

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **028556**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.11.30

(21) Номер заявки
201492106

(22) Дата подачи заявки
2013.06.14

(51) Int. Cl. **A61B 5/00** (2006.01)
A61B 5/145 (2006.01)
A61B 5/1455 (2006.01)
A61M 1/14 (2006.01)

(54) СПОСОБ И УСТРОЙСТВО ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТА

(31) **12172251.6; 61/660,016**

(32) **2012.06.15**

(33) **EP; US**

(43) **2015.05.29**

(86) **PCT/EP2013/062366**

(87) **WO 2013/186357 2013.12.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФРЕЗЕНИУС МЕДИКАЛ КЕЭ
ДОЙЧЛАНД ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Гагель Альфред, Майерхофер Андреас
(DE)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) SMUTZER ET AL.: "A fluorescent sterol probe study of human serum low-density lipoproteins", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - LIPIDS AND LIPID METABOLISM, ELSEVIER SCIENCE BV. AMSTERDAM, NL, vol. 958, no. 3, 19 February 1988 (1988-02-19), pages 323-333, XP026042418, ISSN: 0005-2760, DOI: 10.1016/0005-2760(88)90217-2 [retrieved on 1988-02-19] abstract page 325, column 2, line 47 - page 326, column 2, line 22; figure 1

SHAW ET AL.: "Resonance energy transfer and ligand binding studies on pH-induced folded states of human serum albumin", JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY, vol. 90, no. 3, 9 January 2008 (2008-01-09), pages 187-197, XP022520594, ELSEVIER SCIENCE S.A., BASEL, CH ISSN: 1011-1344, DOI: 10.1016/J.JPHOTOBIOL.2008.01.001 abstract Ch: 1-3; figures 1,2

YAMASAKI KEISHI ET AL.: "Characterization of site I of human serum albumin using spectroscopic analyses: Locational relations between regions Ib and Ic of site I", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 93, no. 12, December 2004 (2004-12), pages 3004-3012, XP002687306, ISSN: 0022-3549, page 3006, paragraph 2 - paragraph 4
US-A-5626134

(57) Изобретение относится к способу контроля экстракорпоральной обработки крови пациента, предпочтительно контроля лечения пациента диализом, гемодиализом, гемодиализацией, гемофильтрацией, и/или лечения пациента перитонеальным диализом, включающему следующие этапы, согласно которым облучают образец диализирующей текучей среды, используемый при лечении диализом с использованием линейно поляризованного облучающего света, измеряют интенсивность света флуоресценции, излучаемого диализирующей текучей средой в первой плоскости поляризации, измеряют интенсивность света флуоресценции, излучаемого диализирующей текучей средой во второй плоскости поляризации, отличной от первой плоскости поляризации, определяют анизотропию света флуоресценции, излучаемого диализирующей текучей средой, и определяют концентрацию по меньшей мере одного флуорофора в диализирующей текучей среде на основании определенного значения анизотропии и интенсивности света флуоресценции, излучаемого диализирующей текучей средой.

B1**028556****028556****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к способу и устройству для контроля экстракорпоральной обработки крови пациента, предпочтительно для контроля лечения пациента диализом, гемодиализом, гемодиализацией, гемофильтрацией и/или перитонеальным диализом.

Уровень техники

Диализ представляет собой один из широко известных и используемых экстракорпоральных способов обработки крови и предназначен для замены функции почек при почечной недостаточности пациента.

При почечной недостаточности пациента проведение диализа необходимо для удаления продуктов жизнедеятельности, таких как мочевины, креатинин и уремические токсины, из крови пациента. Кроме того, во время диализа происходит удаление из тела пациента избыточной воды и других субстанций, обычно удаляемых вместе с мочой. Гемодиализ представляет собой наиболее часто используемый способ диализа, в ходе которого кровь пациента течет вдоль диализной мембраны, причем с другой стороны этой диализной мембраны размещена диализирующая жидкость. Таким образом, кровь и диализирующая жидкость разделены пористой мембраной.

Через эту мембрану происходит диффузия субстанций, подлежащих удалению из крови пациента, вследствие концентрационного перепада между кровью и диализирующей жидкостью. Большие молекулы, скорость диффузии которых очень мала, могут также быть перенесены конвекцией посредством потока жидкости, перетекающего со стороны крови на сторону диализирующей жидкости мембраны.

Диализирующая жидкость подготовлена так, чтобы ее концентрация обеспечивала перепад концентрации от стороны крови до стороны диализирующей жидкости для определенных субстанций, но не обязательно для всех субстанций. Фактически, удаление мочевины и креатинина, а также других продуктов жизнедеятельности из человеческого тела желательно, но, например, удаление или изменение концентрации электролитов, таких как калий, натрий или бикарбонат, полагают не только нежелательным, но вредным.

В соответствии с этим диализирующая жидкость обычно содержит определенную концентрацию электролитов, близкую к концентрации электролитов в плазме крови пациента, так что для этих субстанций перепад концентрации отсутствует.

Помимо гемодиализа существует другой способ диализа, а именно перитонеальный диализ, также использующий мембрану и диализирующую жидкость для диффузии продукта жизнедеятельности через мембрану в диализирующую жидкость. Мембрана, однако, представляет собой естественную мембрану, а именно брюшину, и диализирующую жидкость вводят непосредственно в брюшную полость.

Во время диализа устранение избытка воды и уремических субстанций с малыми размерами молекул, таких как мочевины и креатинин, обычно не представляет проблемы, однако молекулы большего размера труднее удалять через пористую мембрану. Для решения этой задачи предложены специальные диализные мембраны с высокой гидравлической проницаемостью в комбинации со способами, обеспечивающими высокую степень конвекции, такими как гемодиализация. Это приводит к улучшению коэффициента очищения крови от молекул с молекулярной массой больше 1 кДа, которые попадают в диапазон так называемых молекул среднего размера. При гемодиализации диффузионный способ, использующий диализирующую жидкость в той форме, как описано выше, объединен с гемофильтрацией, при которой кровь пациента подвергают воздействию перепада давления через фильтр. В соответствии с этим процесс фильтрации вдоль перепада давления приводит к увеличенному потоку жидкости и может быть рассмотрен, таким образом, как способ с большой конвекцией, обеспечивающий возможность удаления значительной части молекул среднего размера. Однако вследствие этого перепада давления происходит удаление с высокой скоростью воды, а также электролитов и сахаров из крови пациента, так что эти составные части крови должны быть заменены посредством инфузии заменяющей текучей среды.

Использование диализных мембран с высокой гидравлической проницаемостью вместе со способами, обеспечивающими большую конвекцию, улучшает коэффициент очищения крови для молекул среднего и большого размеров. Большие молекулы обычно представляют собой протеины, причем, например, молекула бета2-микроглобулина имеет размер, приблизительно составляющий 11 кДа, и присутствие этих молекул может вызвать амилоидоз, если их не удалить должным образом. Диализ меньших молекул, которые токсичны, также может быть затруднительным при связи этих молекул с протеинами. Например, р-крезилсульфат и индоксилсульфат представляют собой уремические токсины, связанные с протеинами.

В соответствии с этим желательно, чтобы размеры пор в диализных мембранах были достаточно велики, чтобы пропускать эти молекулы среднего размера. С другой стороны, размер пор мембраны не может быть неконтролируемо увеличен, поскольку с увеличением размера пор мембраны возрастает риск потери жизненно важных компонентов крови. В соответствии с этим проницаемость мембраны обычно ограничена размерами, приблизительно равными 60 кДа. Однако это значение лишь немного больше молекулярной массы человеческого плазменного альбумина, размер которого составляет примерно 66 кДа. На практике могут иметь место клинически значительные потери альбумина, причем эти

потери в значительной степени зависят от соответствующих параметров способа, таких как соответствующие давления и соответствующие концентрации в диализирующей жидкости. В частности, мембрана с высокой гидравлической проницаемостью вместе с перепадом давления, приложенным во время гемофильтрации, увеличивает коэффициент очищения крови от человеческого альбумина. Другая причина потери человеческого альбумина может быть связана с многократным использованием мембран, поскольку очистка мембраны, которая необходима между курсами лечения, имеет тенденцию увеличения размер пор в мембране. Это смещает проницаемость мембраны в сторону больших молекул. В соответствии с этим даже при нормальных условиях в ходе обычного гемодиализа человеческий сывороточный альбумин может проникать через мембрану.

Само собой разумеется, что в случае перитонеального диализа нет возможности влияния на размеры пор мембраны, поскольку они определены состоянием брюшины соответствующего пациента. Однако перенос человеческого белка в диализирующую жидкость, тем не менее, может иметь место при ухудшении состояния брюшины, например вследствие воспаления.

