

(11) Patent numeris: **3187**

(51) Int.Cl.⁵: **C12Q 1/54,**
G01N 33/66,
G01N 21/21,
G01N 21/35

(21) Paraiškos numeris: **IP276**

(22) Paraiškos padavimo data: **1992 12 30**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 10 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 03 27**

(31,32,33) Prioritetas: **8901514-3, 1989 04 25, SE**

(72) Išradėjas:

Jan Evert Lilja, SE

Sven-Erik Lennart Nilsson, SE

(73) Patent savininkas:

MIGRATA UK LTD, 2 Duke Street, St James's, London SW1, Y6BJ, GB

(74) Patentinis patikėtinis:

Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A.Baltic Service Company, Rūdninkų g. 18/2-12, 2001 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Gliukozės kiekio gryname kraujyje nustatymo būdas, vienkartinio naudojimo kiuvetė ir fotometras šiam būdai realizuoti

(57) Referatas:

Gryno kraujo mėginys kontaktuoja su reagentu, kuris cheminės reakcijos su gliukoze metu sukelia detektuojamą dažo koncentracijos kitimą (10), kurio (kitimo) dydis nustatomas kaip gliukozės kiekio matas mėginyje. Iš pradžių neatskiestas mėginys įvedamas į mikrokuvetę, turinčią, bent jau, vieną ertmę, skirtą mėginio paėmimui. Ertmės vidus iš anksto apdorojamas sauso pavidalo reagentu, ir cheminė reakcija vyksta šioje ertmėje. Aktyvūs komponentai savo sudėtyje turi, bent jau, hemolizės reagentą, veikiantį gliukozę, esančią kraujo mėginio ląstelėse, kad būtų galima nustatyti bendrą gliukozės kiekį, o taip pat reagentus, dalyvaujančius cheminėje reakcijoje ir užtikrinančius, kad dažo koncentracija keisis (10) bent jau, bangos ilgių diapazone (14) esančiame už kraujo hemoglobino absorbcijos (12) diapazono ribų. Absorbcijos matavimas vyksta nurodytame bangos ilgių diapazone tiesiog su mėginiu, esančiu kiuvetėje. Taip pat aprašoma iš anksto apdorojama vienkartinio naudojimo kiuvetė su tokiu reagentu ir fotometras.

Šis išradimas yra apie bendro gliukozės kiekio gryname kraujyje kiekybinį nustatymą, taip pat apie fotometrą ir vienkartinio naudojimo kiuvetę, naudojamus šiam kiekiui nustatyti.

5

Gliukozės kiekis nustatomas gryname kraujyje. Tai yra panaudojama diabeto kontrolės diagnostikai, endokrininiams tyrimams. Netikėtais sąmonės praradimo atvejais gliukozės nustatymas kraujyje taip pat yra tikslingas. Diabetas yra viena iš svarbesnių sveikatos apsaugos problemų pasaulyje, nes žinoma, kad šia liga serga daugiau nei 40 milijonų žmonių, ir kad II tipo diabetas vis labiau plinta.

15 Žinomi keli gliukozės nustatymo būdai. Dabar daugelio senų būdų atsisakyta, nes jie yra arba netikslūs arba pažeidžiantys kancerogeniniais reagentais.

20 Gliukozė kraujyje, t.y. gliukozė gryname kraujyje, suprantama kaip gliukozė be baltyminių jungčių, esančių kraujyje. Gliukozė laisvai pasiskirščiusi tarplasteliniam skystyje, ir skystyje, esančiame ląstelių viduje, pavyzdžiui, eritrocituose, bet ji nebūtinai yra tos pačios koncentracijos. Tai reiškia, kad bendras gliukozės kiekis gryname kraujyje skiriasi nuo bendro gliukozės kiekio plazmoje arba serume. Diagnostikos kriterijai, pavyzdžiui, diabeto atveju, dažniausiai yra paremti gliukozės kiekiu gryname kraujyje. Todėl gydytojui be abejo naudinga žinoti, kiek tiksliai gliukozės rasta gryname kraujyje. Skirtumai, gauti nustatant gliukozę gryname kraujyje, plazmoje arba serume yra aprašyti V. T. Karavėjaus, J. am. clin. pat., 37:445, 1962. Dauguma šiuo metu pateikiamų gliukozės testų, kurių atlikimo metu pašalinami neliesti eritrocitai, yra netikslūs gliukozės kiekio kraujyje atžvilgiu ir todėl gali pateikti klaidingas

35

išvadas medicininio diagnozavimo metu, nes naudojami skirtingi referiniai parametrai.

5 Dauguma dabartinių specifinių gliukozės nustatymo būdų pagrįsti reagentais, turinčiais fermentų arba jų sistemas. Šios skirtingos fermentinės sistemos vyrauja palyginus su gliukozės oksidaze, heksokinaze ir gliukozės dehidrogenaze (GDH).

10 Šis išradimas labiausiai susijęs su reagentais, turinčiais gliukozės dehidrogenazę (GDH). Seniai žinomi nustatymo metodai, naudojantys GDH, yra aprašyti JAV patentuose Nr. 4.120.755 ir Nr. 2.964.974. Šie nustatymo metodai, atitinkantys ankstesnę technikos
15 lygį naudojant GDH, yra tradiciniai cheminiai metodai homogeninėje fazėje.

Tačiau nei vienas iš anksčiau paminėtų metodų netinka gliukozės nustatymui neatskiestame, gryname kraujyje.
20 Nors JAV patento Nr. 3.964.974 pavyzdyje aprašomas gliukozės nustatymo metodas gryname kraujyje, bet šis metodas pagrįstas atskiedimu ir baltymo nusodinimu arba atskira kraujo mėginio hemolize.

25 EP paraiškoje Nr. 84112835.8 aprašomas gryno kraujo gliukozės nustatymo būdas neatskiestame kraujyje. Naudojama cheminė fermentinė reakcija, pagrįsta gliukozės oksidaze, ir atliekamas optinio atspindžio koeficiento matavimas esant bangos ilgiui didesniam nei
30 600 nm. Gerai žinoma, kad hemoglobinas išimaišo į oksidazės reakciją. Oksidazės reakcijoms taip pat reikalingas laisvas deguonies patekimas. Todėl mikrokiuvetės naudojimas, skirtas gliukozės nustatymui gryname kraujyje, padedant gliukozės oksidazės sistemai
35 neatskiestame kraujyje, iškelia svarbias problemas.

- Iš JAV patento Nr. 4.088.448 seniai žinoma mikrokiuvetė, kuri gali būti naudojama matuojant hemoglobina kraujyje (Hb matavimai). Kiuvetė iš anksto apdorojama reagentais, todėl, kai kraujo mėginys įvedamas į kiuvetę, eritrocitų sienelės ištirpsta ir inicijuojasi cheminė reakcija, kurios rezultate galima nustatyti Hb, betarpiškai matuojant absorbciją kiuvetėje, ir kuri šiam tikslui turi tiksliai suformuotą darbinį gyli.
- Metodas, atitinkantis JAV patentą Nr. 4.088.448 patentą skirtas Hb nustatymui gliukozės pagalba, sunkiai pritaikomas praktikoje, nes absorbcijos matavimas, skirtas gliukozės kiekio nustatymui, susiduria su stipriais absorbcijos, atsirandančios dėl hemoglobino, trukdžiais. Hemoglobino koncentracijos pakeitimai stipriai trukdys gliukozės nustatymui.
- Tokiu būdu, šiuo metu egzistuojantys metodai sudėtingi. Juos naudojant, dažnai reikalingas kraujo mėginio atskiedimas arba jais remiantis tik nustatomas gliukozės kiekis kraujo plazmoje, neįskaitant gliukozės kiekio eritrocituose.
- Todėl akivaizdu, kad paprastas, patikimas ir greitas bendro gliukozės kiekybinio nustatymo neatskiestame gryname kraujyje būdas bus žymi parama diagnozuojant ir kontroliuojant diabetą.
- Vienas iš šio išradimo tikslų yra sukurti kiekybiniam bendro gliukozės kiekio nustatymui metodą neatskiestame gryname kraujyje, naudojant pralaidžiąją fotometriją. Kitas tikslas - sukurti kiuvetę ir fotometrą, skirtus šiam nustatymui.

Apskritai, aukščiau paminėta trukdžių problema, iššaukiama hemoglobino kiekiu, sprendžiama sekančiu išradime pateiktu būdu.

5 Naudojant atitinkamą reagentą iš pradžių galima išstirpinti eritrocitų sieneles, o po to įvykdyti cheminę reakciją tarp reagento ir viso gliukozės kiekio, esančio mėginyje, kuri suformuoja cheminius junginius, pagrįstus gliukoze, ir kurių absorbcijos
10 diapazonas bangos ilgio atžvilgiu blogiausiu atveju, dalinai išeina už bangos ilgio diapazono, atitinkančio hemoglobino absorbciją, ribų. Tokiu būdu, absorbcijų matavimo keliu su atitinkamai parinktais bangų ilgiais galima pilnai pašalinti hemoglobino
15 poveikį matavimo rezultatams ir labai greitai nustatyti gliukozės kiekį.

