

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037013**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.01.26

(21) Номер заявки
201900269

(22) Дата подачи заявки
2017.11.12

(51) Int. Cl. **G01N 33/86** (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

(54) УСТРОЙСТВО МОНИТОРИНГА ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННОЙ ДИНАМИКИ ТРОМБИНА

(31) **2016147005**

(32) **2016.11.30**

(33) **RU**

(43) **2019.10.31**

(86) **PCT/RU2017/050116**

(87) **WO 2018/101861 2018.06.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ГемаКор
ЛАБС" (ООО "ГемаКор ЛАБС") (RU)**

(56) **RU-U1-123166
RU-C1-2106627
US-B2-7767458**

(72) Изобретатель:
**Карамзин Сергей Сергеевич,
Атауллаханов Фазил Иноятович,
Набиркин Алексей Николаевич,
Дашкевич Наталья Михайловна (RU)**

(57) Предложено устройство мониторинга пространственно-временной динамики тромбина, которое включает термостатируемую герметизируемую камеру с прозрачным окном и световой ловушкой, заполненную текучей средой, выполненную с возможностью установки в нее кюветы, внутри которой находится исследуемый образец плазмы крови и внутрь которой помещается вставка-активатор свертывания, с нанесенным на ее нижнем торце веществом, способствующим инициации процесса свертывания, по меньшей мере одно средство освещения образца, выполненное с возможностью получения сигнала светорассеяния от образца, и по меньшей мере одно первое средство облучения, выполненное с возможностью возбуждения сигнала флуоресценции специальной метки, образующейся в образце в процессе расщепления предварительно добавленного в образец флуорогенного субстрата одним из протеолитических ферментов системы свертывания, средство оптической фото/видео регистрации светорассеяния/излучения от образца, средство регулировки давления в термостатируемой герметизируемой камере, выполненное с возможностью поддержания избыточного по отношению к атмосферному давления в камере, при этом устройство включает по меньшей мере одно второе средство облучения образца, выполненное с возможностью возбуждения сигнала флуоресценции указанной метки, по меньшей мере одно первое средство облучения обеспечивает облучение образца в направлении, перпендикулярном плоскости кюветы, и по меньшей мере одно второе средство облучения обеспечивает облучение образца под углом к плоскости кюветы.

B1**037013****037013****B1**

Область техники

Техническое решение относится к медицине и биологии и может быть использовано, в частности, для диагностических и исследовательских целей при определении характеристик свертывания крови и ее компонентов, а также в биотехнологии и в фундаментальных биологических исследованиях.

Предшествующий уровень техники

В качестве ближайшего аналога выбрано устройство, раскрытое в патенте РФ № 123166, кл. G01N 33/86, опубл. 20.12.2012 г. Указанное устройство включает термостатируемую герметизируемую камеру с прозрачным окном и световой ловушкой, заполненную текучей средой, выполненную с возможностью установки в нее кюветы, внутри которой находится исследуемый образец плазмы крови и внутрь которой помещается специальная вставка-активатор свертывания, с нанесенным на ее нижнем торце веществом, способствующим инициации процесса свертывания, по меньшей мере одно средство освещения образца, выполненное с возможностью получения сигнала светорассеяния от образца, по меньшей мере одно средство облучения, выполненное с возможностью возбуждения сигнала флуоресценции специальной метки, образующейся в образце в процессе расщепления предварительно добавленного в образец флуорогенного субстрата одним из протеолитических ферментов системы свертывания, средство оптической фото/видео регистрации светорассеяния/излучения от образца, средство регулировки давления в термостатируемой герметизируемой камере, выполненное с возможностью поддержания избыточного по отношению к атмосферному давления в камере. В качестве недостатка указанного устройства можно назвать артефактное искажение сигнала флуоресценции метки на границе фибринового сгустка и несвернувшейся плазмы крови, которое возникает при облучении образца излучением возбуждения метки в направлении перпендикулярном стенке кюветы. Искажения сигнала флуоресценции метки на границе роста фибринового сгустка приводят к ошибке расчета значений концентрации протеолитического фермента, в частности тромбина, в данной области.

