Журбенко А.В. Рак грудної залози, реальна проблема для вирішення на національному рівні / Ю. Й. Михайлович, А. В. Журбенко // Український Радіологічний Журнал. Додаток 1. – 2016.- с. 7-8.
2. Тучин В.В. Исследование биотканей методами светорассеяния/ В.В. Тучин // Успехи физических наук. – 1997. – Т.167. – С. 517-539.
3. Сахновский М.Ю. О точности спектрофотометрических измерений на интегральном шаровом фотометре / М.Ю. Сахновский // ЖПС. – 1981. - № 5467-81.
4. Петрук В. Г. Спектрофотометрія світлорозсіювальних середовищ (теорія і практика оптичного вимірювального контролю) / Петрук В. Г. – Вінниця: УНІВЕРСУМ-Вінниця, 2000. – 207 с.
5. Guminestskij S.G. Spectrophotometric properties of vein blood plasma in UV- zone patients with urgent surgical pathology of abdominal region organs / S.G. Guminestskij, I.J. Polianski, A.V. Motrich, Grunchuk F.W. // Proc. SPIE. – 2006. – Vol. 6254. – P. 62541T.
6. Ushenko O.G. Optical properties of urine, blood plasma and pulmonary condensate of the patients with pulmonary form of tuberculosis / O.G. Ushenko, S.G. Guminetsky, A.V. Motrich // Fotelektronika. – 2007. – Vol.16. – P.133 – 139.
7. Мотрич А.В. Визначення альбумін/глобулінового коефіцієнту плазми крові здорових і хворих пацієнтів спектрофотометричним методом / А.В. Мотрич, О.Г. Ушенко, С.Г. Гумінецький, Ф.В. Гринчук, П.М. Григоришин // Науковий вісник ЧНУ. - Вип.. 344: Фізика. Електроніка. – Чернівці: ЧНУ, 2007. – С. 65-70

Відомості про авторів

Павлов Сергій Володимирович – доктор технічних наук, професор, професор кафедри біомедичної інженерії, 21021, м. Вінниця, Вінницький національний технічний університет, Хмельницьке шосе 95.

Шолота Владислава Владиславівна – студентка, 21021, м. Вінниця, Вінницький національний технічний університет, Хмельницьке шосе 95.