Tokiu būdu, išradimas užtikrina gliukozės nustatymo būdą gryname kraujyje, kuriame gryno kraujo mėginys
20 įvedamas į kontaktą su reagentu, kuris cheminės reakcijos mėginyje su gliukoze metu parodo dažo koncentracijos kitimą, kuris gali būti detektuotas mėginyje, ir kurio dydis nusakomas kaip gliukozės kiekio matas, be to metodas pasižymi tuo, kad apima
25 stadijas:

- neatskiesto mėginio įvedimą į mikrokuivetę, turinčią bent jau vieną ertmę mėginiui paimti, be to šios ertmės vidus iš anksto apdorotas sauso pavidalo reagentu ir minėta cheminė reakcija vyksta šioje ertmėje,
30

- parinkimą kaip aktyvių komponentų įtraukti į reagentą bent jau, hemolizinį reagentą, veikiantį gliukozę, esančią kraujo mėginio ląstelėse, kad būtų galima nustatyti visos gliukozės kiekį gryno kraujo hemolizate, ir reagentus, dalyvaujančius
35

cheminėje reakcijoje ir užtikrinančius, kad dažo koncentracijos kitimas vyktų, bent jau, bangų diapazone, platesniame nei karujo hemoglobino absorbcijos diapazonas,

5

- šiame bangų ilgio diapazone absorbcijos matavimai atliekami tiesiog su mėginiu, esančiu kiuvetėje.

10 Pagal išradimą geriausi būdo realizavimo variantai išdėstyti 2-7 išradimo apibrėžties punktuose.

Pagal geriausią išradimo realizacijos variantą būdas yra sudarytas iš stadijų: neatskiesto gryno kraujo padavimo ant sauso reagento, esančio kiuvetėje, turinčioje nedidelio pločio plyšį, turinčioje hemolizės reagentą, GDH, diaforazę arba jos analogą, NAD (nikotinamidas-adeninas-dinukleotidas) arba jo analogą, detergentą ir dažą formuojančią medžiagą, ir dažo koncentracijos fotometrinio matavimo, kuris (dažas) susidaro pralaidžiojo matavimo filtruojančiame fotometre metu. Diaforazės analogai yra medžiagos, turinčios fenazinmetosulfato arba fenazinetosulfato tipui priklausančias oksidacines - redukcines savybes. Jie gali pakeisti diaforazės medžiagas, bet yra nepriimtini toksiškumo požiūriu.

Specialus būdas, skirtas β - gliukozei vadinamas gliukozės dehidrogenaziniu metodu. α - gliukozės ir β -gliukozės egzistavimas kraujyje priklauso nuo pusiauvyros temperatūros. Sumažėjus kraujo mėginio teperatūrai, pusiauvyra pasislenka į α -gliukozės didesnės proporcinės dalies pusę. Pusiauvyros kitimas lėtas. Gliukozės dehidrogenazinio metodo reakcijos greitis lėtinamas fermento mutarotaze ir tuo pačiu α -gliukozės β -gliukozės pusiauvyra. Kad mėginyje neįvyktų imanentinis metabolizmas nustatant kraujyje gliukozę

- svarbu, kad analizė vyktų be užlaikymo. Kadangi spontaninė $\alpha - \beta$ reakcija vyksta labai lėtai, ir kraujo temperatūra skirta palaikyti α/β pusiausvyrai, pakankamai pastovi, mutarotazė gali būti naudingai pašalinta betarpiškai kraujo bandyme esant kūno temperatūrai, ir esant galimybei kalibruoti fotometrą galimų gliukozės koncentracijų intervale. Būdo pranašumas, sumažinantis išlaidas, pagrįstas reakcijos laiko sutrumpinimu ir analitinio diapazono praplėtimu.
- 10 Trūkumas toks, kad kalibruotė ir kontroliniai tirpalai turi būti pateikiami reikiamos temperatūros ir blogiausiu atveju bent jau vienos valandos laikotarpyje.
- 15 Pagal geriausią išradimo realizacijos variantą, gliukozės dehidrogenazinio tipo reagento sistema yra sudaryta iš hemolizės reagento, suardančio eritrocitus ir išlaisvinančio hemoglobina, GDH diaforazę arba jos analogus, kad NADH reakcija būtų matoma. NAD arba
- 20 analogas, detergentas arba dažą sukurianti medžiaga, pavyzdžiui, paimta iš tetrazolijaus junginių grupės. Papildomai prie šių aktyvių medžiagų, kaip pagalbinės priemonės, skirtos reakcijos įvykdymui, gali būti naudojamos kitos cheminės medžiagos.
- 25 Hemoglobino absorbcija, išskirto hemolizės metu, aprašyta E. Dž. van Kampen ir V. G. Zijlstra (1965): "Hemoglobino ir jo darinių nustatymas", Adv. klin. Chem. B, 141-187, p.165, Fig.12. Ši figūra parodo, kad
- 30 vykstant absorbcijos matavimams esant didesniai bangos ilgiui nei 645 nm, bet kurio hemoglobino darinio poveikis minimalus.
- Kitas trukdžių tipas, vykdant absorbcijos matavimus,
- 35 yra sudarytas iš šviesos išsklaidymo, sukkelto, pavyzdžiui, ląstelių, riebalų, dulkių ar kitų "skeveldrų" dalelėmis. Matuojant kitame bangos ilgyje,

dažnai didesniame, nei pradinio matavimo bangos ilgis, kur absorbcijai nei hemoglobinas, nei gautas dažas netrukdo, ši foninė absorbcija gali būti kompensuota.

5 Gliukozės dehidrogenazinės sistemos reakcijos procesas gerai žinomas ir yra aprašytas JAV patente Nr. 3.964.974. Jame supažindinama su reakcijos procesu, turinčiu tetrazolinę druską, absorbuojant matomame diapazone.

10 Pagal išradimą, esminis būdo požymis yra gliukozės hidrogenazinės reakcijos panaudojimas, siekiant galutinio tikslo, tiek cheminiu požiūriu, tiek absorbcinės fotometrijos atžvilgiu. Vartotojui saugumo ir patikimumo požiūriu tokia reakcija yra tinkamiausia.

Optiniai būdai, skirti cheminės medžiagos koncentracijos kiekybiniam nustatymui tirpale, yra gerai žinomi ir dokumentuoti. Absorbcinė fotometrija yra optinio nustatymo būdas. Teorija, išskyrus absorbcinę fotometriją ir fotometro konstrukciją, aprašyta Skugo ir Vesto darbe "Analitinės chemijos pagrindai", 29 skyrius. Pagrindinės fotometro dalys yra šios: optinė dalis, mechaninė dalis ir elektroninė dalis. Optinė dalis sudaryta iš šviesos šaltinio su monochromatoriumi arba interferenciniu filtru ir šviesos detektoriaus, ir kai kuriais atvejais - linzių sistemos. Mechaninė dalis turi optinės dalies pakabą ir priemonę, skirtą kiuvetės su cheminiu tirpalu, judėjimui. Elektroninė dalis yra skirta šviesos šaltinio valdymui ir kontrolei ir šviesos detektorių signalų matavimui, kurie apdorojami tokiu būdu, kad vartotojas galėtų skaičiuoti skaitmeninį dydį, išreiškiantį arba atvaizduojantį išmatuotą cheminę koncentraciją.

Tokia fotometro konstrukcija aprašyta JAV patente Nr. 4.375.105. Šiame patente aprašomas fotometras, skirtas hemoglobino nustatymui kraujyje, kuris parenka optimaliausią variantą su žinomais komponentais, todėl fotometriniis nustatymas atliekamas kaip galima arčiau matuojamo 540 nm bangos ilgio. Panaudojant šviesą spinduliuojantį diodą ir didiminio stiklo tipo šviesos filtrą, reguliuojamas matavimo bangos ilgis. Alternatyviniame panaudojimo variante, kuriame išmatuojamas cheminių tirpalų drumstumas, šviesą spinduliuojantis diodas naudojamas infraraudonajame diapazone. Šis žinomas fotometras yra naudojamas įprastuose cheminiuose būduose, homogeninėje terpėje, skirtuose hemoglobino nustatymui, kuriuose atskiedimo santykis tarp kraujo ir reagento yra 1/200 ir daugiau.

Fotometras, naudojamas gliukozės kiekio nustatymui gryname kraujyje, pagal čia aprašytą būdą, t. y. pagal sauso gliukozinio reagento padavimą į neatskiestą kraują ir fotometro matavimą mikrokiuvetėje pagal du bangos ilgius, turi būti paprastas, patikimas ir pigus. Kadangi kiuvetėje randasi sausas gliukozinis reagentas, tai ji priklauso vienkartinio naudojimo tipui, ir kiuvetės transportavimas, užpildžius ją neatskiestu krauju, turi būti nesudėtingas ir su minimaliu pašalinės šviesos poveikiu. Funkcionavimo požiūriu, fotometras turi būti fotometriškai stabilus ir minimaliai reikalaujantis valdymo (kontrolės).