Другим недостатком указанного устройства является то, что в нем не учитывается влияние оптической плотности образца плазмы крови на сигнал флуоресценции. Так одна и та же концентрация флуоресцентной метки будет давать разную интенсивность сигнала флуоресценции в нормальной и мутной плазме крови (например, гемолизной или хилезной). Из-за этого невозможно пользоваться единой калибровкой для разных образцов плазмы крови, т.е. для восстановления концентрации протеолитического фермента невозможно использовать единожды установленную зависимость между сигналом флуоресценции и концентрацией метки.

Сущность заявляемого решения

Технический результат, который может быть получен при реализации данного технического решения, заключается в повышении точности определения пространственно-временного распределения концентрации тромбина в процессе свертывания плазмы крови, необходимого для диагностирования состояния системы свертывания крови.

Задача, которую решает заявляемое техническое решение, состоит в устранении артефактного искажения сигнала флуоресценции метки на границе фибринового сгустка и в добавлении возможности учета оптической плотности образца при определении пространственно-временного распределения концентрации тромбина.

Указанная задача решается за счет создания устройства мониторинга пространственно-временной динамики тромбина, которое включает термостатируемую герметизируемую камеру с прозрачным окном и световой ловушкой, заполненную текучей средой, выполненную с возможностью установки в нее кюветы, внутри которой находится исследуемый образец плазмы крови и внутрь которой помещается вставка-активатор свертывания, с нанесенным на ее нижнем торце веществом, способствующим инициации процесса свертывания, по меньшей мере одно средство освещения образца, выполненное с возможностью получения сигнала светорассеяния от образца и, по меньшей мере одно первое средство облучения, выполненное с возможностью возбуждения сигнала флуоресценции специальной метки, образующейся в образце в процессе расщепления предварительно добавленного в образец флуорогенного субстрата одним из протеолитических ферментов системы свертывания, средство оптической фото/видео регистрации светорассеяния/излучения от образца, средство регулировки давления в термостатируемой герметизируемой камере, выполненное с возможностью поддержания избыточного по отношению к атмосферному давления в камере, при этом устройство включает по меньшей мере одно второе средство облучения образца, выполненное с возможностью возбуждения сигнала флуоресценции указанной метки, при этом по меньшей мере одно первое средство облучения обеспечивает облучение образца в направлении перпендикулярном плоскости кюветы и по меньшей мере одно второе средство облучения обеспечивает облучение образца под углом к плоскости кюветы.

А также тем, что оно дополнительно содержит средство анализа оптической плотности образца, предпочтительно на длине волны возбуждения флуоресцентной метки.

А также тем, что средство регулировки давления выполнено с возможностью поддержания избыточного давления по отношению к атмосферному на 0,2-0,5 атм.

А также тем, что оно содержит оптические элементы, направляющие, фокусирующие и осуществляющие спектральную коррекцию освещения/облучения.

А также тем, что оно дополнительно содержит средство управления средствами освещения/облучения, фото/видео регистрации и регулировки давления, выполненное с возможностью синхронизации работы указанных средств.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 схематически представлено заявляемое устройство;

на фиг. 2 приведен пример размещения образца плазмы и вставки-активатора в измерительной кювете, фотографии светорассеяния от образца при освещении его средством освещения и фотографии флуоресценции образца при облучении его средствами облучения;

на фиг. 3 представлен пример артефактного искажения сигнала флуоресценции метки на границе фибринового сгустка при использовании одного средства облучения, облучающего образец в направлении, перпендикулярном стенке кюветы (слева), а также пример устранения артефактного искажения сигнала флуоресценции метки на границе фибринового сгустка при использовании двух средств облучения (справа);

на фиг. 4 изображен график зависимости интенсивности сигнала флуоресценции метки от оптической плотности образца.