В заявке № 2008/0158544 A1 на патент США описан способ Рамановской спектроскопии, предназначенный для определения коэффициента очищения крови от анализируемой субстанции во время диализа, в ходе которого Рамановские спектральные измерения выполнены на крови после ее прохождения через диализатор для использования уникальных Рамановских спектральных характеристик для одного или более определяемых при анализе компонентов, например мочевины, с целью идентификации и определения количества таких определяемых при анализе компонентов на фоне цельной крови.

Заявка WO № 2010/091826 A1 описывает устройство для экстракорпоральной обработки крови, в котором измеряют поглощение электромагнитного излучения в диализирующей жидкости для определения значения Kt/V , где K представляет собой коэффициент очищения крови для объемного потока чистых субстанций, t представляет собой время лечения и V объем локализации пациента. При заместительной почечной терапии мочевины обычно используют в качестве субстанции маркера для измерения эффективности лечения мочевой кислотой, так что K представляет собой коэффициент очищения крови от мочевой кислоты, а V представляет собой объем локализации мочи пациента, что соответствует, в принципе, содержанию воды в теле пациента. Однако коэффициент очищения крови от определенной молекулы обычно не может быть определен посредством измерения полного поглощения.

В соответствии с этим необходимо контролировать потерю человеческого альбумина во время диализной терапии с тем, чтобы предупреждать медперсонал о состоянии терапии таким образом, чтобы она могла быть отрегулирована, или даже чтобы автоматически регулировать или даже прерывать эту терапию в случае чрезмерной потери альбумина.

Кроме того, коэффициент очищения от других протеинов, таких как вышеупомянутые молекулы среднего размера (протеины с размерами меньше 66 кДа), а также субстанции с еще меньшими молекулами, такие как р-крезилсульфат, индоксилсульфат или фенил, также должен быть определен, поскольку эти субстанции являются токсичными.

Раскрытие изобретения

В соответствии с этим задача настоящего изобретения состоит в создании способа и устройства для контроля экстракорпоральной обработки крови пациента.

Эта задача настоящего изобретения решена посредством способа по п.1 формулы изобретения. Предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения могут быть взяты из зависимых пунктов формулы.

В соответствии с этим способ контроля экстракорпоральной обработки крови пациента, предпочтительно контроля лечения пациента диализом, гемодиализом, гемодиафильтрацией, гемофильтрацией и/или перитонеальным диализом, включает следующие этапы, согласно которым облучают образец текучей среды, используемый в экстракорпоральной обработке крови, линейно поляризованным облучающим светом, измеряют интенсивность света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды в первой плоскости поляризации, измеряют интенсивность света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды во второй плоскости поляризации, отличной от первой плоскости поляризации, определяют анизотропию света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды, и определяют концентрацию по меньшей мере одного флуорофора в образце текучей среды на основании определенного значения анизотропии и интенсивности света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды.

Путем определения концентраций соответствующих флуорофоров в образце текучей среды на основе измеренных значений анизотропии и интенсивности поляризованного света флуоресценции возможно различать сигналы флуоресценции нескольких флуоресцентно активных субстанций в образце текучей среды. Фактически, посредством использования значения анизотропии для определения индивидуальных концентраций индивидуальных флуорофоров в образце текучей среды обеспечена возможность определения индивидуальной концентрации соответствующего флуорофора в образце текучей среды, поскольку значение анизотропии различно для каждого флуорофора. Текучая среда, используемая при экстракорпоральной обработке крови, может быть диализирующей текучей средой в случае терапии пациента методами диализа, гемодиализа, гемодиафильтрации и/или перитонеального диализа или ультрафильтратом в случае терапии пациента методом гемофильтрации.

Посредством использования этой разновидности флуоресцентной спектроскопии характеристики, например, конвективной диализной терапии могут быть определены онлайн во время лечения. Характеристики могут быть определены, например, посредством анализа содержания диализирующей текучей среды. Если коэффициент очищения крови от определенных молекул ниже определенного предельного значения или если субстанции, такие как человеческий альбумин, удалены из плазмы пациента в недопустимых количествах, процесс лечения может быть автоматически отрегулирован устройством для лечения и/или сигнал тревоги может быть выпущен.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения первая плоскость поляризации и вторая плоскость поляризации ориентированы перпендикулярно друг другу, а анизотропию A определяют из следующего уравнения:

$$A = \frac{I_{vv} - G * I_{vh}}{I_{vv} + 2 * G * I_{vh}}$$

где I_{vv} представляет собой интенсивность измеренного света флуоресценции в вертикальной плоскости поляризации,

I_{vh} представляет собой интенсивность измеренного света флуоресценции в горизонтальной плоскости поляризации, а

G представляет собой постоянную устройства, компенсирующую разности чувствительностей устройства при измерении интенсивностей в первой и второй плоскостях поляризации.

Значение анизотропии может быть использовано для точного определения флуорофора, поскольку различные флуорофоры дают различные значения анизотропии.

Еще в одном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения интенсивность света флуоресценции измеряют на предварительно определенной длине волны измерения при освещении образца на предварительно определенной длине волны облучения, значение анизотропии используют для определения индивидуального флуорофора, а интенсивность света флуоресценции используют для определения концентрации этого индивидуального флуорофора, причем предпочтительно, чтобы значения анизотропии для конкретных индивидуальных флуорофоров были известны.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения значения концентрации по меньшей мере двух флуорофоров, присутствующих в образце текучей среды, определяют на основе следующего уравнения для общей анизотропии A_{ges} суммированных спектров

$$A_{ges} = \sum_i f_i * A_i \quad A_{total} = \sum_i f_i * A_i$$

где

$$f_i = \frac{S_i}{S_{ges}} = \frac{I_{vv,i} + 2 * G * I_{vh,i}}{I_{vv,ges} + 2 * G * I_{vh,ges}}$$

$$f_i = \frac{S_i}{S_{total}} = \frac{I_{vv,i} + 2 * G * I_{vh,i}}{I_{vv,total} + 2 * G * I_{vh,total}}$$

и

A_{ges} представляет собой общую анизотропию суммированных спектров,

A_i представляет собой анизотропию i -го флуорофора,

f_i представляет собой долю интенсивности i -го флуорофора относительно общей интенсивности,

S_i представляет собой общую интенсивность физического излучения i -го флуорофора,

S_{ges} представляет собой общую интенсивность физического излучения всех флуорофоров,

$I_{vh,i}$ представляет собой измеренную горизонтальную интенсивность флуоресценции i -го флуорофора,

$I_{vv,i}$ представляет собой измеренную вертикальную интенсивность флуоресценции i -го флуорофора, и

i представляет собой индекс по всем флуорофорам, причем предпочтительно, чтобы значение анизотропии A_i для i -го флуорофора было известно.

На этом основании обеспечена возможность определения концентрации по меньшей мере двух флуорофоров в образце текучей среды на основе измеренного света флуоресценции. Другими словами, обеспечена возможность проведения различия между различными индивидуальными флуорофорами в образце текучей среды, например в диализирующей текучей среде или в ультрафильтрате.

Кроме того, в предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения образец текучей среды облучают непрерывно, и измерения выполняют непрерывно. При таком подходе могут быть легко наблюдаемы изменения концентраций в различных образцах текучей среды. Совершенно понятно, что термин "непрерывно" включает короткие задержки процесса измерения во время экстракорпоральной обработки крови пациента, например во время этапов установки или регулирования экстракорпорального устройства обработки крови. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения концентрацию флуорофора непосредственно определяют на основании общей анизотропии, причем предпочтительно, чтобы концентрация альбумина была определена на основе общей анизотропии. Это, в частности, полезно при значительном вкладе флуорофора в общую анизотропию. В предпочтительном ва-

рианте реализации настоящего изобретения концентрацию флуорофора, предпочтительно концентрацию человеческого альбумина, определяют непосредственно на основании вертикальных и горизонтальных интенсивностей измеренного флуоресцентного света. Это опять особенно удобно при значительности вклада флуорофора в общую анизотропию диализирующей текучей среды. На основании этого способа очень легко выполнить определение концентрации.

Еще в одном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения образец текучей среды облучают импульсным и линейно поляризованным облучающим светом, а измерение света флуоресценции в первой и второй плоскостях поляризации выполняют с временным разрешением, а анизотропию определяют следующим образом:

$$A = A_0 * e^{-t/\theta}$$

где θ представляет собой время корреляции поворота, которое представляет собой характерную постоянную времени, описывающую период времени, в течение которого оси дипольных моментов переходов ориентированы диффузно за счет поворота молекул, а

A_0 представляет собой анизотропию в момент времени $t=0$ до применения эффектов деполяризации.