Tokiu būdu, įgyvendinant šio išradimo būdą, išradimas toliau numato vienkartinio naudojimo kiuvetės iš anksto apdorotos sausu reagentu, sukūrimą pagal 8 punkto nurodymus, ir fotometrą, atitinkantį 9 punkto nurodymus, funkcionuojantį pagal du atskirus bangos ilgius, pastarojo geriausi panaudojimo variantai pateikiami 10 ir 11 apibrėžties punktuose.

Pagal išradimą fotometras, skirtas būdo realizavimui, bei gliukozės matavimui nedideliuose neatskiesto kraujo tūriuose, pasinaudojant mikroprocesoriumi, skirtu kontrolei ir valdymui ir galinčiu atlikti aritmetinius skaičiavimus, o taipogi turinčiu šviesą spinduliuojančius diodus, aprūpintus interferenciniais filtrais, yra tokios konstrukcijos, kuri paprasta ja naudojantis, techniškai stabili, ir visur yra panaudota silicio elektronika, sunaudoja mažai energijos, labai patikimas ir gali būti pagaminamas su mažomis išlaidomis. Jeigu mechaninės dalys, t. y. išorinis korpusas ir dugnas, ir kiuvetės judėjimo priemonė turinti detalę, kur prijungti optiniai komponentai, yra pagamintos iš plastiko ekstruziniu formavimu, bendros gamybinės išlaidos, skirtos fotometrui, bus žemos.

Fotometras, veikdamas kartu su mikroprocesoriumi, gali valdyti visus procesus ir atlikti skaičiavimus, tame tarpe atlikti ir logaritminius pakeitimus. Šviesą spinduliuojantys fotometro diodai, matuojantys pagal du bangos ilgius, yra sužadinami mikroprocesoriumi, todėl duotu laiko momentu užsidega tik vienas šviesą spinduliuojantis diodas. Šviesą spinduliuojantieji diodai labai patogūs, nes neturi pošvyčio. Tam, kad sendami šviesą spinduliuojantys diodai išsisaugotų savo šviesos intensyvumą, fotometras pagaminamas taip, kad maksimalus šviesos intensyvumas, atitinkantis 100% šviesą, yra pastoviai išmatuojamas tarp skirtingų kiuvečių matavimų. Kiuvetės transportavimo mechaninės funkcijos konstravimo keliu galime pasiekti, kad fotometras galėtų detektuoti: ar matuojama kiuvetė, ar matuojamas pilnas intensyvumas, t. y. 100% - šviesą. Abiem atvejais fotometras gali funkcionuoti, kompensuodamas šviesos intensyvumą. Dėka to, kad galime nustatyti ar išmatuotas dydis charakterizuoja kiuvetę, ar 100% pralaidumą fotometras gali funkcionuoti pasitelkęs savo mikroprocesorinį įrengimą be analoginių

logaritminių stiprintuvų. Logaritminių stiprintuvų nebuvimas padidina fotometrų patikimumą ir stabilumą, tuo pačiu metu užtikrindamas logaritminėje operacijoje tam tikrą tikslumą, pasitelkus mikroprocesorius

5 programoje logaritminį algoritmą. Tolimesnis fotometro su sąveikaujančiais mikroprocesoriais pranašumas toks, kad aritmetinių kreivių, kalibruotės kreivių ir linearizacijos įvairios pateiktos formos gali būti lengvai įvedamos į programą. Dėka mikroprocesorių

10 galima panaudoti įvairias tikslinių standartinių programų formas, t. y. programa gali pati spręsti, kada pasiektas tikslas, o tai gali būti atliekama įvairiu tikslumu, priklausomai nuo įvairių koncentracijos lygių, kada tai reikalinga.

15

Išradimas yra liustruojamas figūromis, kuriose atvaizduota:

20 Fig.1 - absorbcijos koeficiento priklausomybė nuo bangos ilgio logaritminis grafikas, abu rodikliai priklauso nuo hemoglobino darinių mišinio ir nuo dažą formuojančios medžiagos, įtrauktos į gliukozinį reagentą;

25 Fig. 2A, 3A ir 4A parodo tris skirtingus, atitinkančius išradimą, fotometro panaudojimo variantus;

30 Fig. 2B, 3B ir 4B atitinka panaudojimo variantus, atitinkamai pavaizduotus fig. 2A, 3A ir 4A ir įtraukia atskirą logaritminį stiprintuvą;

Fig. 5 - pagal išradimą vieną kart panaudoto fotometro optinės dalies schematinio pjūvio vaizdas;

35

Fig. 1 ištisine 10 linija pažymėtas tetrazolio druskos absorbcijos spektras, 3-(4,5-dimetiltiazolil-1-2)-2,5-

difeniltetrazolio bromido (MTT) atžvilgiu, ir punktyrine 12 linija - absorbcijos spektras hemolizinio kraujo atžvilgiu. Kada MTT gali būti kiekybiškai nustatytas esant minimaliam hemoglobino trukdymui, tai bangos ilgio diapazonas yra platesnis nei 600 nm. Taip pat galima pastebėti, kad kompensacija foninio trukdymo atžvilgiu gali vykti prie žymiai didesnių bangos ilgių. Matuojant absorbciją pagal du bangos ilgius svarbu panaudoti tuos bangos ilgius, kurie ryškiai atskirti vienas nuo kito, kad vienas kitam netrukdytų. Interferenciniai filtrai, naudojami fotometro filtre, yra parenkami pagal bangos ilgį, kuriam esant, pasiekiamas maksimalus šviesos pralaidumas. Papildomai, interferencinis filtras turi pralaidumo juostos pusplotį, nustatomą, esant 50% šviesos pralaidumui.

Fig. 2A, 3A, 4A ir 2B, 3B, 4B parodyti fotometro, sąveikaujančio su mikroprocesoriumi, įvairūs panaudojimo variantai. Šiose figūrose variantas "A" parodo fotometrą be logaritminio stiprintuvo, logaritminė operacija vykdoma mikroprocesoriaus programoje. Variantas "B" šiose figūrose panaudoja atskirą logaritminį stiprintuvą 19. Atskiros logaritminio stiprintuvo 19 panaudojimas reiškia žymiai paprastesnę mikroprocesoriaus programą, bet žymiai silpnesnę fotometro techninę charakteristiką.

Fig. 2A, 2B ir 3A, 3B skiriasi tuo, kad fig. 3A, 3B naudoja analoginį skaitmeninį keitiklį 46, kada įvyksta perėjimas iš analoginės į skaitmeninę formą. Šio įrengimo pranašumas toks, kad yra žymiai ekonomiškesnis, bet dėl tam tikrų reikalavimų, keliamų periferiniam įrengimui, jis yra žymiai mažiau stabilus.

Fig. 2 - 4 esantis fotometras yra fiziškai sudarytas iš dviejų struktūrinių blokų: vieno optinio bloko ir vienos elektroninės montažo plokštės 16. Elektroninė

montažo plokštė yra standartinio tipo montažo schema, kurioje naudojami komponentai, įtaisyti įprastu išorinio montažo keliu arba tradiciniu litavimo būdu pragražiuotoje sluoksniuotoje plokštėje. Kai kuriais atvejais leidžiama panaudoti montažo plokštes, kuriose galima įvairių montavimo būdų kombinacija.

Panaudojimo variantas, pateiktas fig. 1A, bus aprašomas žymiai detaliau. Montažo plokštė 16, esanti fotometre, schematiškai parodyta punktyrinėmis linijomis, ir yra sudaryta iš mikroprocesoriaus 18, analoginio skaitmeninio keitiklio 20, multipleksoriaus 22, potenciometro 24, skystų kristalų displėjaus sužadinimo bloko 26, skystų kristalų displėjaus bloko 28, šviesą spinduliuojančių diodų sužadinimo schemos 30, maitinimo magistralinės linijos lygintuvo 32, baterijos pakrovimo schemos 34, ir periferinio įrenginio (neparodyta), priklausančio tipui, kurį žino šios technikos srities specialistas.

Montažo plokštė 16 sujungta su kita fotometro dalimi, sudaryta iš kiuvetės korpuso 36, dviejų šviesą spinduliuojančių diodų 38, šviesos daviklio (detektoriaus) 40 ir jungiklio 42.

Funkcionuodamas multipleksorius 22 priima analoginius signalus iš šviesos daviklio 40, iš baterijos pakrovimo schemos 34 ir iš potenciometro 24 ir perduoda atitinkamai pagal valdančiasias komandas 44 iš mikroprocesoriaus 18 vieną iš šių signalų į analoginį skaitmeninį keitiklį 20. Jis pakeičia signalą į formą, kuri gali būti mikroprocesoriumi 18 apdorota, kuris, priklausomai nuo priimto signalo, vykdo skirtingas operacijas.

