

# Скрининговая медицинская диагностика с помощью ДЛС

---

*А.Г.Березин, И.Е.Вязов, В.Я.Заславский,  
А.И.Надеждинский, Я.Я.Понуровский,  
И.П.Попов, Д.Б.Ставровский, Ю.П.Шаповалов,  
С.М.Чернин*

**DLS**  

---

**LAB**

*Отдел ДЛС Института общей физики  
им.А.М.Прохорова РАН*

# Введение

Идея измерять концентрацию различных молекул в выдохе человека с помощью ДЛС имеет достаточно длительную историю. Мы предложили этот подход и начали работы в данном направлении почти 20 лет назад [1-3].

1. A.I.Kuznetzov, K.L.Moskalenko, A.I.Nadezhdinskii and E.V.Stepanov, Sensor Based on Tunable Diode Lasers and Mid-IR-Fiber Optic and Their Diagnostic Applications in Medicine and Enviromental Protection, Journal de Physique IV, 1, C7-253 (1991)
2. K.L.Moskalenko, N.Ya.Sobolev, I.A.Adamovskay, E.V.Stepanov, A.I.Nadezhdinskii, Susan McKenna-Lawlor, Tunable diode lasers application for fully automated absolute measurements of CO and CO2 concentrations in human breath, Proc.SPIE, 2205, 440-447 (1994)
3. K.L.Moskalenko, A.I.Nadezhdinskii, E.V.Stepanov, Tunable diode laser spectroscopy application for ammonia and methane content measurements in human breath, Proc.SPIE, 2205, 448-452 (1994)

# Анализ молекулярного состава выдоха человека

Более 400 различных молекул было обнаружено в выдохе человека [см., например, 4]. В этой работе приведен обзор молекул обнаруженных в выдохе, для которых известна или может быть постулирована связь с конкретными заболеваниями, что может быть использовано для медицинской диагностики. Это является традиционным подходом применения ДЛС для медицинской диагностики. В этом направлении работали десятки групп, получивших весьма интересные научные результаты. **Однако, данный подход остался в физ.-хим.**

**лабораториях и не нашел реальных применений в**

**клиниках.** Причина: данный подход предполагает связь между молекулой и болезнью. Следовательно, он подразумевает: один прибор (одна молекула) для диагностики данного заболевания.

**Вывод: принимая во внимание стоимость систем на основе ДЛ, традиционный подход является экономически не эффективным.**

4. Risby, T.H., Trace gas analysis in exhaled human breath for disease diagnosis, Johns Hopkins Med. Inst., Baltimore, MD, USA

# Скрининговая медицинская диагностика

В наших работах предлагался альтернативный подход: человеческий организм является чрезвычайно сложной оптимизированной системой. Заболевание выводит эту систему из состояния равновесия, что может быть обнаружено.

Пример: температура. Нормальная температура равна 36.6°C. Изменение температуры на 0.4°C (0.1 %) свидетельствует о заболевании. Это справедливо и для содержания различных молекул в крови. В здоровом теле оно имеет какую то величину. Наличие заболевания выводит систему из равновесия, приводя к значительному изменению содержания молекул в крови. **Цель: определить молекулярные маркеры для скрининговой медицинской диагностики.**

Ниже приведены концентрации молекул, которые могут рассматриваться как маркеры, в атмосфере (стандартная атмосфера США) и в выдохе человека, измеренные в наших работах [2, 3].

Molecule	CO <sub>2</sub>	CO	NH <sub>3</sub>	CH <sub>4</sub>
Atmosphere	330 ppm	0.15 ppm	50 ppt	1.7 ppm
Human breath	3 %	0.5-1 ppm	100-300 ppb	4-6 ppm

# Выбор маркера

В настоящем приборе в качестве маркера был выбран аммиак. Мотивация этого выбора связана с нашими работами по дистанционному детектированию ВВ. ВВ являются метастабильными объектами, что приводит к их распаду и выделению энергии. Распад ВВ сопровождается последующими сложными химическими процессами. Итогом этих вторичных процессов является изоциановая кислота -  $\text{HNCO}$ , которая при взаимодействии с водой дает  $\text{NH}_3$  и  $\text{CO}_2$ .

Все сказанное выше справедливо и для человеческого организма.

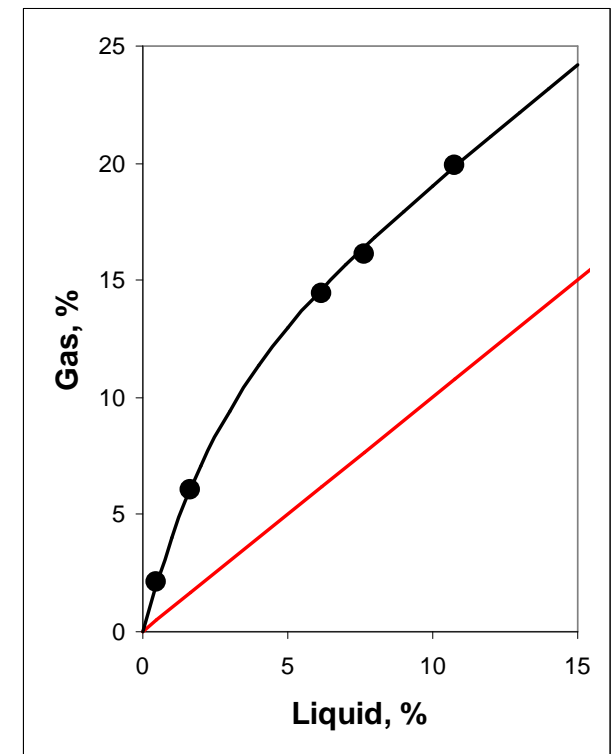
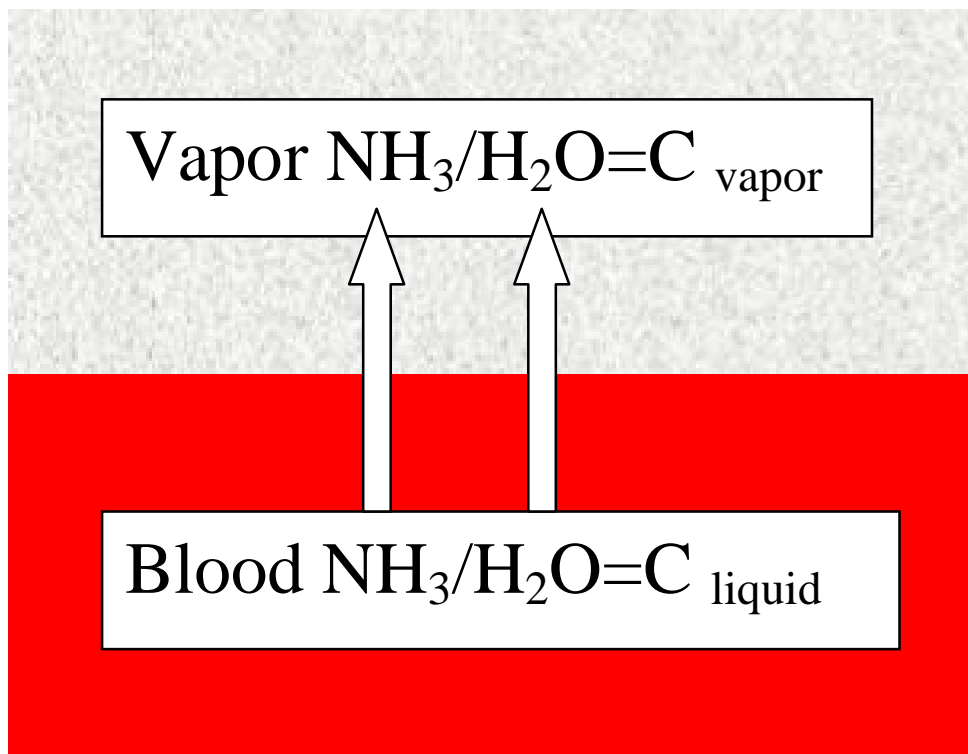
**Поэтому в качестве первого маркера для скрининговой диагностики был выбран аммиак.**

**Внутри нашего организма происходят очень сложные процессы, сопровождающие преобразование азота в пищу в аммиак в крови и последующий его вывод.**

**Любые заболевания подсистем, участвующих в этих сложных процессах, приведут к изменению содержания аммиака в крови.**

# Что измеряется?

Цель: измерить концентрацию молекулы аммиака в крови. На самом деле измеряется поток молекул аммиака вследствие испарения крови. Кровь имеет очень сложный состав. В нашем случае кровь можно рассматривать как раствор аммиака в воде (основная составляющая крови).