Время θ корреляции поворота для анизотропии может быть использовано для определения субстанции флуорофора, поскольку каждый флуорофор обладает различным временем θ корреляции поворота.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения время θ корреляции поворота изменяют путем изменения температуры образца текучей среды, изменения вязкости образца текучей среды и/или приложения внешних магнитных и/или электрических полей, чтобы дополнительно идентифицировать флуорофор на основании поведения времени θ корреляции поворота.

Еще в одном предпочтительном способе общую интенсивность флуоресценции увеличивают выравниванием дипольных моментов переходов образца путем приложения внешних электрических и/или магнитных полей. Приложение внешних полей содействует увеличению величины измеренных интенсивностей и, таким образом, улучшает отношение сигнал/шум.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения выполняют матричное разложение измеренного спектра анизотропии и сравнение с известными спектрами анизотропии известных субстанций для определения на основании соответствующих интенсивностей известных субстанций их соответствующих концентраций. На этой основе становится возможным проанализировать даже сложные суперпозиции спектров флуоресценции относительно фактического состава образца жидкости.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения следует выполнить контрольное измерение на свежей диализирующей текучей среде при лечении пациента способом диализа, гемодиализа, гемодильтрации и/или перитонеального диализа таким образом, чтобы эту текучую среду можно было удалить. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения способ использует следующие этапы, согласно которым облучают образец свежей диализирующей текучей среды, который должен быть использован при экстракорпоральной обработке крови линейно поляризованным облучающим светом, измеряют интенсивность света флуоресценции, излучаемого образцом свежей диализирующей текучей среды в первой плоскости поляризации, измеряют интенсивность света флуоресценции, излучаемого образцом свежей диализирующей текучей среды во второй плоскости поляризации, отличной от первой плоскости поляризации, определяют анизотропию света флуоресценции, излучаемого образцом свежей диализирующей текучей среды, и определяют концентрацию по меньшей мере одного флуорофора в образце свежей диализирующей текучей среды на основании определенного значения анизотропии и интенсивности света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды.

В другом предпочтительном способе концентрацию человеческого альбумина в образце определяют на основании результата вычитания измеренного значения вертикальной интенсивности из измеренного значения горизонтальной интенсивности.

Вышеупомянутая задача настоящего изобретения также решена посредством устройства с особенностями по п.15 формулы изобретения. Предпочтительные варианты реализации изобретения могут быть взяты из зависимых пунктов.

В соответствии с этим устройство для контроля экстракорпоральной обработки крови пациента, предпочтительно для контроля лечения пациента диализом, гемодиализом, гемодильтрацией, гемодильтрацией и/или перитонеальным диализом, содержит источник облучающего света, предназначенный для облучения образца текучей среды, используемого при экстракорпоральной обработке крови линейно поляризованным облучающим светом, и датчик для измерения интенсивности света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды в первой плоскости поляризации и во второй плоскости поляризации, которая отлична от первой плоскости поляризации, причем присутствует блок анализа для определения анизотропии света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды, и определения концентрации по меньшей мере одного флуорофора в образце текучей среды на основании определенного значения анизотропии и интенсивности света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения по меньшей мере два поляризатора с плоскостями поляризации, выравненными под углом друг к другу, выполнены между образцом

текучей среды и датчиком для измерения интенсивности света флуоресценции, причем подвижный затвор размещен в световом пути для поочередного перекрытия одного из этих двух поляризаторов для поочередного измерения интенсивности света флуоресценции в этих двух плоскостях поляризации. При наличии этих двух поляризаторов может быть выполнена установка, избегающая перемещение оптических частей и, таким образом, обеспечивающая возможность проведения надежных измерений.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения поворотный затвор может быть размещен в световом пути пропущенного света от источника света через образец текущей среды таким образом, что обеспечена возможность измерения интенсивности пропущенного света, а также интенсивностей света флуоресценции по меньшей мере в двух различных плоскостях поляризации посредством одного датчика.

Кроме того, в качестве альтернативы первый датчик с соответствующим поляризатором с первой плоскостью поляризации и второй датчик со второй плоскостью поляризации, отличной от первой плоскости поляризации, размещены на противоположных сторонах образца текущей среды для одновременного измерения света флуоресценции в первой и второй плоскостях поляризации.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения третий датчик размещен коллинеарно с облучающим светом и таким образом, что образец текущей среды расположен между датчиком и источником облучающего света для измерения интенсивности пропущенного света. Предпочтительно, чтобы устройство было выполнено с возможностью выполнения описанного выше способа.

Краткое описание чертежей

Настоящее раскрытие изобретения будет легче оценено при ссылке на последующее подробное описание, рассматриваемое в связи с прилагаемыми чертежами, на которых

на фиг. 1 схематически показана диаграмма дипольных моментов молекулы, а также переходный дипольный момент молекулы;

на фиг. 2 схематически показана экспериментальная установка для определения анизотропии флуорофоров в используемом диализате;

на фиг. 3 схематически показаны диаграммы спектров анизотропии различных молекул, в частности человеческого альбумина и триптофана;

на фиг. 4 показано схематическое расположение устройства для выполнения предложенного способа;

на фиг. 5 схематически показана диаграмма, отражающая концентрацию человеческого альбумина как функцию измеренного значения интенсивности всего поляризованного света флуоресценции;

фиг. 6 представляет собой схематическую диаграмму, показывающую константы времени корреляции для протеинов различной молекулярной массы;

фиг. 7 представляет собой схематическое представление экспериментальной установки для измерения анизотропии в ультрафиолетовом свете, причем интенсивность поляризованного света измерена в горизонтальной плоскости;

фиг. 8 соответствует схематическому представлению по фиг. 7, но при использовании другого поляризатора, так что интенсивность поляризованного света измерена в вертикальной плоскости;

на фиг. 9 показана альтернативная композиция экспериментальной установки для измерения анизотропии в ультрафиолетовом диапазоне;

на фиг. 10 показано еще одна альтернативная композиция экспериментальной установки для измерения анизотропии в ультрафиолетовом диапазоне.

Подробное описание предпочтительных вариантов реализации изобретения

Ниже настоящее изобретение будет объяснено более подробно со ссылками на сопровождающие чертежи. На чертежах одинаковые элементы обозначены идентичными ссылочными обозначениями и повторное их описание может быть опущено для устранения избыточности.

Задача настоящего изобретения состоит в контроле коэффициента очистки крови от определенных молекул при экстракорпоральной обработке крови и одновременно в обеспечении того, чтобы не происходило удаления в чрезмерных количествах важных молекул, такие как человеческий альбумин.

Ниже способ объяснен на основе лечения диализом. Однако изобретение не предназначено для ограничения только лечением диализом, но скорее предназначено для использования во всех других разновидностях экстракорпоральной очистки крови, например для контроля лечения пациента диализом, гемодиализом, гемодиализацией, гемофильтрацией, гемофильтрацией и/или перитонеальным диализом.

Для решения этой задача должна быть индивидуально измерена концентрация альбумина, а также концентрации фракции так называемых молекул среднего размера, а именно протеинов с размером, меньшим 66 кДа. Кроме того, в используемом диализате присутствуют дополнительные субстанции с малым размером молекул, такие как индоксисульфат, р-крезол и фенол, которые также активны в отношении флуоресценции.

К сожалению, спектры излучения отдельных флуорофоров, представляющих интерес для патологического анализа, широко перекрывают друг друга на конкретной длине волны облучающего излучения и также присутствуют в идентичных ультрафиолетовых диапазонах. В дополнение к этому недостатку спектры флуоресценции упомянутых выше молекул относительно широки и, таким образом, операция

свертки измеренных спектров затруднительна или может выполнена только с большими ошибками измерения. В соответствии с этим при использовании обычной спектроскопии флуоресценции нет возможности определения точного значения концентрации или точной пропорции отдельной субстанции в диализирующей текучей среде и, таким образом, нет возможности надежного количественного определения концентраций.

При использовании, как предложено в настоящем изобретении, значения анизотропии это затруднение может быть преодолено. Связанный с этим эффект называют фотоселекцией, в соответствии с которой излучаемый образцом свет флуоресценции показывает анизотропию излучаемого света флуоресценции после возбуждения образца линейно поляризованным светом.

Обычно при поглощении фотона с участием электрона атомом или молекулой электрон переходит на более высокую атомную или молекулярную орбиту. Вследствие этого изменения электронной структуры новое пространственное распределение зарядов возникает таким образом, что обычно происходит изменение электронного дипольного момента поглощающего атома или молекулы.