Procesorius 18 priima signalą iš potenciometro 24, kuri gali reguliuoti vartotojas, kai fotometras kalibruotas

pasitelkus žinomo gliukozės kiekio mėginį. To pasėkoje algoritme nustatoma konstanta, pasitelkus kuri (algoritmą) suskaičiuojamas gliukozės kiekis, remiantis išmatuotu pralaidumo (skaidrumo) koeficientu.

5

Procesorius 18 priima signalą iš baterijos pakrovimo schemos 34, kai procesorius 18 turi kompensuoti baterijos krūvio pokytį.

10

Procesorius 18 priima matuojamąjį signalą iš šviesos daviklio 40, ir tuo atveju, jei išmatuojame 100 % pralaidumą kaip atraminį dydį, ir tuo atveju, jei išmatuojame kraujo mėginio, esančio vienkartinio naudojimo kiuvetėje, patalpintoje tarp šviesą spinduliuojančių diodų 38 ir šviesos daviklio 40, pralaidumą.

15

Remiantis iš anksto užprogramuotu algoritmu, procesorius 18 suskaičiuoja gliukozės mėginio kiekį ir pasiunčia rezultata į skysto kristalo displėjaus schemą 26 tam, kad vartotojui šis rezultatas būtų matomas skysto kristalo displėje 28.

20

Dalys, esančios fig. 2B, 3A ir 3B, o taip pat 4A ir 4B, tokios pat, kaip dalys, esančios fig. 2A, yra pažymėtos tais pačiais skaitmenimis.

25

Fig. 3A variante analoginis - skaitmeninis 2A figūros keitiklis, išimtas ir pakeistas komparatoriaus 45, analoginio - skaitmeninio keitiklio 46 ir mikroprocesoriaus 18 kombinacija. Procesorius 18 pasiunčia į keitiklį 46 skaitmeninį dydį, kuris pakeičiamas į analoginę formą, ir kuris procesoriumi 18 nuosekliai keičiamas, kol komparatoriaus 55 išėjime nebus gautas nulinis signalas. Visame kitkame funkcionavimas toks pat, kaip ir fig. 2A.

30

35

Pagrindinė optinio bloko konstrukcija parodyta fig. 5. Įrenginys sudarytas iš dviejų šviesą spinduliuojančių diodų 52, 64, išdėstytų vienas kito atžvilgiu 90° kampu. Tam, kad gauti panašią optinę ašį, prieš
5 montažą, šviesą spinduliuojantys diodai turi būti sureguliuoti.

Fotometras gliukozės neatskiestame kraujyje atžvilgiu gali turėti savo bangos ilgį 660 nm, skirtą matavimams
10 fig. 1, 14 pozicija). Dėka absorbcijos matavimų nuo susidariusio dažo pusės matuojamojo bangų ilgio diapazono pusplotis turi būti tiksliai nustatytas. Foninis bangos ilgis, skirtas gliukozės neatskiestame kraujyje matavimui, turi būti didesnis nei 700 nm.
15 Atitinkamas foninės bangos ilgis parenkamas tada, kai naudojami pramonės išleidžiami šviesą spinduliuojantys diodai, pavyzdžiui, 740-940 nm.

Fig. 5 matyti, kad iš raudono šviesos diodo 52
20 sklindantis šviesos spindulys 50 praeina interferencinį filtrą 54, pasižymintį maksimaliu šviesos pralaidumu esant 660 nm ir turintį diapazono pusplotį mažesnę nei 15 nm, ir per reflektorių (veidroді), esantį 45° kampu. Po to, kai šviesos spindulys 50 praėjo interferencinį
25 filtrą 54 ir reflektorių 56, jis praeina pro kiuvetės 58 ertmę 60, kurioje (ertmėje) randasi neatskiestas grynas kraujas ir gliukozinis reagentas arba gliukozinio reagento produktai, ir pasiekia šviesos detektorių 40 pro kiaurymę 53, esančią kiuvetės
30 laikiklyje 55. Šviesos detektorius 40 gali būti aprūpintas nedidele surenkančiąja linze 62.

Infraraudonojo šviesos diodo šviesinis spindulys 64 atsispindi nuo reflektoriaus 56 užpakalinės pusės,
35 esančios 45° kampu, praeina per kiuvetės 58 ertmę 60 ir pasiekia detektorių 40. Infraraudonasis foninis bangos ilgis matuojamas pasitelkus antrą šviesos diodą 64

absorbcijos plokštumos lygyje (pavyzdžiui fig. 1, 15 pozicija) , be to infraraudonojo šviesos diodo diapazono pusplotis 64 turi mažą reikšmę.

- 5 Jei kiuvetės 55 judėjimo priemonė, pavyzdžiui, karietėlės konstrukcija aprūpinta elementu, kuris gali būti detektuojamas stacionariai įtaisytu davikliu, tai mikroprocesoriui 18 gali būti lengvai pateikiama informacija 43 apie padėtį, kurioje randasi 58 kiuvetė.
- 10 Jei karietėlė 55 naudojama kaip kiuvetės transportavimo priemonė, ji gali būti su magnetu, kuris bus detektuojamas dviem stacionariomis magnetinėmis liežuvelinėmis relikėmis. Karietėlei esant išstumtoje padėtyje, kiuvetės 58 įstatymui, matuojama maksimali
- 15 šviesa, 100 procentinė šviesa.

- Maksimali šviesa matuojama tiek matuojamo bangos ilgio, tiek foninio matuojamo bangos ilgio atžvilgiu. Esant nenutrūkstamam santykio skaičiavimui (t. y. daliniam atskyrimui), išreikštam procentais tarp matuojamo dydžio, kiuvetės, esančios matavimo padėtyje, ir maksimalios šviesos, šviesos šaltiniuose 52, 64 matuojant pralaidumą pasiekama gera senėjimo reiškinio kompensacija. Logaritminė operacija, skirta matuojamam
- 20 dydžiui, vykdoma mikroprocesoriuje 18 arba atskiroje schemoje (žiūr. variantas "B"), priimančioje absorbcijos matavimų rezultata.
- 25

- Šviesinio detektoriaus 40 srovė pasiekia operacinį stiprintuvą, kuris srovę pakeičia įtampa, kad būtų žymiai lengviau apdoroti signalus montažo plokštėje 16. Taip pat mikroprocesorius 18 kontroliuoja, ar detektoriaus 40 tamsinė srovė yra žema, ir kompensuoja, atsižvelgdamas į tamsinės srovės įtaką, tai
- 30
- 35 išskaitydamas naudojamoje skaičiavimo formulėje.

Fig. 2-4 parodyta tik viena judančioji dalis, būtent potenciometas 24. Potenciometas 24 yra vienintelis komponentas, kuris gali būti vartotojo naudojamas montažo plokštėje 16. Potenciometas 24 naudojamas fotometro kalibravimui kraujo su žinomu gliukozės kiekiu atžvilgiu. Tam, kad pasiektų maksimalų stabilumą, likusieji fotometro komponentai dažniausiai būna stacionarūs.

Ekonominiais sumetimais mikroprocesorius yra procesorius viename kristale. Tam, kad taupyti energiją, skaitmeniniai displėjai priklauso skysto kristalo tipui, ir fotometrą maitinanti energija ateina iš magistralinės maitinimo linijos transformatoriaus arba akumuliatorių baterijos.

Fig. 4 parodytas kitas išradimo realizavimo variantas. Šiame variante fotometro darbui panaudojamos mikroprocesoriaus 18 programavimo savybės, palengvinančios jo suderinimą ir padidinančios stabilumą. Tai pasiekama tada, kada dviejų šviesos diodų 38 srove valdomas maitinimas, pasitelkus skaitmeninį - analoginį keitiklį 70, kuris programavimo požiūriu turi grįžtamąjį ryšį su matuojamuoju signalu. Tada įmanoma matavimo požiūriu palaikyti tarpinį dydį, 100% pralaidumą pastoviam lygyje. Šis pastovus lygis elektroniškai nustatomas, remiantis tai išsprendžiančia savybe (bitų skaičius) esančia skaitmeninėje - analoginėje konversijoje.

30

Pavyzdys

Mikrokiuvetė 58 atitinkanti tipą, aprašytą anksčiau paminėtame JAV patente Nr. 4.088.448, buvo aprūpinta džiovinimo būdu vakuume sausu reagentu kiekybiniam bendro gliukozės kiekio nustatymui gryname kraujyje. Mikrokiuvetė buvo užpildyta sausu reagentu susidarant,

35

pirmojoje stadijoje, vandenyje tirpiam reagento mišiniui. Vandenyje tirpus gliukozinis mišinys savo sudėtyje turi (tūrio vienetas 1 ml):

- 5 100 vienetų GDH, gliukozės dehidrogenazės,
- 20 vienetų diaforazės,
- 20 μ mol NAD,
- 10 30 μ mol MTT,
- 25 mg Baltojo Saponino,
- 15 1 ml vandens, išvalyto jonų mainų kolonėlėje

2 stadijoje mikrokiuvetė buvo užpildoma apytiksliai 5 μ l reagento tirpalo, atstumas tarp sienelių mėginių absorbuojančioje artmėje 60, kuri taip pat yra kaip analitinė ertmė, apytiksliai buvo 0,14 mm.