Известно, что в идеальном случае, концентрация примеси в газовой фазе равна ее концентрации в жидкой фазе (закон Рауля – красная прямая). На самом деле это не так. Наш эксперимент для слабого раствора аммиака в воде – концентрация  $\text{NH}_3$  в газовой фазе в 18 раз больше, чем в жидкой.

# Что измеряется?

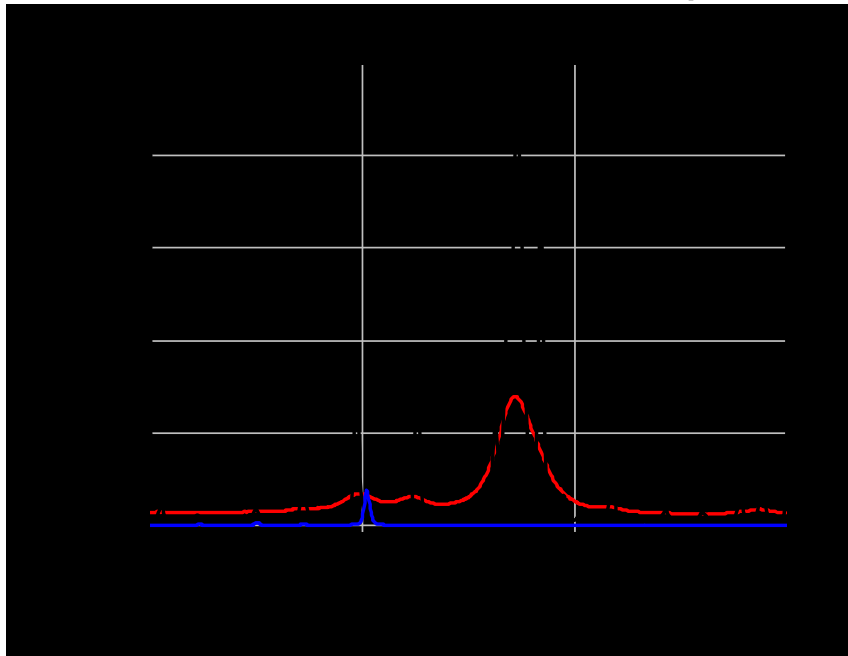
Интересующий нас результат есть отношение потока молекул аммиака к потоку молекул воды.

Поэтому в качестве второго маркера была выбрана молекула  $H_2O$ .

При проведении предварительных экспериментов было обнаружено, что данное отношение для ладони почти в 100 больше по сравнению с выдохом. Поэтому мы декларируем аммиак не в выдохе, как это традиционно принято в ДЛС, а производим измерение его выделения кожей.

# Спектральные диапазоны

Аналитический спектральный диапазон для  $\text{NH}_3$  был выбран с помощью разработанной Понуровским программы моделирования спектров молекул “Line-by-Line”. Требования: интенсивная линия  $\text{NH}_3$  и минимизация влияния влажности и содержания метана на измерения.



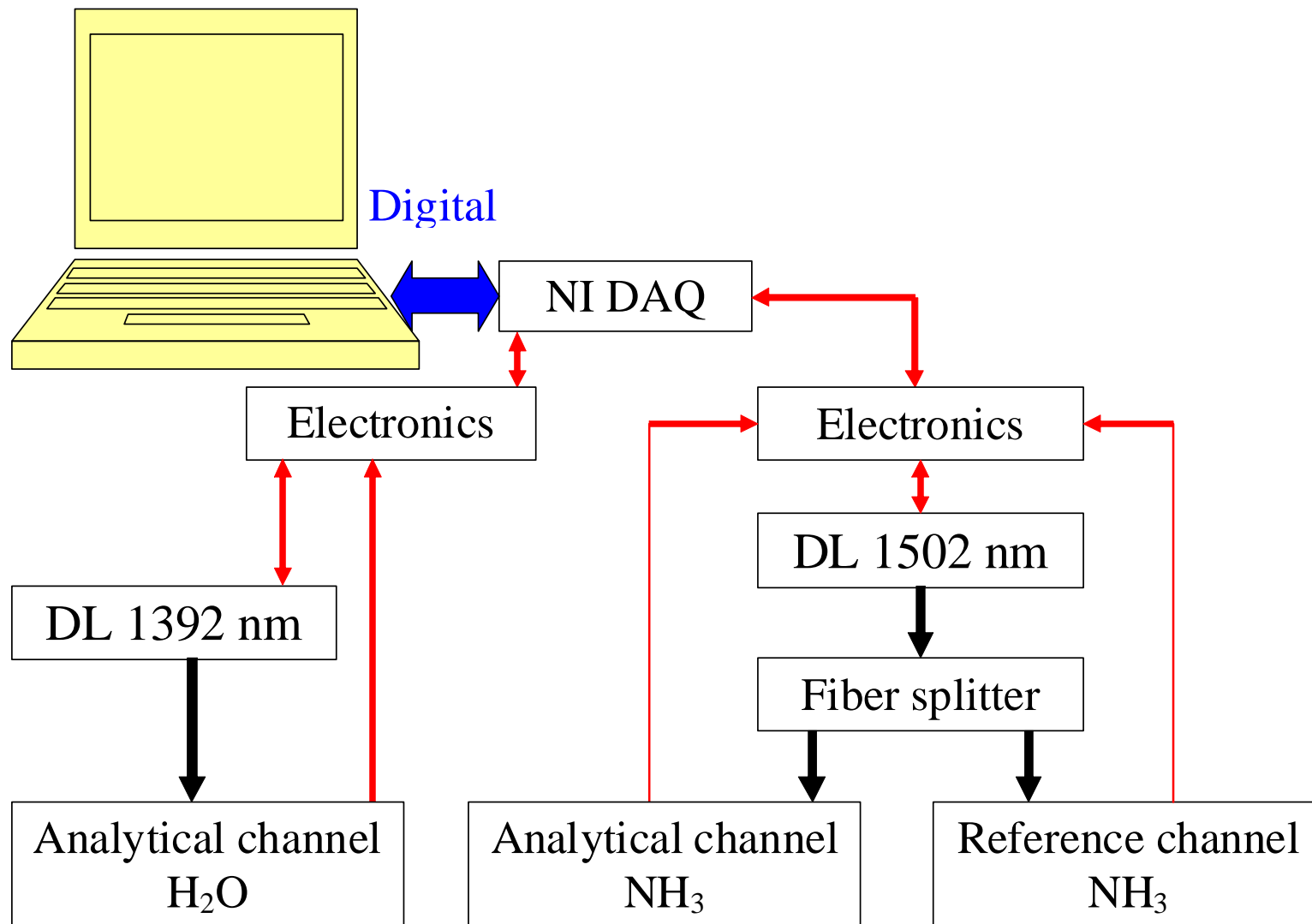
Спектр поглощения аммиака в выбранном спектральном диапазоне, измеренный с помощью ДЛ:  $L = 2$  м; черный – 2.13 мБар чистого  $\text{NH}_3$ ; красный - 2.13 мБар  $\text{NH}_3$  в 1 Бар сухого воздуха; синий – атмосфера с 50 % влажности.