Дипольный момент перехода определен моментом электрического диполя, связанным с переходом между основным состоянием и возбужденным состоянием соответствующего атома или молекулы. Направление вектора дипольного момента перехода соответствует плоскости поляризации перехода, которая определяет, как молекула будет взаимодействовать с электромагнитной волной заданной поляризации. Квадрат величины дипольного момента перехода описывает интенсивность взаимодействия на основании распределения зарядов внутри молекулы.

Фиг. 1 показывает в упрощенном представлении дипольный момент $\mu_{a \rightarrow g}$ перехода, когда происходит возбуждение соответствующей молекулы с переходом от электронного дипольного момента μ_g основного состояния к дипольному моменту μ_a возбужденного состояния посредством возбуждения молекулы полем вектором $\mu_{g \rightarrow a}$ энергии возбуждения. Кроме того, показано, что возврат молекулы в исходное состояние обычно происходит посредством внутренних процессов (так называемого внутреннего преобразования, которое обычно происходит вследствие колебательных процессов в молекуле), пока она не перейдет из возбужденного состояния в основное состояние посредством дипольного момента $\mu_{a \rightarrow g}$ перехода. Вследствие внутренних релаксационных процессов вектор дипольного момента $\mu_{a \rightarrow g}$ перехода обычно повернут на угол α относительно вектора $\mu_{g \rightarrow a}$ возбуждения.

Дипольный момент перехода определен структурой каждой молекулы и перемещается вместе с молекулой, но относительная ориентация относительно молекулы неизменна.

Как может быть легко понято, вероятность поглощения максимальна при совпадении ориентации электромагнитной волны данной поляризации, или точнее, ее полевого вектора с дипольным моментом $\mu_{a \rightarrow g}$ перехода. В соответствии с этим при использовании линейно поляризованного света для возбуждения молекулы в образце диализирующей текучей среды вероятность возбуждения молекулы посредством линейно поляризованного света максимальна для молекул, которые случайным образом выполняют требования коллинеарности. Этот процесс называют фотоселекцией, поскольку происходит возбуждение тех молекул, которые случайным образом ориентированы в определенном пространственном отношении относительно плоскости поляризации облучающего света.

Кроме того, ориентация дипольного момента $\mu_{a \rightarrow g}$ перехода определяет поляризацию излучаемого света флуоресценции, когда переход из возбужденного состояния в основное состояние выполнен посредством излучения фотона (конечно, переход в основное состояние без излучения фотонов также возможен, например, посредством излучения фонона). Распространение дипольного излучения происходит симметрично к оси дипольного момента, причем интенсивность максимальна в направлении, перпендикулярном к оси диполя, и обращается в нуль в направлении, параллельном к оси диполя.

В соответствии с этим излучаемый свет флуоресценции поляризован и анизотропен.

На фиг. 2 схематично показано устройство для измерения возбуждающего света, а также излучаемого света. Возбуждающий свет излучен источником света L и поляризован в первом поляризаторе таким образом, что вектор электрического поля перпендикулярен плоскости, в которой расположены возбуждающие и излучаемые лучи.

На стороне датчика D размещен второй поляризатор, способный выполнять поворот и размещенный таким образом, что только излучаемый свет флуоресценции проходит через него. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения направление возбуждающего света и направление, в котором датчик D размещен относительно образца, перпендикулярны друг другу, что предотвращает падение возбуждающего света на датчик.

Посредством поворота второго поляризатора интенсивность I_{vv} (вертикальная интенсивность) и интенсивность I_{vh} (горизонтальная интенсивность) могут быть измерены датчиком D. Разность интенсивностей ($I_{vv} - I_{vh}$) представляет собой меру поляризации света, полученного в датчике D. Поляризация P, а также анизотропия A могут быть определены следующим образом:

$$P = \frac{I_{vv} - G * I_{vh}}{I_{vv} + G * I_{vh}} \quad (1)$$

$$A = \frac{I_{vv} - G * I_{vh}}{I_{vv} + 2 * G * I_{vh}} \quad (2)$$

Здесь I_{vh} представляет собой измеренную интенсивность света флуоресценции, когда второй поляризатор повернут таким образом, что способен пропускать только горизонтально поляризованный свет. I_{vv} представляет собой измеренную интенсивность света флуоресценции, когда поляризатор для излученного света повернут таким образом, что способен пропускать только вертикально поляризованный свет. Величина G представляет собой постоянную устройства, компенсирующую потенциальные разности чувствительностей системы измерения устройства в горизонтальной и вертикальной плоскостях. Величина G должна быть определена экспериментально и может быть занесена в программное обеспечение системы как константа. Константа G может также быть измерена онлайн посредством измерения интенсивности света, проходящего через поляризатор при горизонтальной поляризации и использовании горизонтально поляризованного возбуждающего света, и посредством измерения интенсивности системы при вертикальной поляризации, когда использован вертикально поляризованный возбуждающий свет. Константа устройства тогда определена как $G = I_{hv}/I_{hh}$. Величина $(I_{vv} + 2GI_{vh})$ представляет собой среднюю интенсивность излучения, если общая мощность излучения испущена изотропно по общему телесному углу $\Omega = 4\pi$.

Как может быть видно из уравнений (1) и (2), поляризация P и анизотропия A могут быть легко взаимозаменяемыми.

Диапазон значений анизотропии составляет $0,2 \leq A_0 \leq 0,4$. Максимальное значение 0,4 соответствует коллинеарной ориентации дипольных моментов поглощения и излучения в отсутствие любых других деполяризующих факторов. Другими словами это соответствует значению $\alpha = 0^\circ$. Однако в действительности дипольные моменты поглощения и дипольные моменты излучения обычно не коллинеарны, но составляют некоторый угол α друг относительно друга. Измеренная анизотропия тогда равна

$$A_0 = \frac{3 * \cos^2 \alpha - 1}{5} \quad (3)$$

При $\alpha = 0^\circ$, то есть при коллинеарной ориентации дипольного момента поглощения и дипольного момента излучения $A_0 = 0,4$, а при $\alpha = 90^\circ$ значение $A_0 = -0,2$. Под так называемым магическим углом $\alpha = 54,7^\circ$ не может наблюдаться никакой анизотропии.

Поскольку ориентация дипольного момента перехода изменяется в зависимости от полос поглощения, угол α и вместе с ним анизотропия A_0 также зависят от длины волны λ_{exc} возбуждения, а также от длины волны λ_{em} излучения. Функция анизотропии $A_0(\lambda_{exc}, \lambda_{em})$ специфична для каждого флуорофора, как очень схематично показано на фиг. 3.

В частности на фиг. 3 на верхней диаграмме приведены спектры анизотропии человеческого альбумина, бычьего альбумина и чистого альбумина на длине волны возбуждения $\lambda_{exc} = 275$ нм. Можно ясно видеть, что значения анизотропии расположены между 0,2 и 0,1 для различных длин волн излучения λ_{em} между 290 и 400 нм.

В нижней диаграмме на фиг. 3 показаны спектры анизотропии человеческого альбумина (66,5 кДа), аминокислоты триптофан (204 Да), смеси обеих субстанций, а также сульфата индоксила. Здесь снова можно ясно видеть, что функция анизотропии $A_0(\lambda_{exc}, \lambda_{em})$ специфична для каждого флуорофора.

Кроме того, функция анизотропии $A_0(\lambda_{exc}, \lambda_{em})$ зависит от внешних факторов, таких как температура и вязкость среды, а также от прикрепления соответствующего флуорофора к другим средам. Это может также быть замечено при анализе нижней диаграммы на фиг. 3, где функция анизотропии триптофана значительно отлична от такой функции для смеси триптофана и человеческого альбумина.

Важное соображение относительно анализа используемых диализатов состоит в том, что только большие молекулы показывают значительные значения анизотропии вследствие их относительно большой временной константы θ корреляции поворота, как будет описано далее ниже. Эти субстанции в используемом диализате обычно представляют собой протеины, причем альбумин представляет собой важного представителя этой разновидности. Флуорофоры с меньшими размерами молекул обычно дают лишь изотропно распределенные интенсивности в поляризованных интенсивностях I_{vv} и I_{vh} . Их конкретные значения анизотропии, следовательно, равны $A_i = 0$. Следовательно, на основании этого заключения доля интенсивности альбумина может быть определена на основании общих значений анизотропии A_{ges} при условии, что другие флуорофоры, которые, как ожидают, будут присутствовать в диализирующей текучей среде, обеспечивают лишь изотропные распределения.