3 stadijoje mikrokiuvetė buvo vakuume džiovinama. Po 3 stadijos mikrokiuvetė, turinti sausą reagentą, skirtą gliukozės nustatymui neatskiestame kraujyje, tolygiai pasiskirsčiusi ertmėje 60, buvo paruošta analizės atlikimui.

Fotometras, priklausantis anksčiau aprašytam tipui ir turintis mikroprocesorių 18 tipo INTEL 8751, gavo atitinkamą programą gliukozės nustatymui gryname kraujyje. Fotometras buvo užprogramuotas, kad siekiant galutinio tikslo, gauti rezultatai apie gliukozę gryname kraujyje, būtų išreikšti mmol/l. Šviesos diodai gaudavo impulsus kas 15 s, ir šviesdavo 5 ms.

35 Toliau esančioje lentelėje pateikti rezultatai, gauti iš gryno kraujo ir "fiksuoti" gliukoze, apibūdina

įvairius gliukozės kygius. Panaudotas reperinis metodas buvo gliukozės dehidrogenazės bandomoji sistema, paimta iš Merko, Gluc-DH 13886, 13887 metodo tipo. Spektrofotometrija reperiniame būde buvo įvykdoma ultravioletiniame diapazone, t. y. apytiksliai apie 340 nm, atitinkant specifinius duomenis, esančius ant įpakavimo, pridėtus prie Gluc-DH metodo. Reperinis būdas priklauso šlapio cheminio tipo analitiniam metodui.

10

Gliukozės kiekis "fiksuotuose" kraujo mėginiuose referiniu (kontroliniu) būdu buvo triskart nustatomas. Kiekviename gliukozės lygyje 10 iš anksto apdorotos mikrokiuветės buvo užpildomos neatskiestu krauju ir analizuojamos atitinkamai pagal išradime duotą matavimo bangos ilgį 660 nm ir foninį bangos ilgį 880 nm. Gauti rezultatai pateikiami toliau sekančioje lentelėje.

15

Išradimą atitinkantis būdas

20

Konc. mmol/l	CV%	Laikas iki galutinio tikslo, s
3.8	3.3	53
6.1	2.5	71
8.6	2.4	77
13.0	2.0	99
17.7	1.5	119
21.8	1.5	145

CV = variacijos koeficientas

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Gliukozės kiekio gryname kraujyje nustatymo būdas, kuriame gryno kraujo mėginys kontaktuoja su reagentu, kuris cheminės reakcijos su gliukoze metu keičia dažo koncentraciją, kitimas mėginyje gali būti detektuojamas, ir kurio dydis yra nustatomas kaip gliukozės kiekio matas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima
 - neatskiesto mėginio įvedimą į mikrokiuvetę, turinčią bent jau vieną ertmę mėginio paėmimui, be to šią ertmę iš vidaus iš anksto apdoroja sauso pavidalo reagentu, šioje ertmėje vyksta ir paminėta cheminė reakcija;
 - kaip aktyvių komponentų ištraukimą į reagentą, parenkamą iš bent jau hemolizinis reagentas, veikiantis gliukozę, esančią kraujo mėginio ląstelėse, kad būtų galima nustatyti bendrą gliukozės kiekį gryno kraujo hemolizate; reagentai, dalyvaujantys cheminėje reakcijoje ir užtikrinantys dažo koncentracijos kitimą, bent jau bangų ilgių diapazone, išseinančiame už kraujo hemoglobino absorbcijos ribų,
 - absorbciją matuoja minėtame bangos ilgių diapazone tiesiog su mėginiu, esančiu kiuvetėje.
2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad gliukozės dehidrogenazės būdą naudoja cheminėje reakcijoje.
 3. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad parenka diaforazę kaip aktyvų komponentą, įeinantį į reagentą.

4. Būdas pagal bet kuri iš 1-3 punktų, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad parenka mutarotazę kaip
reagento aktyvią komponentę.
- 5 5. Būdas pagal bet kuri iš 1-4 punktų, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad papildomai šalia absorbcijos
matavimo duotame bangos ilgių diapazone, kuriame vyksta
dažo koncentracijos kitimas antrą kartą absorbciją
matuoja žymiai aukštesniame bangos ilgių diapazone
10 foninių trukdymų kompensavimui.
6. Būdas pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad pirmas paminėtas bangos ilgių diapazonas,
kuriame vyksta dažo koncentracijos kitimas, yra
15 didesnis nei 650 nm, o antras bangos ilgių diapazonas,
kuriame vyksta kompensacijos matavimas, yra didesnis,
nei 700 nm, geriausiai - 740-940 nm.
7. Būdas pagal bet kuri iš 1-6 punktų, b e s i s k i -
20 r i a n t i s tuo, kad cheminė reakcija yra tikslinė
galutinė reakcija ir absorbciją matuoja tik tuo atveju,
jei dažo koncentracijos kitimas iš esmės pasibaigė.
8. Vienkartinio naudojimo kiuvetė (58), naudojama
25 gliukozės kiekio gryname kraujyje nustatymui, kai gryno
kraujo mėginys kontaktuoja su reagentu, kuris cheminės
reakcijos su gliukoze metu keičia dažo koncentraciją,
kitimas gali būti mėginyje detektuojamas, ir kurio
dydis nustatomas kaip gliukozės kiekio matas, b e -
30 s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi bent jau vieną
ertmę (60) mėginio paėmimui, be to ši ertmė iš vidaus
iš anksto apdorota sauso pavidalo reagentu, ir cheminė
reakcija šioje ertmėje vyksta įvedus mėginį neats-
kiestame pavidale, be to aktyvieji komponentai, esantys
35 kiuvetės reagentu, turi bent jau, hemolizuojanti
reagentą, veikiantį gliukozę, esančią kraujo mėginio
ląstelėse, kad būtų galima nustatyti bendrą gliukozės

kiekį ir reagentus, dalyvaujančius cheminėje reakcijoje ir užtikrinančius dažo koncentracijos kitimą, bent jau, bangos ilgių diapazone, esančiame už kraujo hemoglobino absorbcijos diapazono ribų, be to kiuvetė, bent jau, 5 yra dalinai skaidri, kad būtų galima išmatuoti absorbciją betarpiškai mėginio esančio kiuvetėje, duotame bangos ilgių diapazone.

9. Fotometras, naudojamas vykstant tokiam gliukozės 10 kiekio gryname kraujyje nustatymui, kai gryno kraujo mėginys kontaktuoja su reagentu, kuris cheminės reakcijos su gliukoze metu mėginyje pakeičia dažo koncentraciją, kuris (kitimas) gali būti detektuojamas mėginyje, ir kurio (kitimo) dydis yra gliukozės kiekio 15 matas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad fotometras, adaptuotas naudojimui kombinacijoje su, bent jau, dalinai skaidria vienkartinio naudojimo mikrokiuvete (58), kuri prieš tai iš anksto apdorojama sauso pavidalo reagentu ir kurioje turi vykti cheminė 20 reakcija įvedus mėginį neatskiestame pavidale į kiuvetę, be to fotometras, naudojamas absorbcijos matavimams betarpiškai su kiuvetėje esančiu mėginiu turi pirmąją šviesą spinduliuojantį diodą (52), kurio spinduliuojamos šviesos bangos ilgis yra nurodytame 25 bangos ilgių diapazone, kuriame vyksta dažo koncentracijos kitimas, antrą šviesą spinduliuojantį diodą (64), kurio spinduliuojamos šviesos bangos ilgis nepriklauso nurodytam bangos ilgių diapazonui, šviesos detektorių (40), kuris matavimo metu priima šviesą, 30 praėjusią per kiuvetę ir mėginį, paeiliui iš pirmojo ir antrojo šviesos diodų, elektroninę vertinimo priemonę (18,20,22,24,46), skaičiuojančią, remiantis šviesiniu detektoriumi (40) išmatuotą gliukozės mėginio kiekį gautą, atėmus iš pralaidumo, esant pirmo šviesos diodo spinduliuojamam bangos ilgiui (52), pralaidumą, esant 35 antro šviesos diodo spinduliuojamam bangos ilgiui (64),

ir displėjinę priemonę (26,28) gliukozės kiekio vizualizavimui, suskaičiuoto palyginimo būdu.

- 5 10. Fotometras pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad pirmojo šviesinio diodo (52) šviesos
bangos ilgis didesnis, nei 650 nm, ir antro šviesos
diodo (64) šviesos bangos didesnis nei 700 nm,
geriausia jei 740-940 nm.
- 10 11. Fotometras pagal 9 arba 10 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad šviesa bent jau iš vieno (58)
iš šviesos diodų priverčiama sklisti per monochromatinį
filtrą (54).