Аналитическая спектральная линия для детектирования аммиака для целей скрининговой диагностики. Сечение линии на первом этапе было взято из <http://vpl.astro.washington.edu/spectra> (точность  $\sim 10 - 20$  %).

Для измерения воды использовалась линия водяного пара  $1.392 \mu$ .



# Блок схема



Arrows: blue – digital connection, red – analog signals, black – optical fibers.

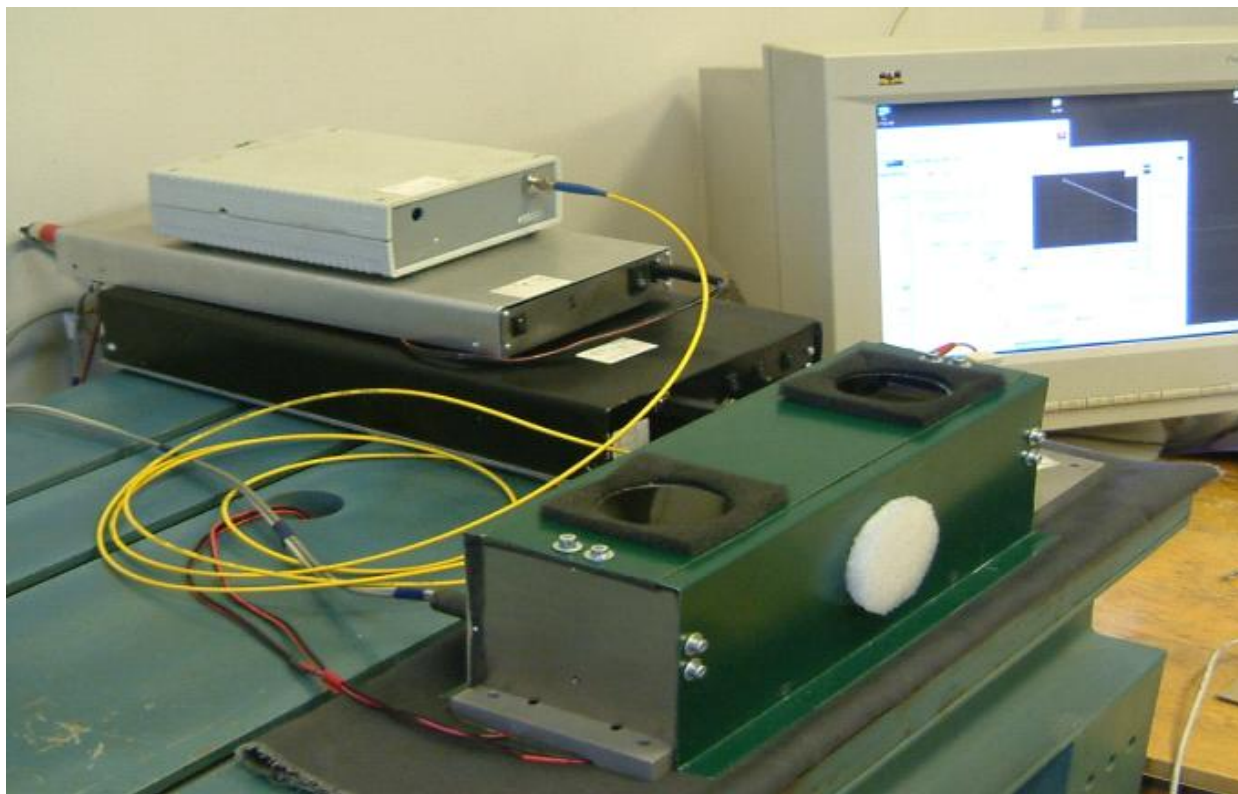
# Первый прототип установки



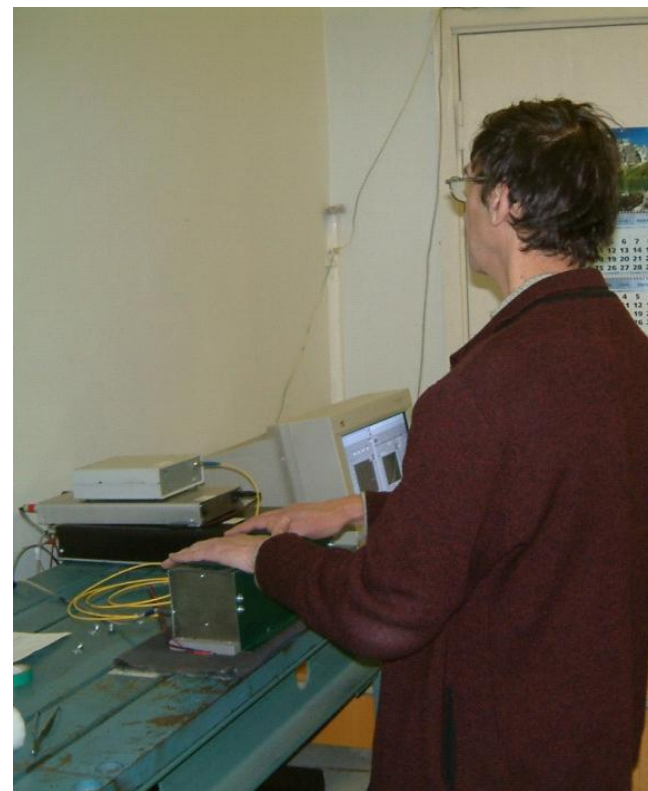
Внешний вид первого прототипа экспериментальной установки, предназначенной для измерения аммиака с ладони исследуемого. Вентилятор создает поток воздуха через установку. Этот поток сдувает аммиак с ладони испытуемого. Измеряется концентрация аммиака, которое определяется потоком аммиака с ладони, объемом установки, временем обновления газа в установке, а также коэффициентом заполнения многоходовой кюветы потоком газа.

**Проблема – калибровка измеряемых величин.**

# Экспериментальная установка для скрининговой диагностики



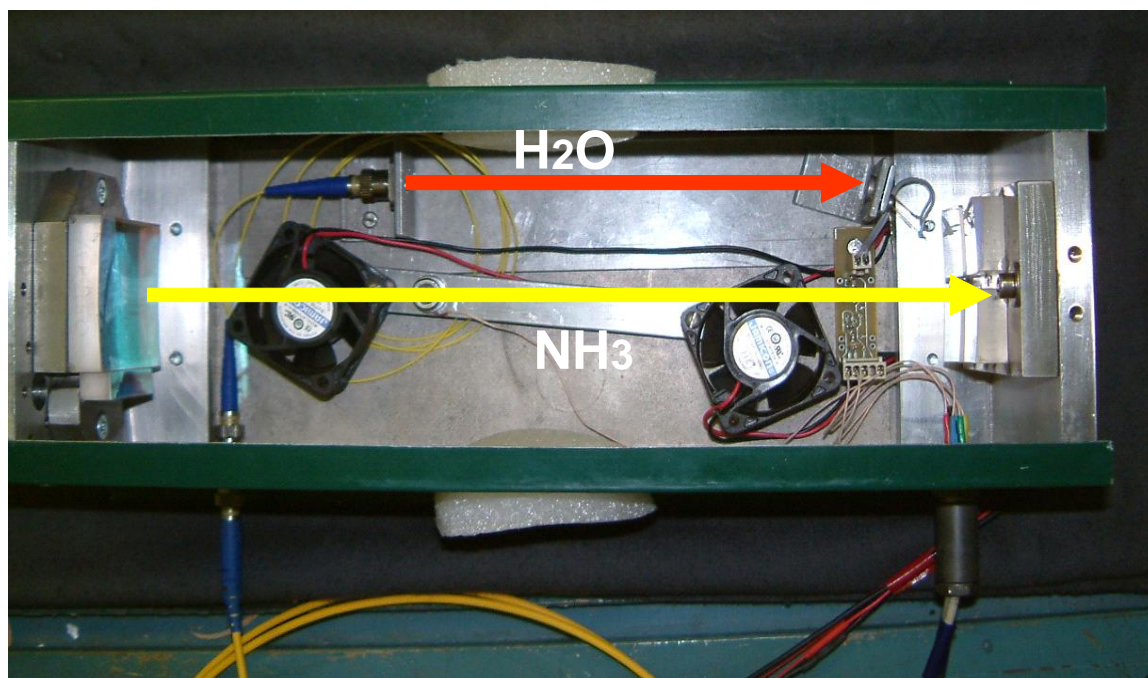
Внешний вид экспериментальная установка для скрининговой диагностики