Устройство (фиг. 1) предназначено для определения характеристик процесса свертывания крови и ее компонентов, и оно работает следующим образом. В герметичной термостатируемой камере 1, заполненной водой или иной текучей прозрачной средой (далее "тепловым агентом"), устанавливают и поддерживают температуру теплового агента на заданном уровне (по умолчанию 37,0°C). Внутри термостатируемой камеры 1 при помощи фиксатора кюветы 18 размещают кювету 2. Кювета 2 может содержать как один, так и несколько каналов. Внутри канала (каналов) кюветы 2 размещен образец (образцы) плазмы крови 3 (фиг. 2). При этом кювета 2 размещается таким образом, что часть кюветы с исследуемым образцом 3 полностью погружена в тепловой агент, тем самым обеспечивается равномерный и быстрый прогрев образца. После полного прогрева образца 3 и прекращения конвекционных потоков в образце в кювету 2 погружают специальную вставку 4 таким образом, чтобы тромбогенное вещество (активатор свертывания), нанесенное на торец этой вставки 4, пришло в соприкосновение с образцом 3 и инициировало запуск исследуемого процесса свертывания. В качестве вещества, способствующего инициации процесса свертывания, может быть использован белок, так называемый тканевый фактор (тромбопластин), иммобилизованный различными способами на торцевую поверхность вставки 4 или непосредственно на внутреннюю поверхность кюветы 2 в заданном заранее месте; а также другие материалы органического происхождения, представляющие собой препараты клеток и тканей. В качестве активатора свертывания можно использовать и другие тромбогенные вещества: стекло; каолин, пластик и т.п.

Далее закрывают термостатируемую камеру 1 герметизирующим средством 6 и устанавливают и поддерживают избыточное давление (в пределах на 0,3-0,5 атм выше атмосферного) в объеме термостатируемой камеры посредством работы средства регулировки давления 5. Избыточное давление необходимо для предотвращения образования пузырьков газа как в образце 3, так и в тепловом агенте. Это необходимо для того, чтобы указанные пузырьки не искажали результаты регистрации оптических характеристик процесса свертывания (т.к. пузырьки газа вызывают артефактные блики при их освещении). Средство регулировки давления 5 в частном случае его выполнения может включать в свой состав воздушный насос, обратные клапаны и датчик давления, измеряющий давление в камере 1. Средство герметизации 6 может представлять собой крышку, колпачок, задвижку или иное известное средство. При этом средство герметизации 6 может быть механическим, закрываемым оператором, или электромеханическим, работающим по командам средства управления.

Термостатируемая камера 1 снабжена прозрачным окном 7, через которое кювета с исследуемым образцом 3 освещается средством освещения 8 и средствами облучения 12, имеющими разные спектры излучения. Средство освещения 8 предназначено для освещения образца с целью дальнейшей регистрации светорассеяния от образца (например, освещает образец в красном диапазоне длин волн). При необходимости средств освещения может быть несколько (на фиг. 1 не показано), которые симметрично освещают кювету 2 с образцом 3 с боков. Средства облучения 12 предназначены для возбуждения сигнала флуоресценции от специальной метки-флуорофора, которая образуется в объеме образца после взаимодействия тромбина с предварительно добавленным в образец флуорогенным субстратом (например, освещают образец в диапазоне длин волн, соответствующем спектру возбуждения метки). В качестве средств освещения и облучения могут быть использованы светодиоды (или группы светодиодов) или любые другие источники излучения требуемого спектрального диапазона (или группы источников излучения).

При контакте активатора свертывания, размещенного на торце вставки 4, с образцом 3 запускается процесс свертывания. От торца вставки начинает расти фибриновый сгусток. Изображения процесса формирования фибринового сгустка регистрируются средством фото/видео регистрации 9 (например, цифровой фото/видеокамерой) при помощи объектива 10, в виде картины пространственного распределения светорассеяния (фотографии) от образца 3 при освещении его средством освещения 8. Формирующийся фибриновый сгусток хорошо рассеивает свет, в то время как плазма крови практически прозрачна для света от средства освещения 8. В результате на получаемом средством регистрации изобра-