Fig.1

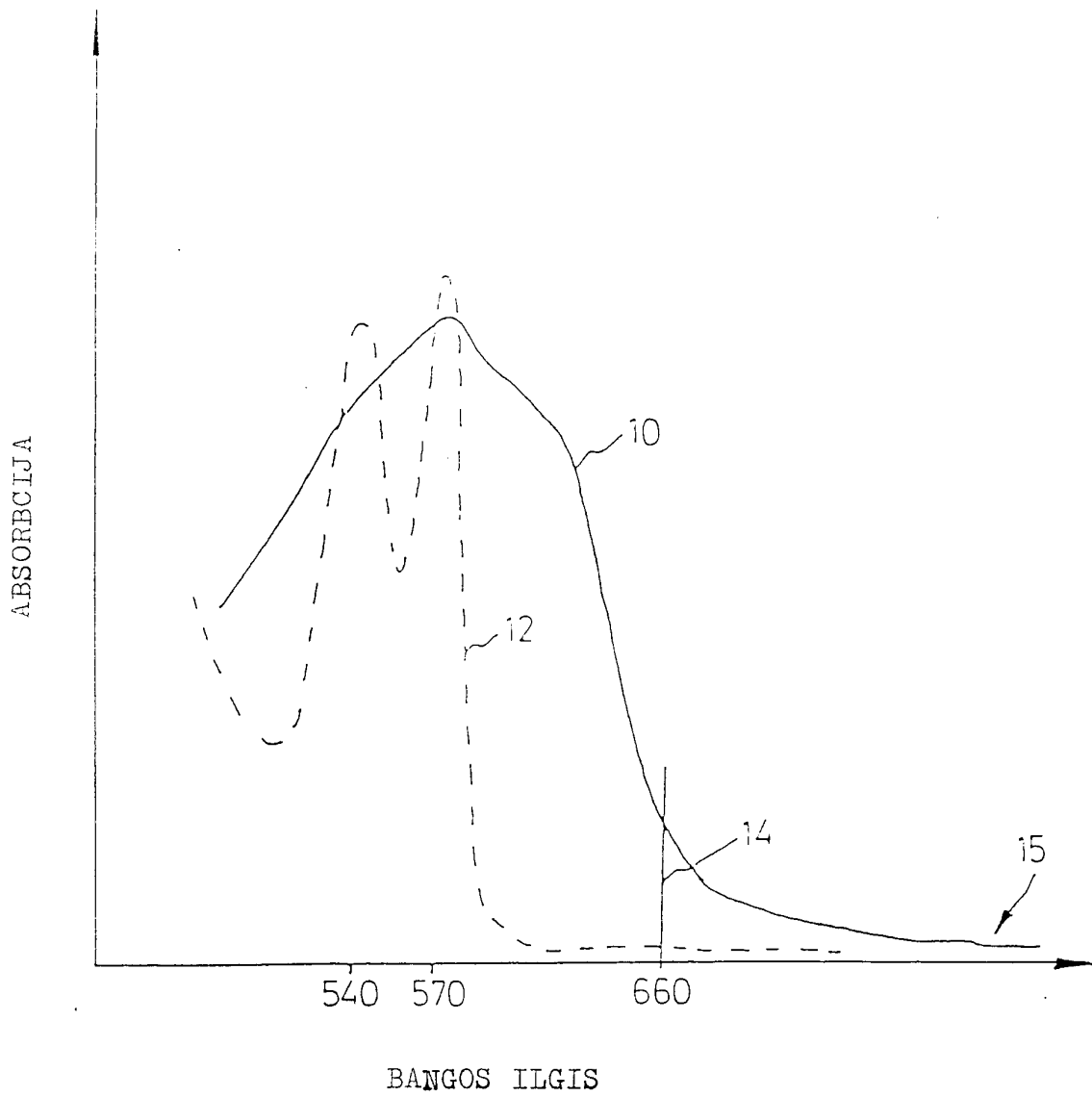


Fig. 2A

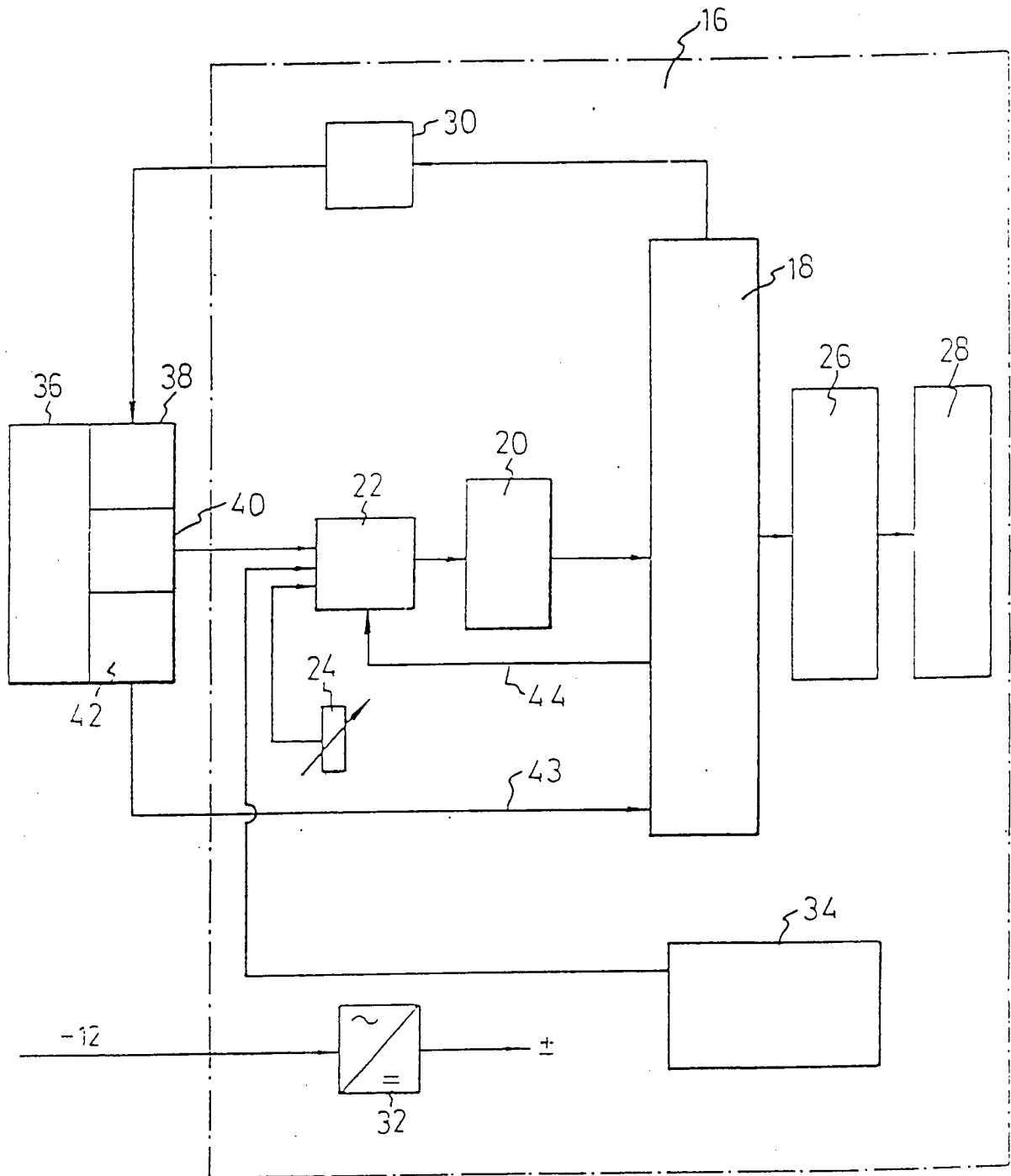


Fig. 2 B