Диагностика исследуемого пациента

Данная конфигурация была предложена А.И.Хаустовым и реализована Д.Б.Ставровским. Первоначальное мое отношение было отрицательным, в результате проведенных тестов – весьма положительное.

# Внутренний вид экспериментальной установки



Внутренний вид экспериментальной установки для скрининговой диагностики

Внутри кожуха установлена многоходовая кювета Чернина ( $L_{\text{NH}_3} = 39 \text{ м}$ ), предназначенная для измерения содержания аммиака.

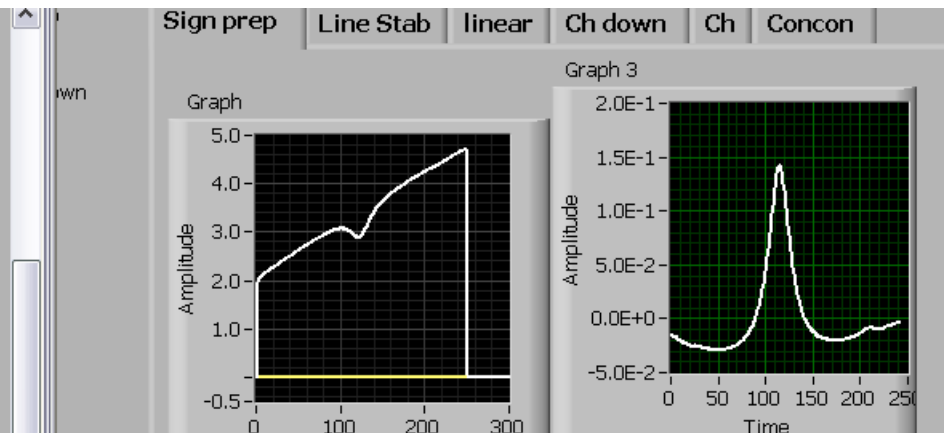
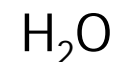
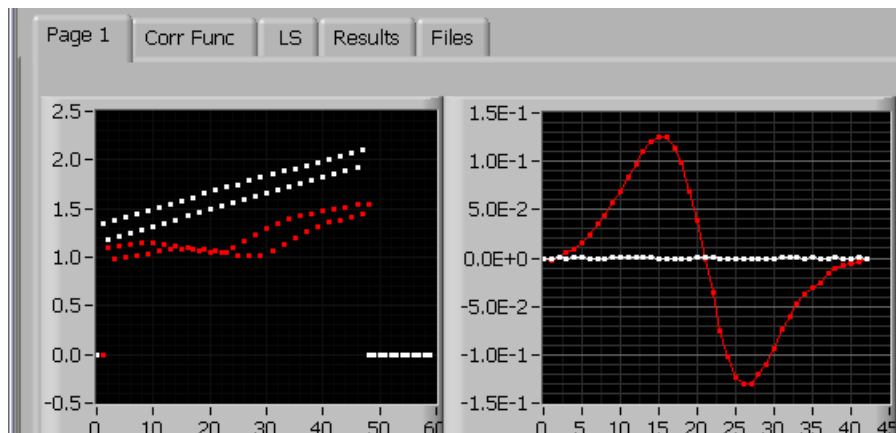
Для измерения содержания водяного пара установлен канал с оптической длиной  $L_{\text{H}_2\text{O}} = 15 \text{ см}$ .

Для создания однородного распределения исследуемой смеси внутри кожуха установлены два вентилятора.



# Функционирование системы

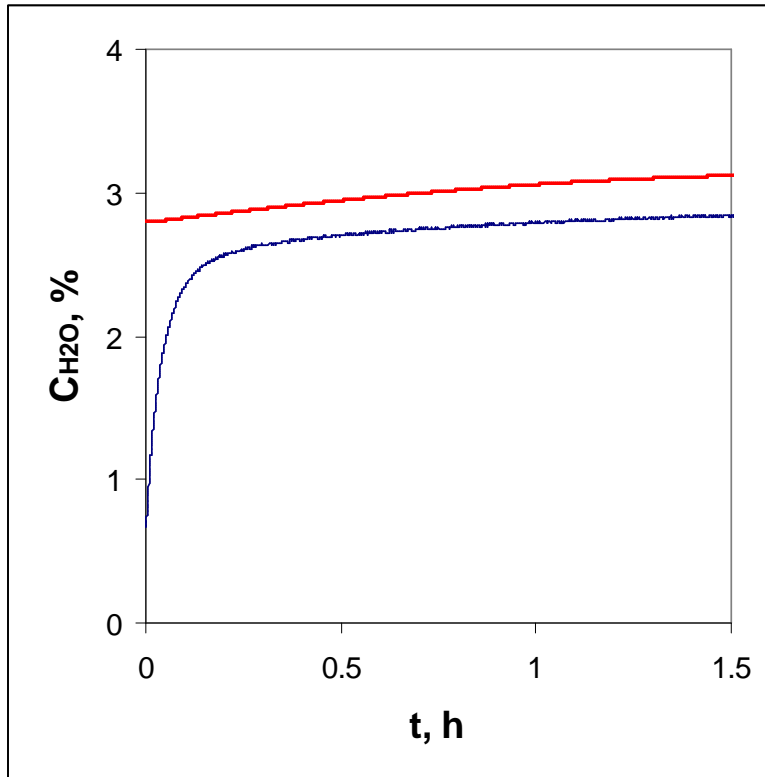
Система управления и сбора информации включает в себя компьютер и две платы NI DAQ. Программное обеспечение выполнено в среде LabView 8.6. Для каждого канала был создан отдельный исполняемый exe - файл, что позволяло независимо и одновременно вести измерения двух молекул с помощью одного компьютера.



Используется режим модуляции.  
Белый и красный – аналитический и реперный каналы, соответственно.  
Проводится оптимальная фильтрация сигналов и измерение содержания в аналитическом канале относительно реперного, который калибруется.

В данном случае используется прямое измерение поглощения в центре линии с учетом данных HITRAN.

# Калибровка канала $\text{H}_2\text{O}$



Для проведения калибровки в момент времени  $t = 0$  в установку была установлена бюкса с водой. Регистрировалось временная зависимость изменение содержания водяного пара. Величина, измеренная в момент  $t = 0$  соответствует влажности лабораторного помещения. Через 10 мин измеряемая величина приближается к концентрации насыщенных паров при данной температуре. Дальнейший рост связан с изменением температуры воды (гигрометр).