жении (фотографии) светорассеяния фибриновый сгусток будет более яркий, чем несвернувшаяся часть образца (фиг. 2). В процессе проведения исследования световая ловушка 11, размещенная внутри термостатируемой камеры 1, обеспечивает эффективное поглощение света от средств освещения, прошедшего за плоскость кюветы 2. Это достигается за счет геометрических и поверхностных свойств ловушки, обеспечивающих многократное переотражение света стенками ловушки и его постепенное эффективное поглощение. Световая ловушка может быть выполнена различным способом, в частности сформирована за счет определенной геометрии внутренних поверхностей термостатируемой камеры, в частности в виде усеченного конуса. Также она может быть сформирована за счет придания внутренним поверхностям камеры светопоглощающих свойств, например за счет чернения и придания им определенной шероховатости. Геометрия и оптические свойства световой ловушки 11 были подобраны таким образом, чтобы обеспечивать многократное переотражение и поглощение фонового излучения. Таким образом, лишь малая часть света, прошедшего за плоскость кюветы 2 при освещении образца, попадает обратно в область регистрации кюветы 2 и во входную апертуру объектива 10 после отражения от стенок термостатируемой камеры 1 и ловушки 11. За счет этого достигается лучшая контрастность между свернувшейся и несвернувшейся частью образца. Путем цифровой обработки серии изображений (фотографий) светорассеяния средство 13 обработки результатов исследования рассчитывает параметры пространственной динамики свертывания плазмы крови (например, такие как скорость роста сгустка, время задержки роста сгустка, наличие спонтанных сгустков и др.).

Добавление в образец 3 перед началом проведения исследования флуорогенного субстрата к одному из протеолитических ферментов системы свертывания, в частности субстрата к тромбину, позволяет проводить исследование пространственной кинетики данного протеолитического фермента - тромбина - в процессе свертывания плазмы крови. При образовании в образце тромбина он начинает отщеплять от субстрата сигнальную метку. Метка способна флуоресцировать при облучении светом определенной длины волны (в частности, 370 нм). Из пространственного распределения сигнала метки в различные моменты времени можно получить пространственное распределение концентрации тромбина в различные моменты времени, используя уравнения типа реакция-диффузия.

Для регистрации пространственной кинетики протеолитического фермента в процессе свертывания плазмы крови исследуемый образец 3 с добавленным флуорогенным субстратом облучают в заданные моменты времени средствами облучения 12 для возбуждения сигнала флуоресценции метки и регистрируют изображения пространственного распределения сигнала флуоресценции метки в образце (фиг. 2.) устройством регистрации 9.

Для обеспечения получения заявленного технического результата, а именно для повышения точности определения пространственно-временной концентрации тромбина, средства облучения 12 располагают относительно кюветы таким образом, чтобы исключить возникновение артефактных искажений сигнала флуоресценции метки на границе роста фибринового сгустка (фиг. 3). Одно первое средство облучения 12 облучает кювету 2 через окно 7 в термостатируемой камере перпендикулярно стенке кюветы 2, что достигается путем использования дихроичного зеркала 14 (является зеркалом для освещения возбуждения и является прозрачным для излучения флуоресценции), такое расположение средства 12 обеспечивает максимально равномерное облучение кюветы. Второе средство облучения 12 облучает кювету 2 через окно 7 под углом снизу, что обеспечивает минимизацию искажений сигнала флуоресценции метки на границе роста фибринового сгустка. Излучение от средств облучения 12, каждого из которых может быть более одного (на фиг. 1 не показано) подвергается спектральной коррекции фильтрами 16, обеспечивающими выделение спектра флуоресценции метки из спектра средства освещения. Диффузоры 17 служат для сглаживания диаграммы направленности излучения средств облучения 12. Световой фильтр 15 служит для блокировки той части излучения от средств облучения 12, которая была отражена образцом, кюветой или стенками камеры. Средство освещения 8 и/или средства облучения 12 включаются лишь на то короткое время, когда осуществляется процесс регистрации светорассеяния/флуоресценции. Такой режим работы средств освещения/облучения уменьшает эффект фотоблещивания метки субстрата.

При облучении образца излучением возбуждения флуоресцентная метка начинает излучать свет в другом диапазоне длин волн (излучение флуоресценции). Излучение флуоресценции метки регистрируется средством регистрации 9 (например, цифровой фото/видеокамерой) при помощи объектива 10 в виде изображений картины пространственного распределения сигнала флуоресценции (фиг. 2). Путем цифровой обработки серии фотографий флуоресценции средство 13 обработки результатов исследования рассчитывает параметры пространственной кинетики протеолитического фермента, в частности тромбина, в процессе свертывания (например, такие как скорость распространения тромбина, амплитуда пика тромбина, количество образовавшегося тромбина и др.).