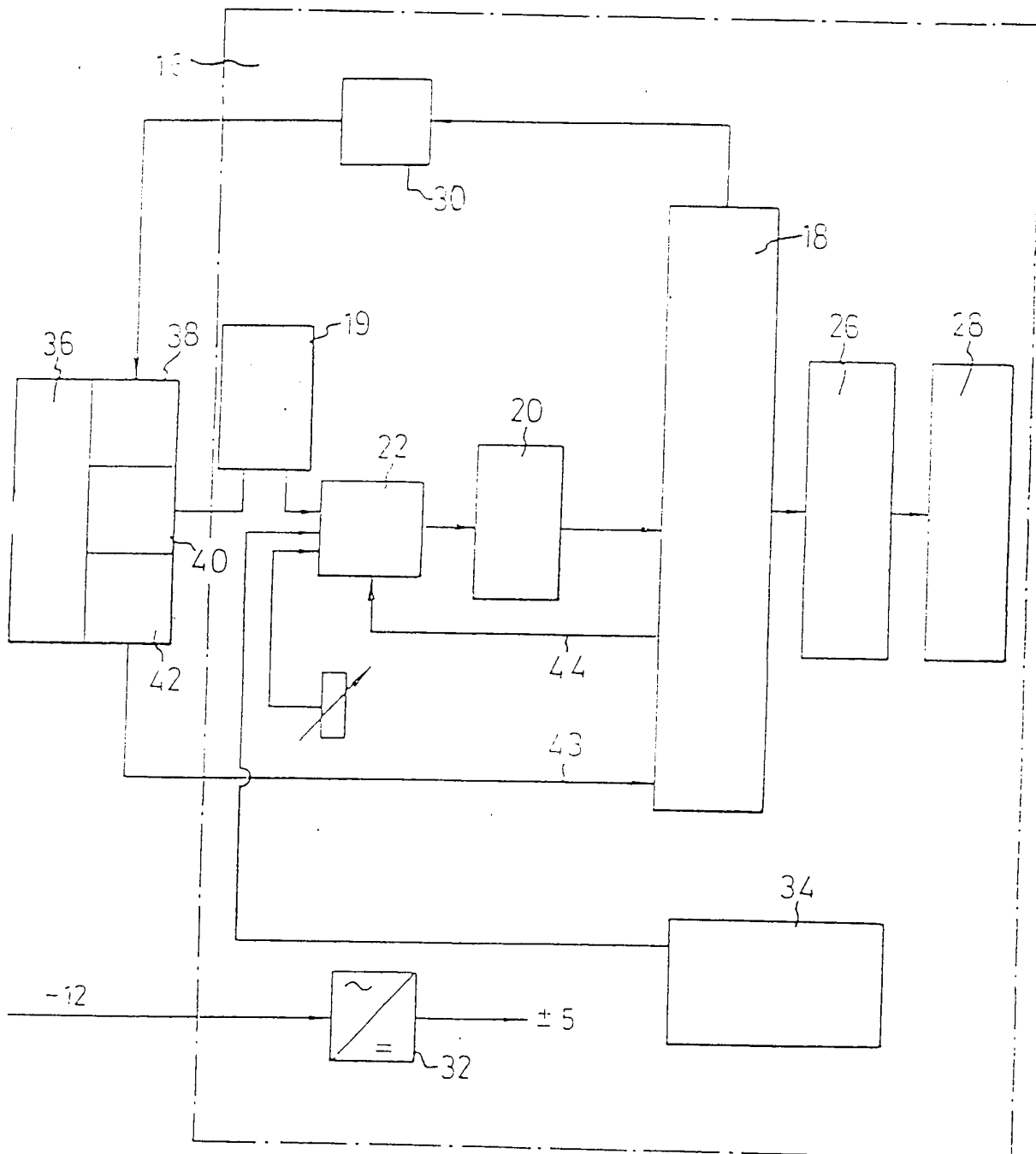


Fig. 3A

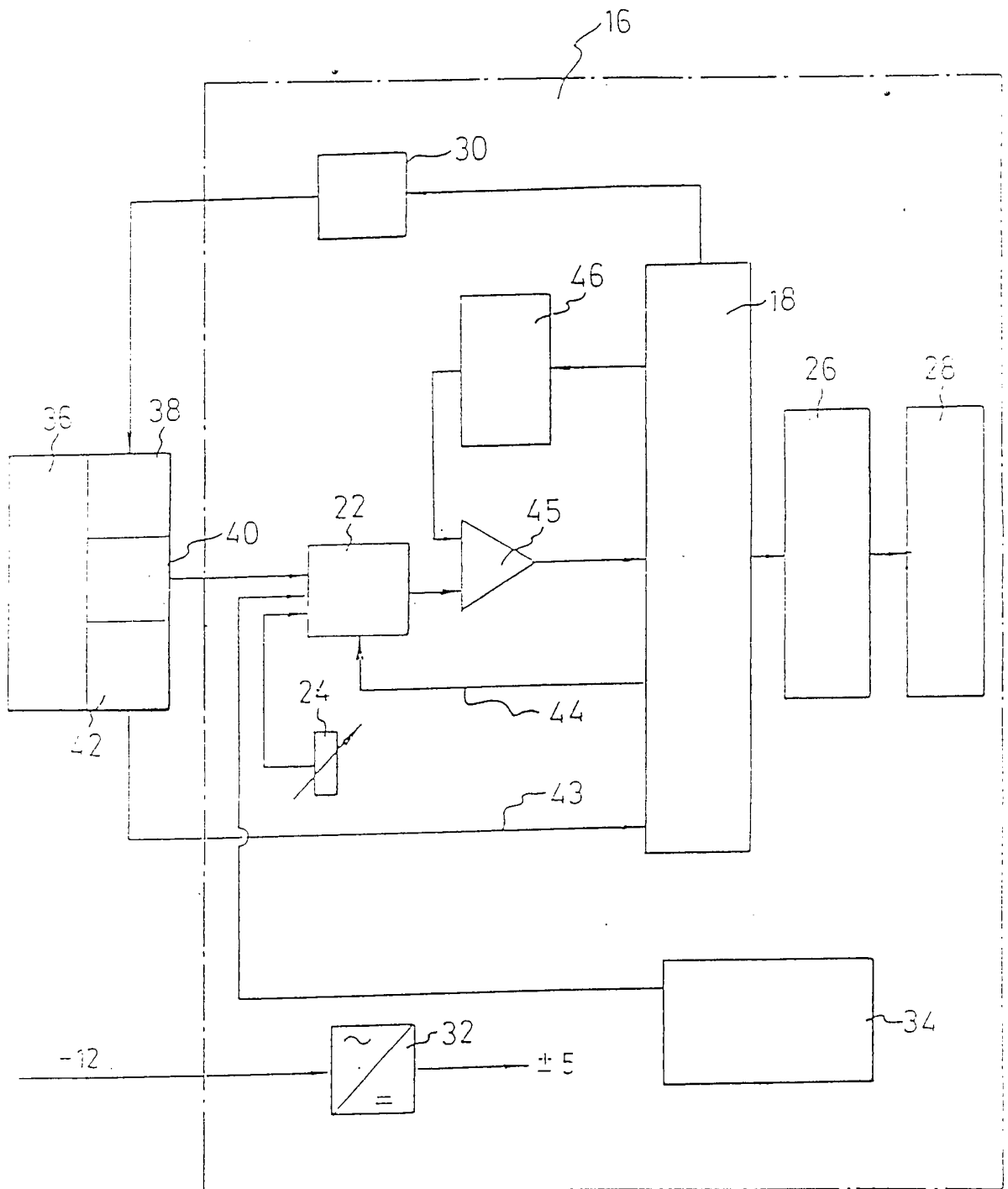


Fig.3 B

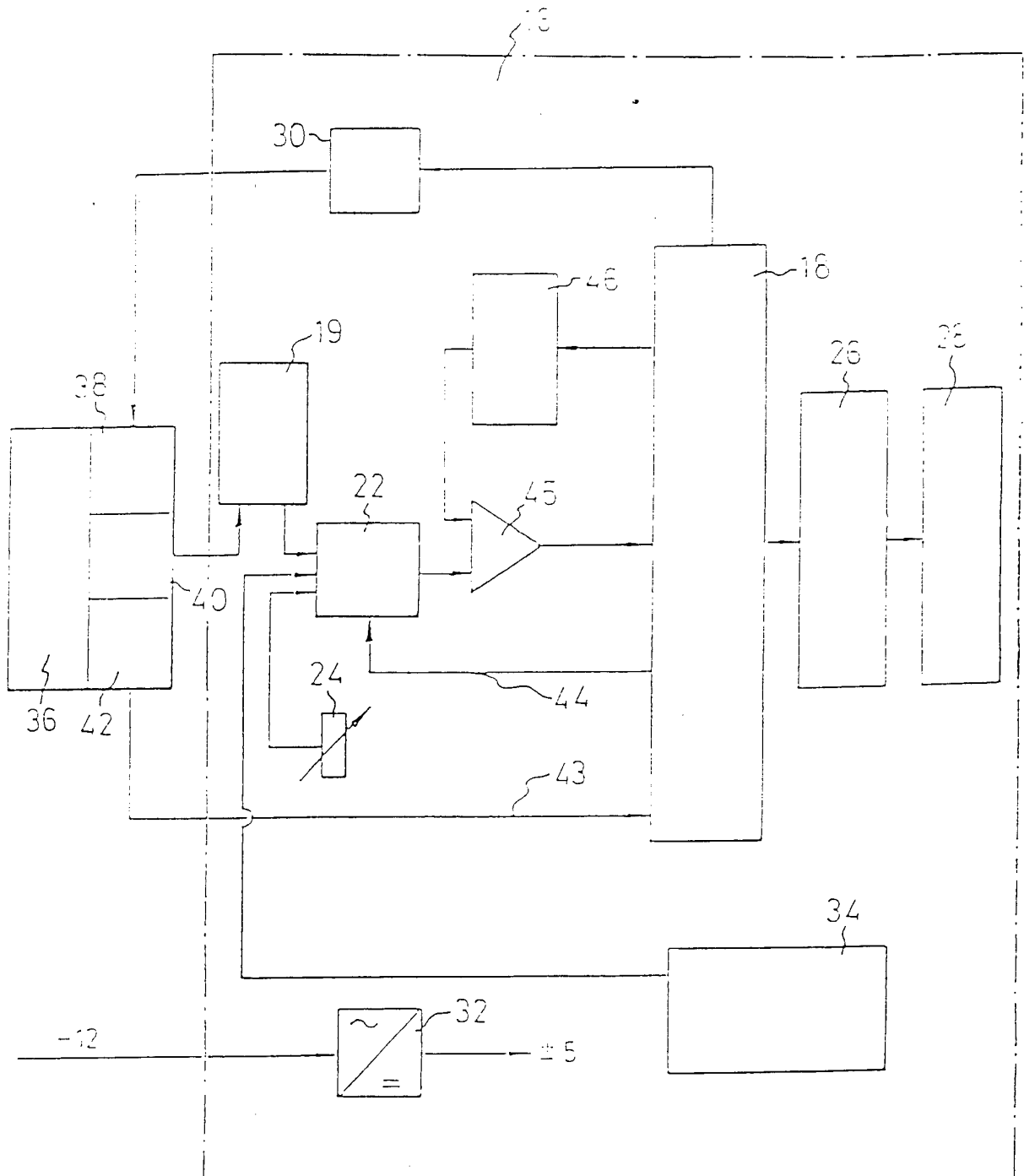