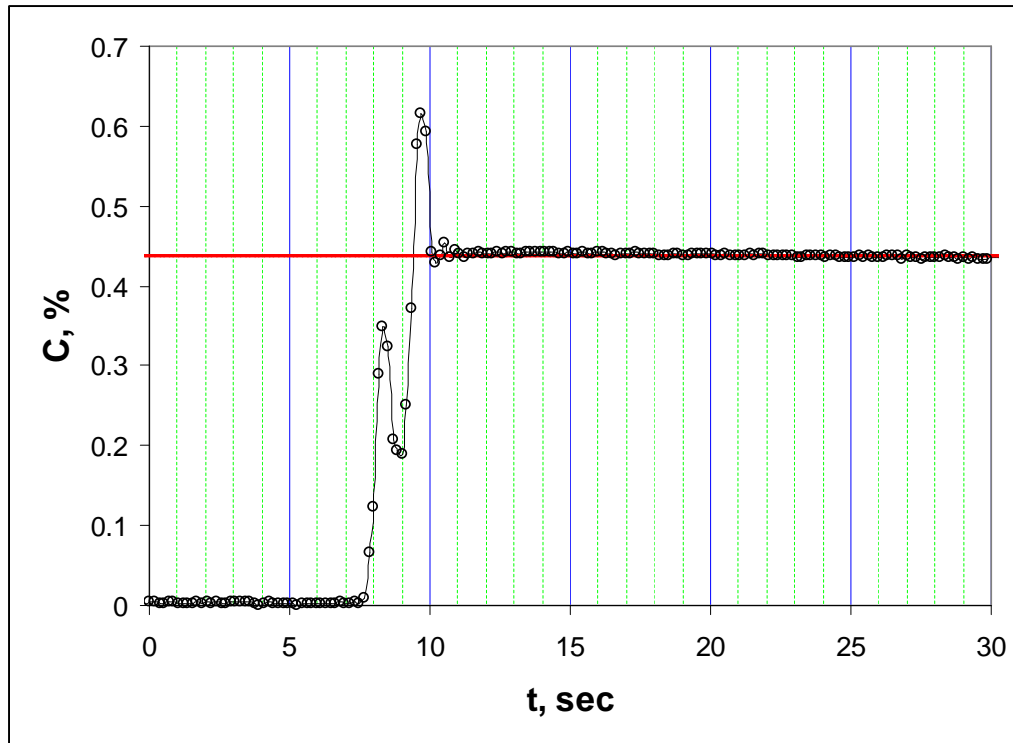
Одновременно измерялась температура воды. Красная кривая – временная зависимость концентрации насыщенных паров воды с учетом изменения ее температуры.

Разница обусловлена известной 10 % недооценкой интегральной интенсивности линий  $\text{H}_2\text{O}$  в этом спектральном диапазоне в HITRAN.

**Вывод: точность измерения содержания водяного пара не хуже 10 %.**

# Калибровка канала $\text{NH}_3$

Функционирование системы не требует калибровки, поскольку базируется на спектральных базах данных.



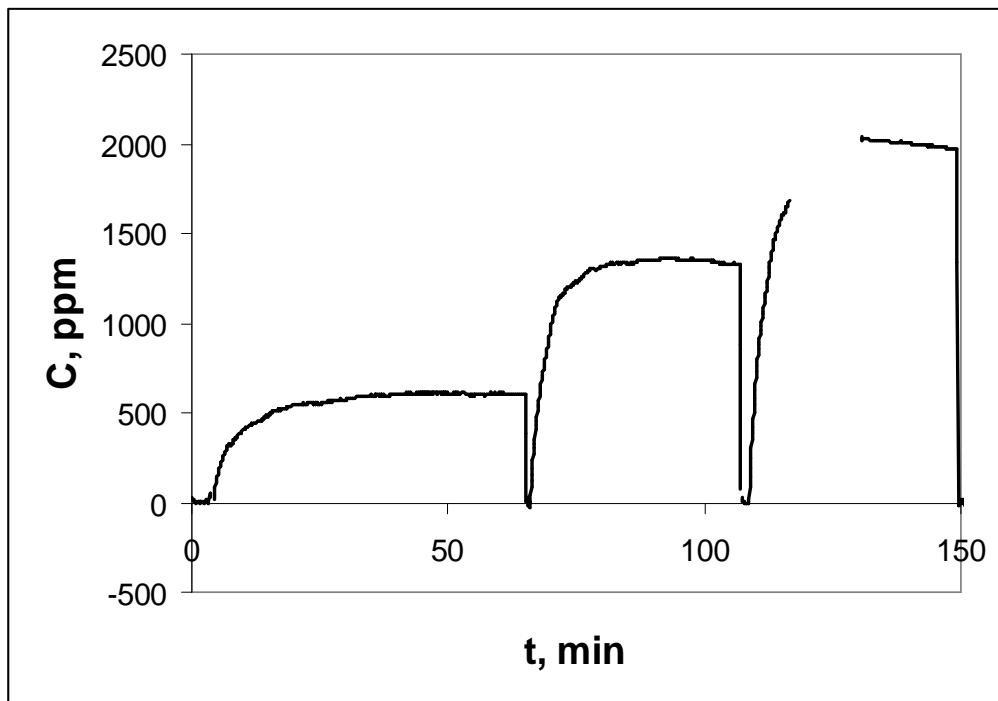
Для проверки точности измерения  $\text{NH}_3$  в анализируемый объем  $V$  с помощью медицинского шприца впрыскивался калиброванный объем  $v$  чистого  $\text{NH}_3$  т.е. создавалась его калиброванная концентрация –  $C = v/V$  (красная константа). Черные кружки представляют собой результат измерения.

**Вывод: Время установления стационарного распределения в данной экспериментальной установке не превышает 3 сек, точность порядка 1 %.**

# Калибровка испарения раствора

Для калибровки испарения слабого раствора аммиака в воде были приготовлены три калиброванных раствора: 1, 2, 3 мл 10 % раствора аммиака в воде были растворены в 100 мл воды.

Временная зависимость регистрации концентрации аммиака в установке при помещении в нее трех калиброванных растворов.

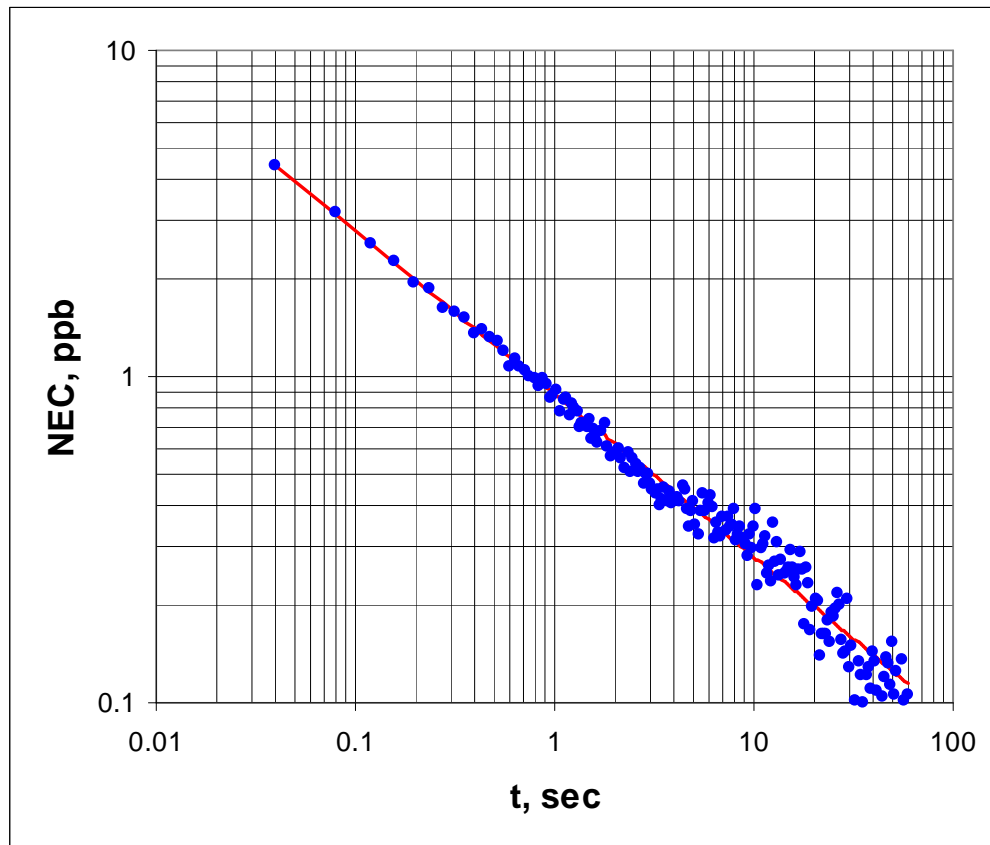


Одновременно измерялась концентрация водяного пара, что позволило определить отношение концентрации аммиака к концентрации воды в газовой фазе, которая оказалась в 18 раз больше этого отношения в жидкой фазе (нашатырный спирт на воздухе выдыхается).