На фиг. 4 схематично показана установка для измерения, которая может быть использована в сочетании с настоящим методом. В частности, имеет место источник L света, коллимированного и сфокусированного посредством линзы, а возбуждающий свет поляризован посредством поляризатора P_{exc} . Поляризованный, коллимированный и сфокусированный возбуждающий свет затем направляют в кювету C и измеряют посредством фотодиода D для регулировки с целью изменения интенсивностей источника L света.

Свет флуоресценции, излучаемый флуорофорами в кювете C , выходит под некоторым углом таким

образом, что излучаемый свет от источника L света не интерферирует со светом флуоресценции. Свет флуоресценции проходит через второй поляризатор P_{em} , ориентация которого может быть отрегулирована. Затем поляризованный свет флуоресценции падает на дифракционную решетку и отражается на датчик на основе прибора с зарядовой связью таким образом, что полный спектр света флуоресценции может быть проанализирован в блоке А анализа. Результаты могут быть выведены на дисплей.

Поскольку используемый диализат, расположенный вниз по течению от устройства для диализа, обычно содержит больше одного флуорофора, его спектры поглощения и излучения, как предполагают, наложены один на другой.

В соответствии с этим общая анизотропия A_{ges} для суммированного спектров равна

$$\begin{aligned} A_{total} &= \sum_i f_i * A_i \\ A_{ges} &= \sum_i f_i * A_i \end{aligned} \quad (4)$$

где

$$\begin{aligned} f_i &= \frac{S_i}{S_{total}} = \frac{I_{vv,i} + 2 * G * I_{vh,i}}{I_{vv,total} + 2 * G * I_{vh,total}} \\ f_i &= \frac{S_i}{S_{ges}} = \frac{I_{vv,i} + 2 * G * I_{vh,i}}{I_{vv,ges} + 2 * G * I_{vh,ges}} \end{aligned} \quad (5)$$

A_{ges} представляет собой анизотропию для суммированного спектра,

A_i представляет собой анизотропию i-го флуорофора,

f_i представляет собой фракцию интенсивности i-го флуорофора относительно общей интенсивности,

S_i представляет собой общую интенсивность физического излучения i-го флуорофора,

S_{ges} представляет собой общую физическую интенсивность излучения всех флуорофоров,

$I_{vh,i}$ представляет собой измеренную горизонтальную интенсивность флуоресценции i-го флуорофора,

$I_{vv,i}$ представляет собой измеренную вертикальную интенсивность флуоресценции i-го флуорофора

и i представляет собой индекс по всем флуорофорам.

Общая физическая интенсивность S_i физического излучения флуорофора при его достаточном разбавлении пропорциональна его концентрации C_i . Анизотропии A_i i-х флуорофоров, как предположено, представляют собой известные константы. Доли f_i интенсивности должны быть определены на основании суммированного спектра.

Как было упомянуто выше, только большие молекулы обеспечивают значительную долю анизотропии. В соответствии с этим на основании приведенного выше уравнения (4) доля интенсивности альбумина f_{alb} может быть вычислена на основании измеренной общей анизотропии A_{ges} , даже если доля флуоресценции альбумина не может быть непосредственно определена на основании суммированного спектра

$$f_{Alb} = \frac{A_{ges}}{A_{Alb}} \quad (6)$$

$$f_{Alb} = \frac{A_{total}}{A_{Alb}}$$

На этом основании общая физическая интенсивность излучения альбумина задана на основании уравнения (5) следующим образом:

$$\begin{aligned} S_{Alb} &= f_{Alb} * S_{total} = \frac{A_{total} * S_{total}}{A_{Alb}} \\ S_{Alb} &= f_{Alb} * S_{ges} = \frac{A_{ges} * S_{ges}}{A_{Alb}} \end{aligned} \quad (7)$$

На этом основании концентрация альбумина может быть определена следующим образом:

$$C_{Alb} = \frac{1}{S} * \frac{g(\lambda)}{I_{exc,0}} * S_{Alb} \quad (8)$$

где

$$g(\lambda) = \frac{10 * \epsilon * \lambda_{em}^4}{\pi^2 * c * \Phi_e * \alpha(\lambda_{exc}) * L * p^2} \quad (9)$$

где $I_{exc,0}$ представляет собой интенсивность поляризованного облучающего света,

ϵ представляет собой постоянную электрического поля,

λ представляет собой пару длин волн (облучения λ_{exc} , излучения λ_{em}),

с представляет собой скорость света,
 Φ_e представляет собой квантовую эффективность,
 $\alpha(\lambda_{exc})$ представляет собой коэффициент поглощения на длине волны облучения λ_{exc} ,
 L представляет собой длину пути через кювету и p представляет собой электрический дипольный момент возбужденного флуорофора.

Возбуждающая интенсивность $I_{exc,0}$ может претерпевать изменение со временем, причем предпочтительно, чтобы ее измерение проводили онлайн с возможностью коррекции. Функция $g(\lambda)$ может также быть рассмотрена как функция калибровки, которую определяют экспериментально на основании чистого альбумина или других контрольных растворов. Функция $g(\lambda)$ может, например, быть определена изготовителем соответствующего устройства.

Отдельно отметим, что интенсивность $I_{H_2O,0}$ стоксовых линий спектра воды может быть также определена таким образом, что при работе устройства может быть измерена фактическая интенсивность I_{H_2O} , а функция калибровки $g(\lambda)$ может быть отрегулирована в соответствии с реальным состоянием устройства

$$g(\lambda) = g_0(\lambda) * I_{H_2O} / I_{H_2O,0}$$

На этом основании экономически эффективные кюветы с относительно большими механическими допусками могут быть использованы для определения концентрации флуорофоров.

При перекрытии поляризованных компонент S_x и S_z излучения изотропным излучением других флуорофоров, в частности изотропным излучением молекул меньших размеров, которые имеют, как было описано выше, только ограниченное (если вообще имеют) влияние на анизотропию измеренных интенсивностей излучения, эти изотропные компоненты дают одинаковый сдвиг S_{offset} для обоих поляризованных компонент S_x и S_z излучения

$$S_{x,ges} = S_{x,Alb} + S_{offset} \quad (10a)$$

$$S_{z,ges} = S_{z,Alb} + S_{offset} \quad (10b)$$

$$S_{x,total} = S_{x,Alb} + S_{offset} \quad S_{z,total} = S_{z,Alb} + S_{offset}$$

В соответствии с этим интенсивность излучения альбумина может быть легко определена посредством простого вычитания (в предположении, что только человеческий альбумин показывает значительную анизотропию)

$$\Delta S_{Alb} = S_{z,Alb} - S_{x,Alb} = S_{z,ges} - S_{x,ges} = I_{vv,ges} - G * I_{vh,ges} \quad (11)$$

$$\Delta S_{ges} = 3 * \frac{I_{exc,0}}{g(\lambda)} * C_{Alb} - \frac{I_{exc,0}}{g(\lambda)} * C_{Alb} = 2 * \frac{I_{exc,0}}{g(\lambda)} * C_{Alb}$$

$$C_{Alb} = \frac{1}{2} * g(\lambda) * \frac{I_{vv,ges} - G * I_{vh,ges}}{I_{exc,0}} \quad (12)$$

где $I_{vh,i}$ представляет собой измеренную общую горизонтальную интенсивность флуоресценции, а $I_{vv,i}$ представляет собой измеренную общую вертикальную интенсивность флуоресценции.

Фиг. 5 показывает в виде схематической диаграммы концентрацию человеческого сывороточного альбумина (HSA) в зависимости от измеренного значения интенсивности общего поляризованного излучения флуоресценции для различных смесей человеческого сывороточного альбумина и свободного триптофана.

Различные флуорофоры можно различать в связи с размерами их молекул. В этом отношении интерес представляют следующие соображения:

Поглощение возбуждающего фотона длится только примерно 10^{-15} с. Посредством релаксации с колебаниями молекулы, другими словами, посредством внутреннего преобразования, возбужденное состояние S_1 релаксирует очень быстро, обычно в течение 10^{-12} с, к энергетически самому нижнему из возможных колебательных уровней, поскольку время жизни флуоресценции находится в диапазоне $\tau=10^{-8}$ с и, таким образом, существенно дольше.

Из этого энергетически самого нижнего колебательного уровня возбужденный электрон релаксирует в основное состояние S_0 или путем излучения фотона или посредством излучательного перехода. Оба процесса уменьшают населенность возбужденного состояния S_1 . В соответствии с этим при возбуждении образца посредством короткого импульса возбуждения интенсивность флуоресценции I показывает следующую функцию затухания:

$$I = I_0 * e^{-t/\tau} \quad (13)$$

где τ представляет собой время жизни возбужденного состояния.