Сигнал флуоресценции метки зависит не только от активности протеолитического фермента, но и от оптических свойств исследуемого образца 3. Для нормальных образцов (без признаков гемолиза или хилеза) интенсивность флуоресценции фиксированной концентрации метки различается незначительно, что делает возможным использование общей калибровки для всех нормальных образцов (под калибровкой понимается единожды установленная для конкретного устройства зависимость между интенсивностью флуоресценции метки в каждой точке образца и ее концентрацией). Однако повышенное присутст-

вие билирубина или гемоглобина в образце так же, как и хилезность образца, изменяет оптическую плотность образца, что в свою очередь влияет на сигнал флуоресценции метки. Для того чтобы использовать общую калибровку применительно к таким образцам, ее необходимо предварительно нормировать, используя значение оптической плотности образца и зависимость интенсивности сигнала флуоресценции метки от оптической плотности образца (фиг. 4). Значение оптической плотности образца 3 вычисляется из значения интенсивности сигнала освещения возбуждения от средства облучения 12, освещающего кювету перпендикулярно, прошедшего сквозь образец. Интенсивность сигнала прошедшего облучения измеряется электронным фотодетектором 21. Размещение электронного фотодетектора 21 внутри заполненной тепловым агентом камеры 1 термостата нежелательно, так как потребует принятия мер по изоляции электрической части детектора от теплового агента (например, воды) и мер по герметичному выводу сигнала с фотодетектора (проводов) из термостатируемой камеры 1. Расположение фотодетектора 21 непосредственно за кюветой 2 сильно исказит изображение картины светорассеяния от образца за счет возникновения паразитных сигналов светорассеяния и отражения от фотодетектора 21. Для того чтобы избежать обозначенных проблем, фотодетектор 21 располагают вне термостатируемой камеры. При этом прошедшее через кювету 2 излучение возбуждения направляется к фотодетектору 21 миниатюрным зеркалом 19 через прозрачное герметичное окно 20. Зеркало 19 конструктивно закреплено в фиксаторе кюветы 18 и расположено за кюветой 2 таким образом, что вносит искажения в сигнал светорассеяния и флуоресценции образца лишь в небольшой части области регистрации, не участвующей в последующем анализе. Таким образом, на фотодетектор 21 попадает часть излучения возбуждения, прошедшая через образец 3. Сигнал, регистрируемый фотодетектором, зависит от оптической плотности образца и используется для нормировки общей калибровки.

Регистрация пространственной динамики процесса свертывания и кинетики образования протеолитического фермента возможна в рамках одного исследования путем поочередной работы средств освещения 8 и облучения 12.

Таким образом, предлагаемое устройство позволяет регистрировать в различные моменты времени в процессе свертывания образца плазмы крови пространственное распределение светорассеяния от образца и пространственное распределение флуоресценции метки-флуорофора, образующейся под действием протеолитического фермента системы свертывания крови - тромбина. Параметры пространственной динамики роста фибринового сгустка и пространственной кинетики образования тромбина рассчитываются путем анализа полученных распределений. Полученные данные дают важную информацию о состоянии свертывающей системы крови образца.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Устройство мониторинга пространственно-временной динамики тромбина включает термостатируемую герметизируемую камеру с прозрачным окном и световой ловушкой, заполненную текучей средой, выполненную с возможностью установки в нее кюветы, внутри которой находится исследуемый образец плазмы крови, внутрь которой помещается вставка-активатор свертывания, с нанесенным на ее нижнем торце веществом, способствующим инициации процесса свертывания, по меньшей мере одно средство освещения образца, выполненное с возможностью получения сигнала светорассеяния от образца, по меньшей мере одно первое средство облучения, выполненное с возможностью возбуждения сигнала флуоресценции специальной метки, образующейся в образце в процессе расщепления предварительно добавленного в образец флуорогенного субстрата одним из протеолитических ферментов системы свертывания, средство оптической фото/видео регистрации светорассеяния/излучения от образца, средство регулирования давления в термостатируемой герметизируемой камере, выполненное с возможностью поддержания избыточного по отношению к атмосферному давления в камере, отличающееся тем, что