**Вывод: Отношение концентраций аммиак : вода в газовой фазе в 18 раз больше этого отношения в жидкой фазе (отступление от закона Рауля).**



# Предел обнаружения



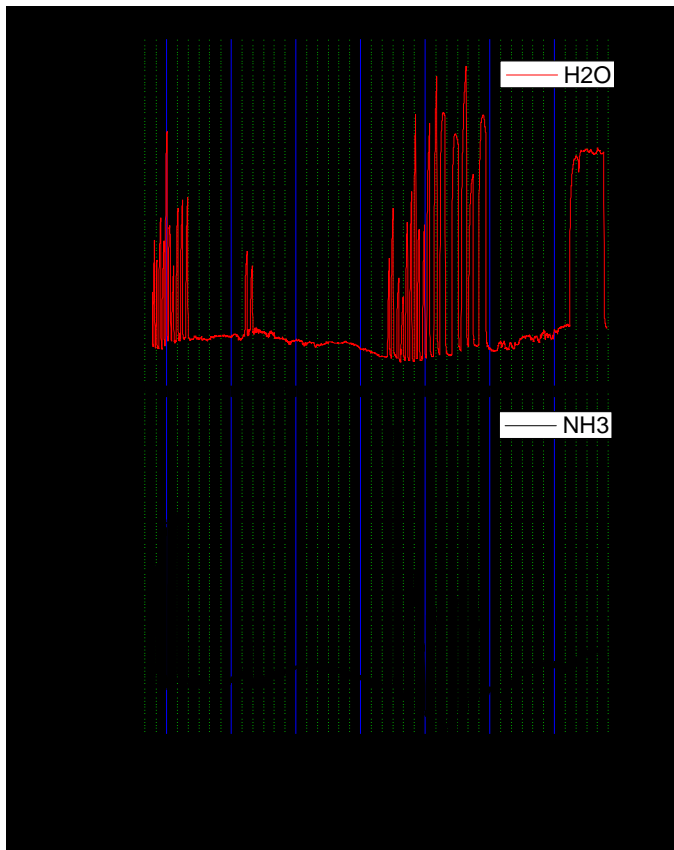
Концентрация  $\text{NH}_3$  эквивалентная шуму - NEC (Noise Equivalent Concentration) для разработанной установки скрининговой диагностики как функция времени усреднения.

В данном случае NEC определяется фундаментальным пределом ДЛС, обусловленным квантовыми шумами ДЛ.

**Характерное время для скрининговой диагностики находится на уровне 1 сек, что соответствует минимально обнаружимой концентрации на уровне 1 ppb.**

# Тестовый эксперимент

В тестовом эксперименте была исследована контрольная группа пациентов.



Измерения проводились до и после обеда. Каждый пик соответствует измерению одного исследуемого. Последний пик – влажная салфетка.



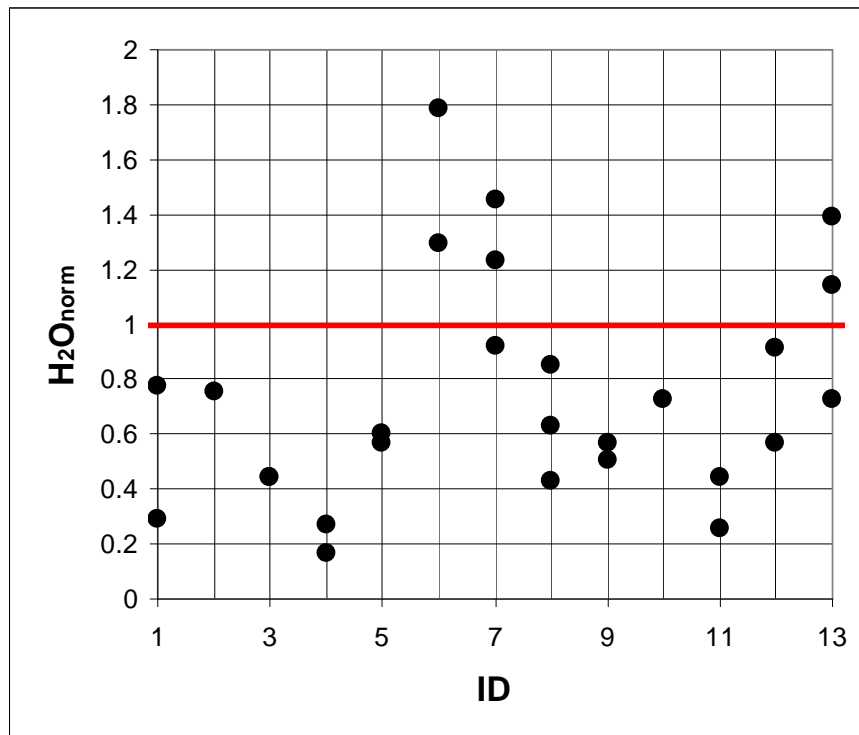
Фрагмент проведенного тестового измерения. Измеряемой величиной является отношение максимумов нижнего и среднего графиков.

В процессе предварительного обследования контрольной группы было проведено 28 измерений для 13 исследуемых пациентов. Здесь ID – идентификация исследуемого.

ID	№	Время	H <sub>2</sub> O	NH <sub>3</sub>
9	1	10:47	0.16	24.2
3	2	10:49	0.14	27.5
13	3	10:53	0.23	47
1	4	10:56	0.092	24
7	5	10:59	0.39	41
10	6	11:02	0.23	35
4	7	11:05	0.052	20
12	8	11:09	0.18	40
8	9	11:13	0.2	29
5	10	11:18	0.18	27
11	11	12:13	0.14	29
11	12	12:18	0.081	20
8	13	14:25	0.136	29.1
13	14	14:29	0.361	68.1

ID	№	Время	H <sub>2</sub> O	NH <sub>3</sub>
3	15	14:34	0.141	23.5
4	16	14:38	0.086	13.6
9	17	14:42	0.179	11.9
2	18	14:46	0.239	16.6
7	19	14:50	0.46	46.6
1	20	14:53	0.246	34.8
5	21	14:58	0.191	15.1
6	22	15:01	0.567	52.7
6	23	15:08	0.41	28.1
3	24	15:18	0.46	21.5
13	25	15:27	0.44	27.3
7	26	15:35	0.291	25.6
8	27	15:40	0.27	45.4
12	28	15:52	0.29	20.2