Что касается анизотропии A , то другой механизм дает вклад в деполаризацию интенсивности, поскольку молекулы выполняют поворот вокруг своих осей, которые связаны с направлением излучения.

Непосредственно после импульса возбуждения все молекулы синхронизированы, но после этого импульса все молекулы диффундируют во время характерного отрезка времени, называемого временем θ корреляции поворота. Свободный поворот сферических молекул описывают уравнением Перрена

$$A = A_0 * e^{-t/\theta} \quad (14)$$

где θ представляет собой время корреляции поворота, то есть характерную постоянную времени, описывающую период времени, в течение которого происходит диффузная ориентация осей дипольных моментов вследствие поворота молекул, и

A_0 представляет собой значение анизотропии в момент времени $t=0$ до появления каких-либо эффектов деполяризации.

При импульсном возбуждении затухание анизотропии согласно уравнению (14) может быть наблюдаемо с разрешением по времени. На этом основании время θ корреляции поворота (или посредством суперпозиции более чем одного сигнала флуоресценции времена корреляции поворотов θ_i индивидуальных флуорофоров) может быть определено, причем время θ корреляции поворота специфично для каждого флуорофора. В соответствии с этим определенное время θ корреляции поворота показательно для отдельных флуорофоров.

При непрерывном облучении образца может быть определено следующее значение A_m анизотропии:

$$\int_0^{\infty} A_m * e^{-t/\tau} * dt = \int_0^{\infty} A_0 * e^{-t/\theta} * e^{-t/\tau} * dt$$

$$A_m * \int_0^{\infty} e^{-t/\tau} * dt = A_0 * \int_0^{\infty} e^{-t*(1/\theta + 1/\tau)} dt$$

$$A_m * \tau = A_0 * \frac{1}{\frac{1}{\theta} + \frac{1}{\tau}}$$

$$\frac{A_m}{A_0} = \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\theta}} \quad (15)$$

Для вычисления константы времени θ корреляции для сферических молекул чаще используют следующую корреляцию:

$$\theta = \frac{\eta * M}{R * T} * (\bar{v} + h) \quad (16)$$

где η представляет собой вязкость растворителя при температуре T [Па·с],

M представляет собой молярную массу молекулы [г/моль],

R представляет собой общую газовую постоянную [8,314 Дж/моль·К],

T представляет собой температуру [К],

\bar{v} представляет собой удельный объем молекулы [мл/г] (например, для протеинов 0,73 мл/г), и

h представляет собой объем гидратации [мл/г] (например для протеинов 0,32 мл/г).

Для меньших молекул в менее вязких растворителях (например, в воде или в плазме) угасание анизотропии проходит очень быстро, тогда как для больших молекул, например для протеинов, значение анизотропии может быть удержано в течение относительно длинного промежутка времени и может даже превосходить время τ жизни флуоресценции.

На фиг. 6 показаны результаты различных измерений для различных протеинов с различной молекулярной массой, например для альбумина (66 кДа) и более легких протеинов, таких как, например, $\beta 2m$ (11,7 кДа), и даже для меньших молекул, таких, как, например, свободный триптофан (< 0,5 кДа), которые можно различить посредством константы времени θ корреляции.

Согласно уравнению (15) средняя анизотропия A_m зависит от константы времени θ корреляции и, таким образом, от молекулярной массы M , как можно видеть из уравнения (16).

При использовании более низких температур, например, путем охлаждения образца, или при повышении вязкости путем, например, выработки геля или замораживания, время жизни анизотропии может быть продлено.

Ориентации осей молекул, которые обычно статистически равномерно распределены в пространстве, могут быть установлены по одной линии путем приложения внешнего электрического или магнитного поля, которые воздействуют на их соответствующие электрические или магнитные дипольные моменты. При использовании такого подхода возбуждение в оптимально ориентированной плоскости поляри-

зации может быть увеличено таким образом, что интенсивность сигнала в ходе процесса может быть улучшена. Кроме того, свободному вращению молекул можно препятствовать таким образом, чтобы время жизни анизотропии было продлено.

При таком подходе может быть достигнуто ясное различие между молекулами.

Например, для молекул свободного триптофана время жизни флуоресценции равно $\tau=3$ нс, а константа времени корреляции равна $\theta=50$ пикосекунд, так что $A_m/A_0=1,6\%$. Однако для молекул триптофана, связанных с человеческим альбумином, время жизни флуоресценции равно $\tau=8$ нс, а константа времени корреляции равна $\theta=41$ нс, так что $A_m/A_0=83,7\%$.

В используемом диализате спектр анизотропии содержит, в целом, суперпозицию долей интенсивности для различных субстанций с молекулами среднего размера и даже для других флуорофоров. На основании этого измеренного полного спектра доли анизотропии индивидуальных субстанций должны быть вычислены для определения индивидуальных концентраций индивидуальных субстанций.

В рамках последующего способа измеренный спектр $f(\lambda)$ рассмотрен как линейная суперпозиция спектров N различных флуорофоров

$$f(\lambda) = \sum_{i=1}^N c_i s_i(\lambda)$$

Здесь C_i представляет собой концентрацию i -го флуорофора, а $S_i(\lambda)$ представляет собой чувствительность.

При измерении спектра на M различных парах длин волны λ_i ($\lambda_{i,exc}$, $\lambda_{i,em}$) получается система уравнений, состоящая из m уравнений с n неизвестными

$$\begin{pmatrix} f(\lambda_1) \\ f(\lambda_2) \\ \vdots \\ f(\lambda_M) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} s_1(\lambda_1) & s_2(\lambda_1) & \cdots & s_N(\lambda_1) \\ s_1(\lambda_2) & s_2(\lambda_2) & \cdots & s_N(\lambda_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ s_1(\lambda_M) & s_2(\lambda_M) & \cdots & s_N(\lambda_M) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \\ \vdots \\ c_N \end{pmatrix}$$

При самом практичном подходе решение вышеупомянутой системы уравнений может быть получено методом наименьших квадратов

$$S = \sum_{i=1}^M \left(f(\lambda_i) - \sum_{j=1}^N s_j(\lambda_i) c_j \right)^2$$

В соответствии с этим концентрации c_i представляет собой коэффициенты линейной системы уравнений, причем k -я концентрация c_k может быть вычислена посредством детерминанта $\det()$ следующим образом:

$$c_k = \frac{\det(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_{k-1}, \vec{y}, \vec{x}_{k+1}, \dots, \vec{x}_N)}{\det(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N)}$$

На фиг. 7 и 8 показаны примеры размещения устройства измерения для реализации способа. Использован ультрафиолетовый источник 1 облучающего света, используемый для выработки возбуждающего света.

Ультрафиолетовый источник 1 облучающего света может быть выполнен в виде светодиода с узкой направленностью излучения, в виде лазера или также в виде источника света с широкой направленностью излучения, например ртутной, ксеноновой или дейтериевой лампы, которая могла бы быть использована вместе с монохроматором или любым другим оптическим полосовым фильтром, например с фильтром Фабри-Перро.

Возбуждающий свет, излучаемый источником 1 света, сфокусирован фокусирующим зеркалом 2. Фокусирующее зеркало 2 предназначено для фокусировки и/или коллимирования света от ультрафиолетового источника 1 света. Сфокусированный и/или коллимированный свет затем пропускают через поляризатор 3, который наиболее предпочтительно выполнен в виде фиксированного поляризатора. Фиксированный поляризатор предназначен для поляризации света в вертикальном направлении (I_v). Вертикально поляризованный свет затем пропускают через кювету 4, в которой течет диализирующая текучая среда в виде используемого диализата.

Константа $G(\lambda)$ устройства может быть определена производителем путем поворота поляризатора 3 вручную на 90° таким образом, что интенсивности для вертикальной поляризации и горизонтальной поляризации могут быть достоверно измерены.

В кювете 4, через которую течет используемый диализат, поляризованный возбуждающий свет падает на флуорофоры для их возбуждения. Свет флуоресценции, излучаемый возбужденными флуорофорами, затем пропускают через первый поляризатор 5 и затем (посредством зеркала, фокусирующего излучение) направляют на дифракционную решетку и на датчик 7 для определения фактического спектра флуоресценции.

На фиг. 7 поляризатор 5 выполнен в виде горизонтального поляризатора. На фиг. 8 присутствует

второй поляризатор 5', выполненный в виде вертикального поляризатора.

Как можно видеть в сопоставлении с фиг. 8, выполнен поворотный затвор 8, который закрывает или первый поляризатор 5, или второй поляризатор 5' таким образом, что посредством поворотного сегмента 8 затвора свет флуоресценции, измеряемый датчиком 7, может быть выбран как имеющий горизонтальную поляризацию (как на фиг. 7) или вертикальную поляризацию (как на фиг. 8).