Fig.4 A

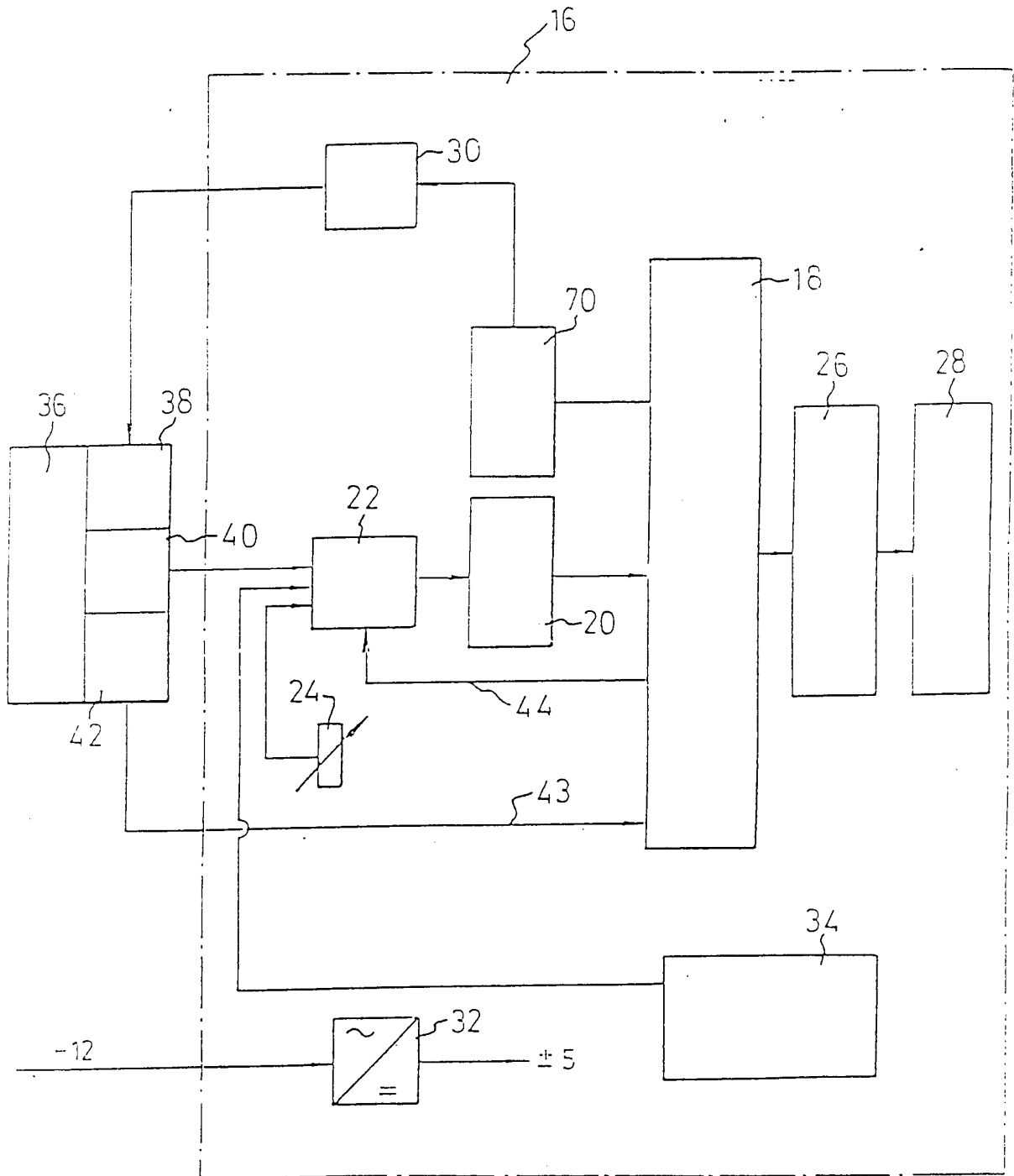


Fig. 4 B

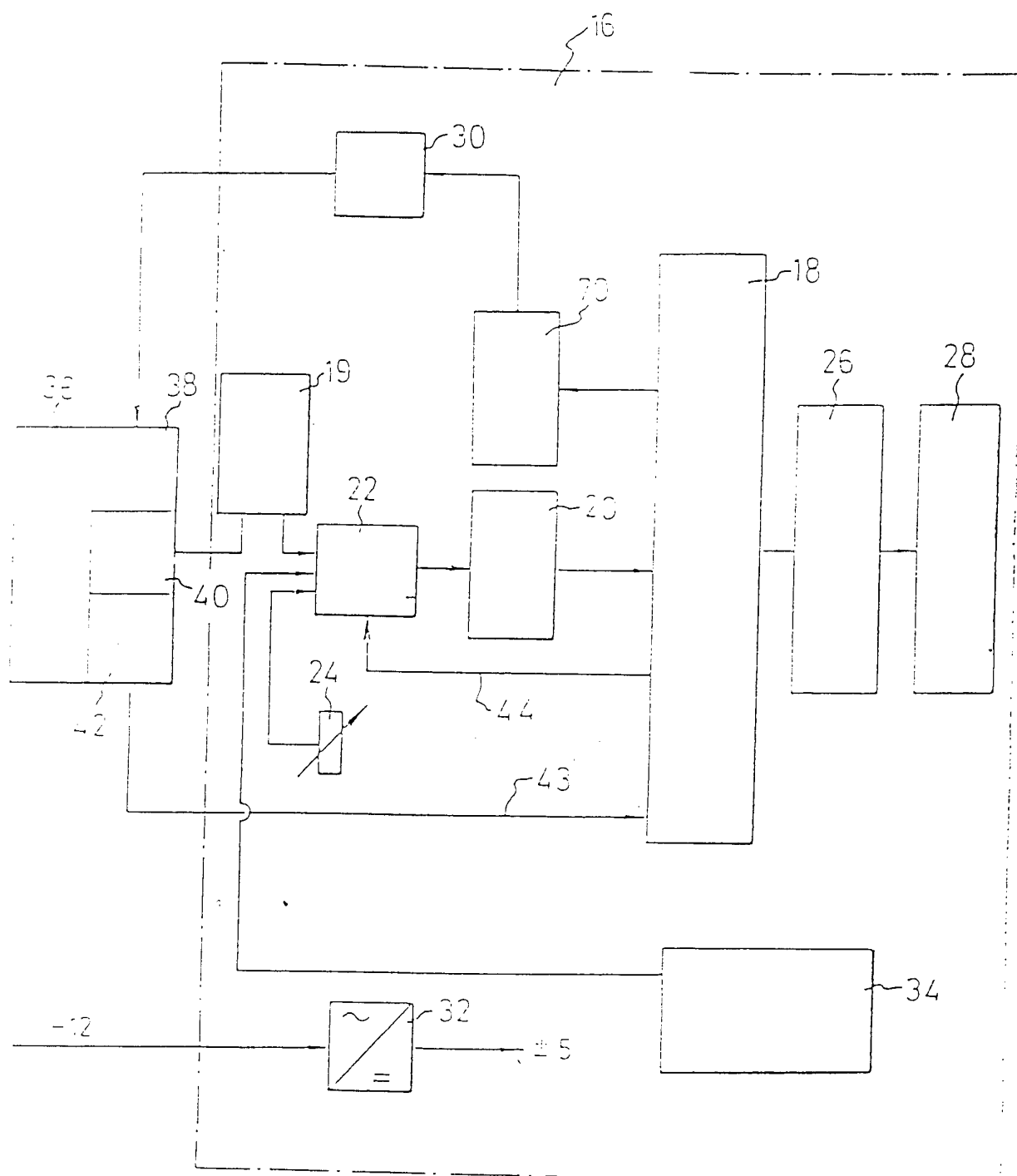


Fig.5