# Канал H<sub>2</sub>O

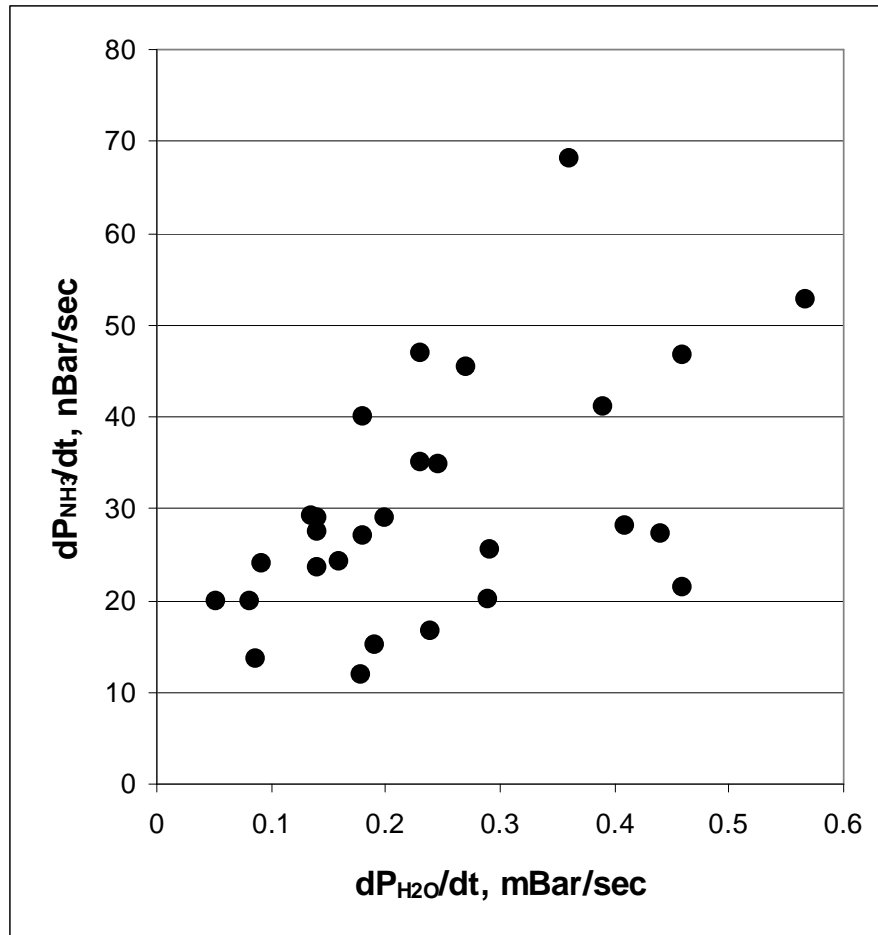


Нормированный поток молекул водяного пара с ладоней испытуемых контрольной группы. Нормировка проводилась по потоку молекул водяного пара с мокрой салфетки. Первоначально предполагалось, что поток молекул воды с ладоней должен быть одинаковым. Оказалось, что это не так. Видно, что эти потоки отличаются на порядок.

Ожидается, что этот поток должен быть больше 1, поскольку температура тела человека больше температуры мокрой салфетки, использованной для нормировки.

**Вывод: Регистрация потока молекул воды можно рассматривать в качестве инструмента скрининговой диагностики – влажные, сухие руки; температура рук; площадь пор и т.д. Система кровоснабжения?!!!!**

# Что все это значит?



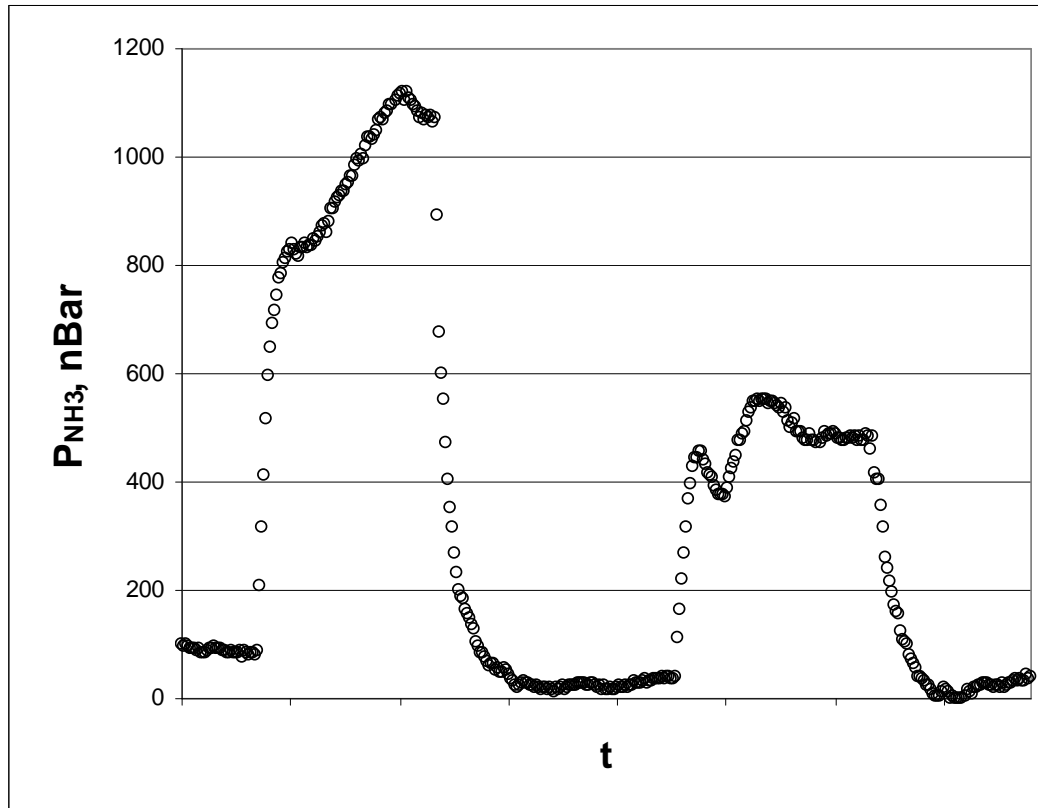
Зависимость потока молекул аммиака как функция потока молекул воды с ладоней исследуемых контрольной группы.

Наблюдается море точек. Первое впечатление – отсутствие какой либо корреляции.

Отсюда можно сделать вывод, что существует несколько механизмов, определяющих поток молекул аммиака с ладони. Возникает также вопрос: что есть норма?

**Вывод: необходим внимательный анализ постановки скрининговой диагностики аммиака.**

# Мойте руки перед едой



Измерение аммиака из моих ладоней до (слева) и после (справа) мытья рук. После мытья рук устраняется дополнительный механизм появления аммиака с ладоней в данном эксперименте, который не связан с испарением. Возможно это результат жизнедеятельности бактерий (Ставровский).