Кроме того, на пути распространения излучаемого света первый горизонтальный поляризатор 5 и второй вертикальный поляризатор 5' неподвижно встроены в устройство таким образом, что оптические части не могут быть подвергнуты разрегулированию, и константа G устройства может быть определена достоверно. Преимущество жесткого крепления указанных поляризаторов состоит в том, что оптические компоненты не должны быть перемещаемы при работе. В соответствии с этим нет необходимости рассматривать допуски на основании механического воспроизведения.

На фиг. 9 предложено использовать в подобном устройстве другой поворотный сегмент в виде поворотной апертуры, расположенной на пути света, выходящего со стороны пропускания кюветы таким образом, что возбуждающий свет, пропущенный через кювету, может быть измерен тем же самым датчиком 7, как два пучка света флуоресценции с различными состояниями поляризации. В частности, интенсивность поляризации I_{vv} , интенсивность поляризации I_{vh} , интенсивность пропущенного света I_t , а также фоновая интенсивность I_d датчика выключенного детектора могут быть измерены посредством этой установки и посредством одного датчика 7.

На фиг. 10 показано другое устройство, согласно которому интенсивности для двух различных поляризаций, а также интенсивность для пропущенного излучения могут быть измерены одновременно. В частности, предложено устройство Т-образной формы с двумя поляризаторами 5 и 5' и соответствующими датчиками, предназначенными для измерения поляризованных интенсивностей I_{vv} и I_{vh} флуоресценции, и с третьим датчиком 9, предназначенным для измерения интенсивности I_t пропущенного излучения.

Вертикальный поляризатор 5 размещен на одной стороне кюветы 4, а горизонтальный поляризатор 5' размещен на противоположной стороне кюветы 4, так что свет выводят или с одной стороны, или с другой стороны, что приводит к Т-образному расположению. Преимущество здесь в том, что поверхность для вывода излучаемого света флуоресценции из кюветы 4 может быть увеличена, так что чувствительность может возрасти. Кроме того, в указанном расположении, при котором свет выводят с двух различных сторон кюветы через поляризаторы, ориентированные друг относительно друга под 90° , эти две интенсивности могут быть проанализированы одновременно.

Для вывода света из кюветы 4 определенные окна 40 могут быть предусмотрены для предотвращения отражения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ контроля экстракорпоральной обработки крови пациента, включающий этапы, согласно которым

облучают образец текучей среды, используемой при экстракорпоральной обработке крови, линейно поляризованным облучающим светом,

измеряют интенсивность света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды в первой плоскости поляризации,

измеряют интенсивность света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды во второй плоскости поляризации, отличной от первой плоскости поляризации,

определяют анизотропию света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды, и

определяют концентрацию по меньшей мере одного флуорофора в образце текучей среды на основании определенного значения анизотропии и интенсивности света флуоресценции, излучаемого текучей средой.

2. Способ по п.1, согласно которому первая плоскость поляризации и вторая плоскость поляризации ориентированы перпендикулярно друг другу, а анизотропию A определяют из следующего уравнения:

$$A = \frac{I_{vv} - G * I_{vh}}{I_{vv} + 2 * G * I_{vh}}$$

где I_{vv} представляет собой интенсивность измеренного света флуоресценции в вертикальной плоскости поляризации,

I_{vh} представляет собой интенсивность измеренного света флуоресценции в горизонтальной плоскости поляризации, а

G представляет собой постоянную устройства, компенсирующую разности чувствительностей устройства при измерении интенсивностей в первой и второй плоскостях поляризации.

3. Способ по п.1 или 2, согласно которому интенсивность света флуоресценции измеряют на предварительно определенной длине волны измерения при освещении образца текучей среды на предварительно определенной длине волны облучения, значение анизотропии используют для определения индивидуального флуорофора, а интенсивность света флуоресценции используют для определения концен-

трации этого индивидуального флуорофора, причем предпочтительно, чтобы значения анизотропии для конкретных индивидуальных флуорофоров были известны.

4. Способ по любому из пп.1-3, согласно которому значения концентрации по меньшей мере двух флуорофоров, присутствующих в образце текучей среды, определяют на основе следующего уравнения для общей анизотропии A_{total} суммированных спектров

$$A_{total} = \sum_i f_i * A_i$$

где

$$f_i = \frac{S_i}{S_{total}} = \frac{I_{vv,i} + 2 * G * I_{vh,i}}{I_{vv,total} + 2 * G * I_{vh,total}}$$

и A_{total} представляет собой общую анизотропию суммированных спектров,

A_i представляет собой анизотропию i -го флуорофора,

f_i представляет собой долю интенсивности i -го флуорофора относительно общей интенсивности,

S_i представляет собой общую интенсивность физического излучения i -го флуорофора,

S_{total} представляет собой общую интенсивность физического излучения всех флуорофоров,

$I_{vh,i}$ представляет собой измеренную горизонтальную интенсивность флуоресценции i -го флуорофора,

$I_{vv,i}$ представляет собой измеренную вертикальную интенсивность флуоресценции i -го флуорофора

и i представляет собой индекс по всем флуорофорам, причем предпочтительно, чтобы значение анизотропии A_i для i -го флуорофора было известно.

5. Способ по любому из пп.1-4, согласно которому образец текучей среды облучают непрерывно, а измерение выполняют непрерывно.

6. Способ по любому из пп.1-5, согласно которому концентрацию флуорофора определяют непосредственно на основании общей анизотропии.

7. Способ по любому из пп.1-6, согласно которому концентрацию флуорофора определяют непосредственно на основании вертикальных и горизонтальных интенсивностей измеренного флуоресцентного света.

8. Способ по любому из пп.1-7, согласно которому образец текучей среды облучают импульсным и линейно поляризованным облучающим светом, а измерение света флуоресценции в первой и второй плоскостях поляризации выполняют с временным разрешением, причем

$$A = A_0 * e^{-t/\theta}$$

где θ представляет собой время корреляции поворота, которое представляет собой характерную постоянную времени, описывающую период времени, в пределах которого оси дипольных моментов переходов ориентированы диффузно за счет поворота молекул, а

A_0 представляет собой анизотропию в момент времени $t=0$ до применения эффектов деполаризации.

9. Способ по любому из пп.1-8, согласно которому время корреляции поворота изменяют путем изменения температуры образца текучей среды, изменения вязкости образца текучей среды и/или приложения внешних магнитных и/или электрических полей.

10. Способ по любому из пп.1-9, согласно которому общую интенсивность флуоресценции увеличивают выравниванием дипольных моментов переходов образца текучей среды путем приложения внешних электрических и/или магнитных полей.

11. Способ по любому из пп.1-10, согласно которому выполняют матричное разложение измеренного спектра анизотропии и выполняют сравнение с известными спектрами анизотропии известных субстанций для определения на основании соответствующих интенсивностей известных субстанций их соответствующих концентраций.

12. Способ по любому из пп.1-11, согласно которому концентрацию человеческого альбумина в образце определяют на основании результата вычитания измеренного значения вертикальной интенсивности из измеренного значения горизонтальной интенсивности.

13. Способ по любому из пп.1-12, согласно которому текучая среда, используемая в экстракорпоральной обработке крови, представляет собой используемую диализирующую текучую среду для лечения пациента диализом, гемодиализом, гемодиализацией и/или перитонеальным диализом или представляет собой ультрафильтрат при лечении пациента гемофильтрацией.

14. Способ по любому из пп.1-13, согласно которому контрольное измерение выполняют на свежей диализирующей текучей среде при лечении пациента диализом, гемодиализом, гемодиализацией и/или перитонеальным диализом с использованием следующих этапов, согласно которым

облучают образец свежей диализирующей текучей среды, предназначенной для использования при экстракорпоральной обработке крови, линейно поляризованным облучающим светом,

измеряют интенсивность света флуоресценции, излучаемого образцом свежей диализирующей текучей среды в первой плоскости поляризации,

измеряют интенсивность света флуоресценции, излучаемого образцом свежей диализирующей текучей среды во второй плоскости поляризации, отличной от первой плоскости поляризации, определяют анизотропию света флуоресценции, излучаемого образцом свежей диализирующей текучей среды, и

определяют концентрацию по меньшей мере одного флуорофора в образце свежей диализирующей текучей среды на основании определенного значения анизотропии и интенсивности света флуоресценции, излучаемого текучей средой.