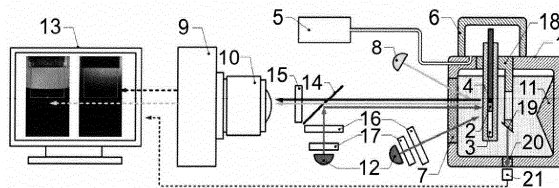
оно включает по меньшей мере одно второе средство облучения образца, выполненное с возможностью возбуждения сигнала флуоресценции указанной метки, где по меньшей мере одно первое средство облучения обеспечивает облучение образца в направлении, перпендикулярном плоскости кюветы, и по меньшей мере одно второе средство облучения обеспечивает облучение образца под углом к плоскости кюветы снизу.

2. Устройство по п.1, отличающееся тем, что оно дополнительно содержит средство анализа оптической плотности образца, предпочтительно на длине волны возбуждения флуоресцентной метки.

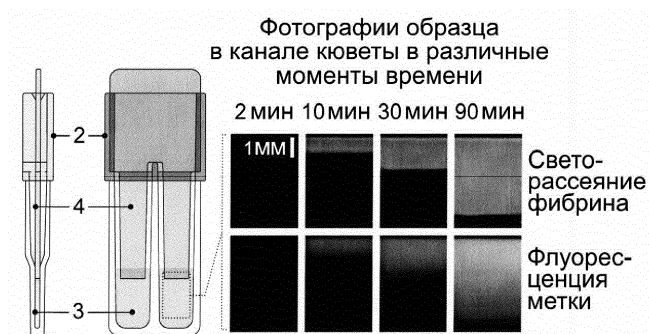
3. Устройство по п.1, отличающееся тем, что средство регулирования давления выполнено с возможностью поддержания избыточного давления по отношению к атмосферному на 0,2-0,5 атм.

4. Устройство по п.1, отличающееся тем, что оно содержит оптические элементы, направляющие, фокусирующие и осуществляющие спектральную коррекцию освещения/облучения.

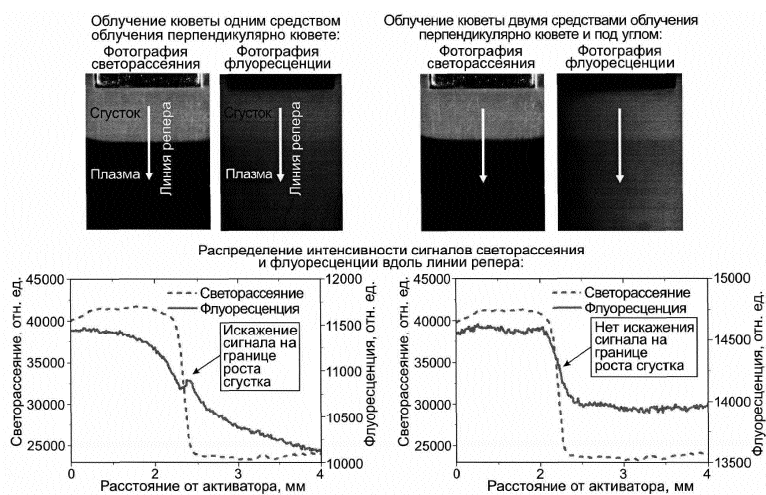
5. Устройство по п.1, отличающееся тем, что оно дополнительно содержит средство управления средствами освещения/облучения, возбуждения, фото/видео регистрации и регулирования давления, выполненное с возможностью синхронизации работы указанных средств.



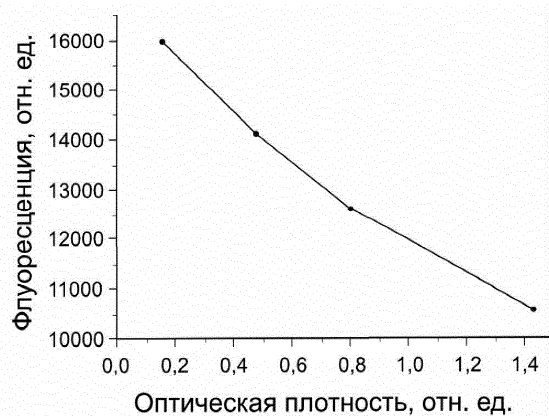
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