**Вывод: необходим внимательный анализ временных зависимостей для определения различных механизмов выделения аммиака и воды с ладоней.**

# Что все это значит?

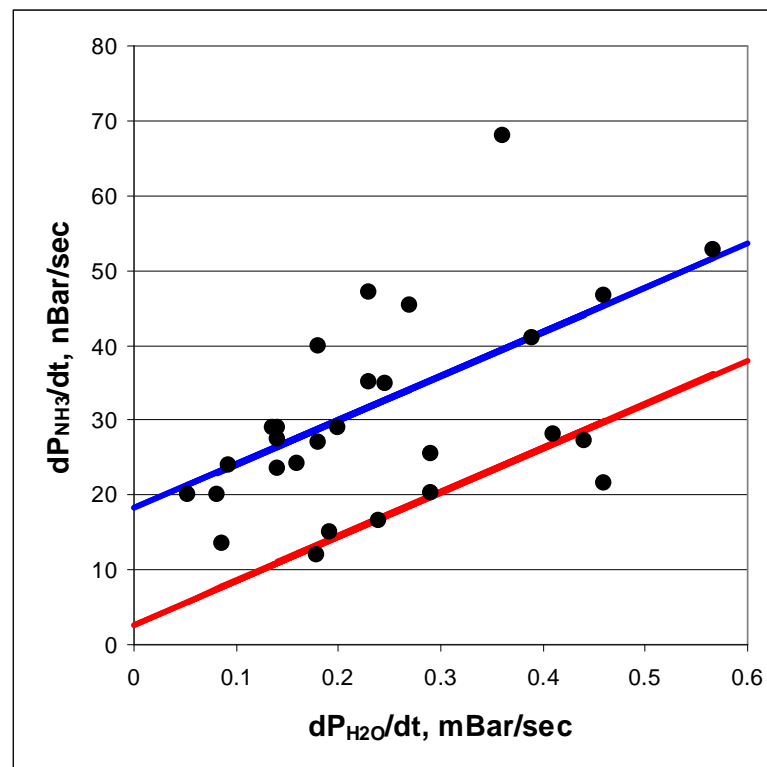
Более внимательный анализ показывает, что имеющиеся данные распадаются на три группы:

“Чистые руки” – красная прямая – определяются испарением воды и аммиака крови.

“Грязные руки” – синяя прямая – есть постоянная компонента с кожи (бактерии?).

“Отклонения”.

Отсюда можно определить понятие “нормы” для различных каналов появления аммиака с ладони и разных способов ее подготовки:



“Норма”

	Не мытые руки	Чистые руки
$\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$	6.3(4)E-05	5.9(5)13E-05
$\text{NH}_3, \text{nBar/sec}$	17.3(10)	2.7(16)

Отношение потока аммиака к потоку воды с точностью до погрешности совпали.

**Вывод: скрининговая диагностика аммиака возможна, но необходим внимательный анализ ее постановки.**

# Предварительные выводы исследования контрольной группы

1. Измерение потока водяного пара может быть использована для скрининговой диагностики состояния системы кровообращения и состояния кожи.
2. Определена “норма” отношения потока аммиака к потоку воды при испарении. Отступление от нормы может быть использовано для скрининговой диагностики состава крови.
3. Определена “норма” потока аммиака с ладони помимо испарения. Отступление от нормы может быть использовано для скрининговой диагностики состояния кожи.



# Норма содержание аммиака в крови

Определив норму отношения потока аммиака к потоку испаряемой кожей воды мы можем определить концентрацию аммиака в крови в предположении справедливости определенного нами коэффициента – 18 между концентрацией в растворе и в газовой фазе (Мы).

Содержание аммиака в крови (норма ppm) по разным источникам

<a href="#">[1]</a>	1.287	2.574
<a href="#">[2]</a>	20	200
<a href="#">[3]</a>	0.3	0.6
Мы	3.2	3.5

[\[1\]](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B8%D0%BE%D1%85%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7_%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B8) [http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B8%D0%BE%D1%85%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9\\_%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7\\_%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B8](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B8%D0%BE%D1%85%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7_%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B8)

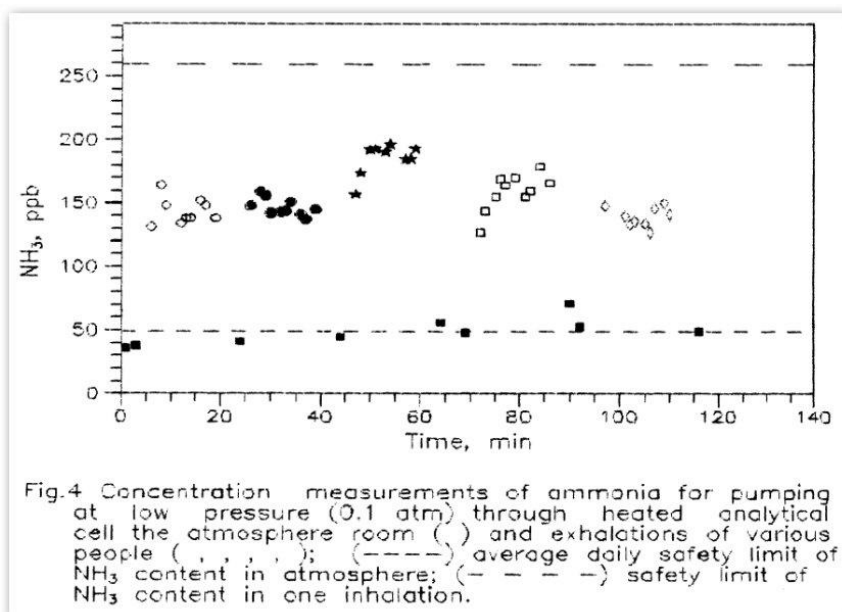
[\[2\]](http://psyho.org/content/view/303/44/) <http://psyho.org/content/view/303/44/>

[\[3\]](http://ya-zdorov.net/anal/biohim.php) <http://ya-zdorov.net/anal/biohim.php>

**Вывод: данные разных источников по содержанию аммиака в крови расходятся катастрофически.**

# Аммиак в выдохе и с ладони

Сопоставим полученную “норму” отношения потока аммиака к потоку воды с ладони с измерениями содержания аммиака в выдохе.



Измерение содержания аммиака в выдохе [1]

[1] K.L.Moskalenko, A.I.Nadezhdinskii, E.V.Stepanov, Tunable diode laser spectroscopy application for ammonia and methane content measurements in human breath, Proc.SPIE, 2205, 448-452 (1994)

Используя настоящую установку было проведено измерение содержания аммиака в выдохе. Полученные результаты согласуются с приведенными на Рис. В легких также происходит испарение при температуре 36.6 °С, что дает отношение потока аммиака к потоку воды  $1.7 \cdot 10^{-6}$ , что в 40 раз меньше потока с ладони.

**Вывод: детектирование аммиака в выдохе является в 40 раз менее эффективным, чем с ладони.**

# Аммиак в выдохе и с ладони

Подобное различие возможно если кровь в выдохе и с ладони разная.

Схема системы кровообращения.  
Вывод: кровь одинаковая.

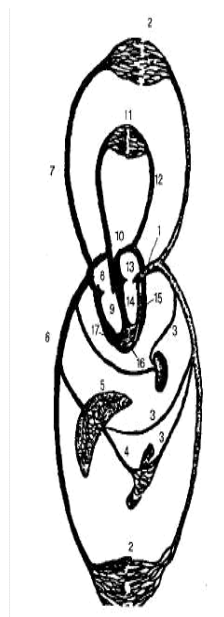


Рис. 13.8. Большой и малый круги кровообращения: 1 — аорта; 2 — капиллярная сеть тела; 3 — артерии органов брюшной полости; 4 — воротная вена; 5 — печень; 6 — нижняя полая вена; 7 — верхняя полая вена; 8 — правое предсердие; 9 — правый желудочек; 10 — легочный ствол; 11 — капиллярная сеть легких; 12 — легочные вены; 13 — левое предсердие; 14 — левый желудочек; 15 — артерия сердца; 16 — капилляры сердца; 17 — вены сердца.

Альтернативное объяснение: испарение с ладони и в легких происходит по разному. С ладони это прямое испарение. В легких — испарение через био — мембрану, препятствующую проникновению соединений азота из воздуха в кровь и обратно. Если бы этой защиты не было содержание аммиака в выдохе было близко к ПДК рабочей зоны!!!

**Вывод: анализ выдоха не является оптимальным, если не ставится задача контроля био — мембраны легких.**

# Выводы

Предложен метод скрининговой медицинской диагностики по измерению потока молекул с поверхности кожи.

Создан и прокалиброван экспериментальный макет прибора для одновременного измерения потоков водяного пара и аммиака с ладони.

Проведен предварительный цикл измерений 13 человек контрольной группы