15. Устройство для контроля экстракорпоральной обработки крови пациента для осуществления способа по любому из пп.1-14, содержащее

источник (1) облучающего света, предназначенный для облучения образца текучей среды, используемого в лечении диализом с использованием линейно поляризованного облучающего света, и

датчик (7) для измерения интенсивности света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды в первой плоскости поляризации и во второй плоскости поляризации, отличной от первой плоскости поляризации,

причем блок (А) анализа размещен для определения анизотропии света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды, и для определения концентрации по меньшей мере одного флуорофора в образце текучей среды на основании определенного значения анизотропии и интенсивности света флуоресценции, излучаемого образцом текучей среды.

16. Устройство по п.15, в котором по меньшей мере два поляризатора (5, 5') с плоскостями поляризации, выравненными под углом друг к другу, расположены между образцом текучей среды и датчиком (7) для измерения интенсивности света флуоресценции,

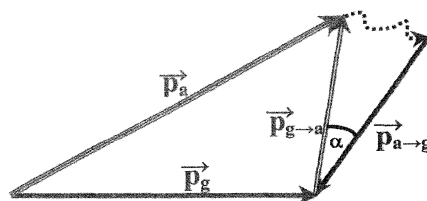
причем подвижный затвор (8) размещен в световом пути для поочередного перекрытия одного из этих двух поляризаторов (5, 5') для поочередного измерения интенсивности света флуоресценции в этих двух плоскостях поляризации.

17. Устройство по п.16, в котором дополнительно поворотный затвор размещен в световом пути пропущенного света от источника света через образец текучей среды таким образом, что обеспечена возможность измерения интенсивности пропускаемого света, а также интенсивностей света флуоресценции по меньшей мере в двух различных плоскостях поляризации посредством одного датчика.

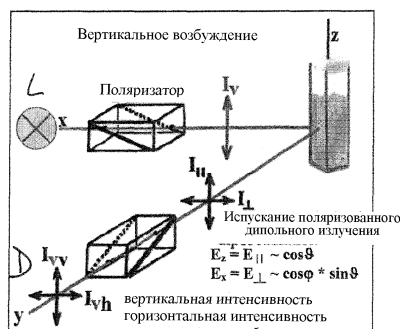
18. Устройство по п.15, в котором первый датчик с соответствующим поляризатором (5) с первой плоскостью поляризации и второй датчик с соответствующим поляризатором (5') со второй плоскостью поляризации, отличной от первой плоскости поляризации, размещены на противоположных сторонах образца текучей среды для одновременного измерения света флуоресценции в первой и второй плоскостях поляризации.

19. Устройство по п.18, в котором третий датчик (9) размещен коллинеарно с облучающим светом, и таким образом, что образец текучей среды расположен между датчиком и источником облучающего света для измерения интенсивности пропущенного света.

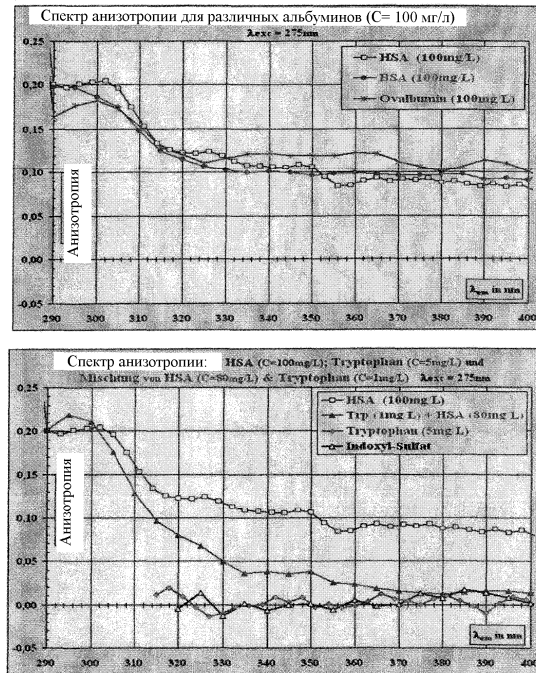
20. Экстракорпоральное устройство обработки крови для выполнения экстракорпоральной обработки крови на пациенте, содержащее устройство для контроля экстракорпоральной обработки крови пациента по любому из пп.15-19.



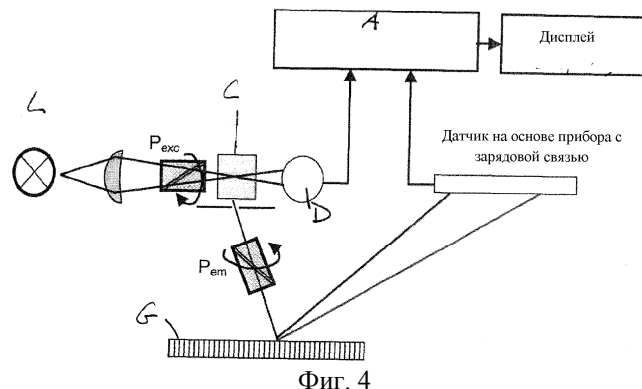
Фиг. 1



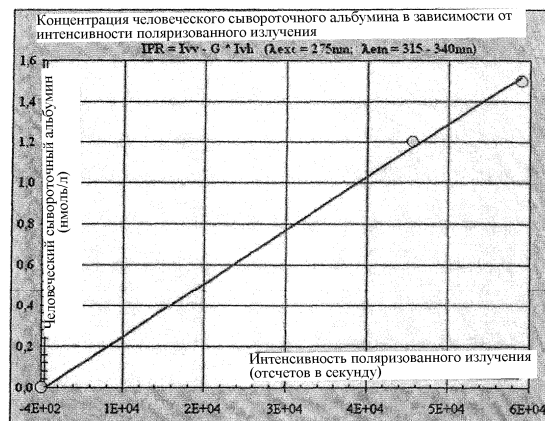
Фиг. 2



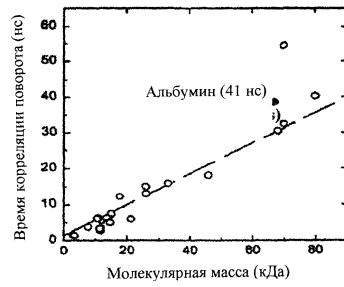
Фиг. 3



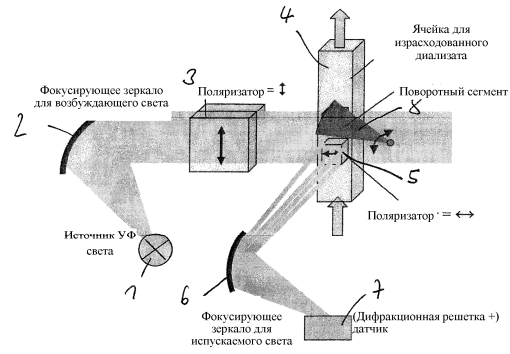
Фиг. 4



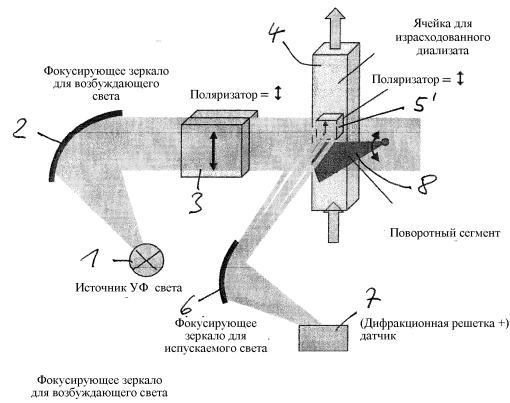
Фиг. 5



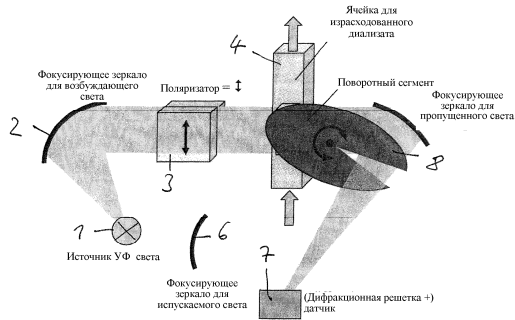
Фиг. 6



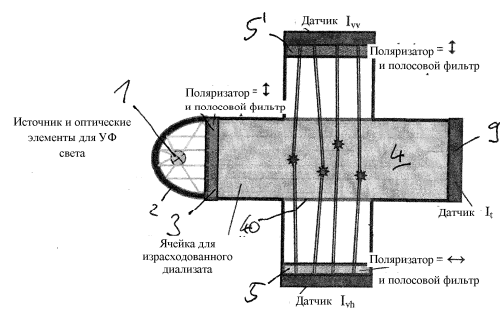
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

