

УДК 621.9-114

© П. О. Луговая, Т. В. Мирина, 2022

МЕТОДЫ СНИЖЕНИЯ ПОМЕХ ПРИ ПРОЕКТИРОВАНИИ ОПТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ КОАГУЛОМЕТРА

Новейшие стандарты лабораторной диагностики показателей гемостаза предполагают исследование микропроб — это десятки микролитров, однако анализ столь малых объемов является сложной задачей. Необходимо свести к минимуму помехи, связанные не только с электронной частью, но и с оптическим узлом. В статье предлагаются некоторые способы снижения помех при проектировании оптической системы коагулометров. Представлены условия возникновения этих помех с точки зрения физики и оптики. Описана методика определения оптимальной длины волны для проведения анализов на гемостаз, даны рекомендации по выбору источников излучения и фотодатчиков. Предложена конструкция термостатируемой плиты и измерительных каналов. Проведен эксперимент, который наглядно показывает эффективность предложенных способов снижения помех. Описано влияние различных факторов и особенностей конструкции на полезный выходной сигнал.

Кл. сл.: оптический коагулометр, оптическая система анализатора гемостаза, выбор длины волны для коагулографии, снижение помех

ВВЕДЕНИЕ

Клоттинговые тесты на данный момент являются самыми распространенными для исследования гемостаза [1]. Их относительная дешевизна, простота и вместе с тем точность сделали их очень популярными.

В связи с тем, что ручной метод является весьма трудоемким и при этом не обладает высокой точностью, наблюдается тенденция на отказ от ручных методов в пользу полуавтоматических коагулометров. Однако проблема недостаточной оснащенности лабораторий в России сохраняет свою актуальность [1].

В настоящее время существуют два полуавтоматических способа регистрации в коагулометрии: оптический и механический.

Коагулометры, основанные на оптическом методе измерения, по некоторым данным, более точны [2, 3], их легче автоматизировать [4], расширить возможности одного прибора для проведения и клоттинговых, и имунотубидиметрических, и хромогенных методик, кроме того, их можно адаптировать под иктеричные и липемичные плазмы [2]. Удачно спроектированная оптическая система коагулометра может быть чувствительна во всем спектре коагуляционных анализов в широком диапазоне показателей гемостаза.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОПТИЧЕСКОГО МЕТОДА ИЗМЕРЕНИЯ

Существует две оптические методики измерения показателей гемостаза: нефелометрия и турбидиметрия [5].

Нефелометрические коагулометры определяют момент образования фибринового сгустка по изменению рассеяния света. Детектор при нефелометрическом методе находится под углом к падающему на образец лучу (рис. 1, направление Б).

Турбидиметрические коагулометры регистрируют момент свертывания плазмы при прохождении луча света сквозь образец, оценивая только трансмиссию светового потока (рис. 1, направление А). Образующийся в результате реакции фибриновый сгусток значительно повышает оптическую плотность биопробы, вследствие чего на детектор попадает меньше света и система фиксирует этот момент по падению напряжения на фотодетекторе [6].

Коагулометр может быть запрограммирован, при каком приросте оптической плотности по отношению к исходному уровню (ΔD) должен регистрироваться момент свертывания. Время от внесения в оптическую кювету индуктора свертывания до момента достижения заданного ΔD определяется как время свертывания плазмы в исследуемом тесте.

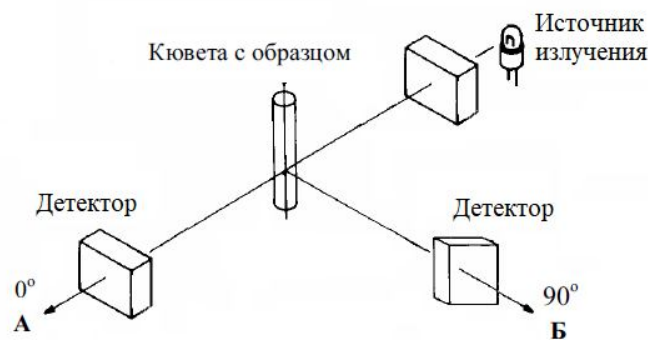


Рис. 1. Схема детекции образования фибринового сгустка при турбидиметрическом (направление А) и нефелометрическом (направление Б) методах

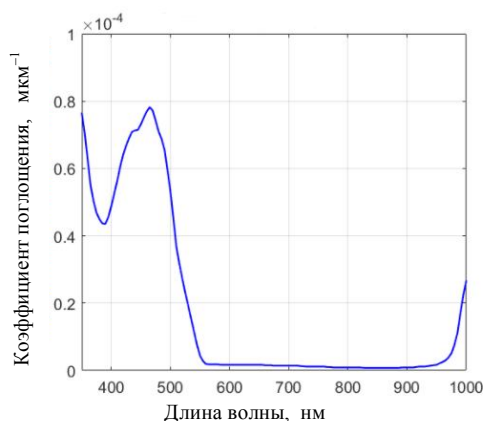


Рис. 2. Спектр поглощения плазмы крови человека, при прохождении одного сантиметра образца

При турбидиметрических исследованиях интенсивность прошедшего светового потока I_t может быть определена по уравнению:

$$\lg \frac{I_t}{I_0} = k \frac{Cbd^3}{d^4 + a\lambda^4}, \quad (1)$$

где I_0 — интенсивность падающего светового потока; I_t — интенсивность потока, прошедшего через раствор; C — концентрация рассеивающих частиц в растворе; b — толщина поглощающего слоя раствора; d — средний диаметр рассеивающих частиц; k и a — константы, зависящие от природы вещества и метода измерения; λ — длина волны.

В качестве источника излучения в коагулометрии чаще всего применяются светодиоды, реже — лазеры.

Выбор длины волны для каждого вида исследований выбирается исходя из физико-химических

и оптических свойств плазмы крови и применяемых реактивов.

При турбидиметрических исследованиях предпочтительно использовать короткие длины волн: синий и ближний ультрафиолетовый. Это связано с тем, что доля рассеянного света увеличивается обратно пропорционально четвертой степени длины волны, что видно из формулы (1), соответственно при меньшей длине волны прошедший свет будет составлять большую часть от падающего, т.е. будет более интенсивным.

Также исследование растворов рекомендуется проводить при длине волны облучения, соответствующей максимальному поглощению, т.е. длине волны, при которой максимален показатель поглощения [6].

Плазма крови человека имеет желтоватый оттенок, следовательно максимум поглощения придется на синюю часть спектра [7]. На рис. 2 представлен спектр поглощения плазмы пула здоровых

доноров при прохождении 1 см образца. Исходя из приведенного выше, можно сделать вывод, что диапазон 370–470 нм является наиболее предпочтительным для стандартных клоттинговых измерений.

Анализы гемостаза могут проводиться также в зеленой, красной и инфракрасной частях спектра. Длины волн от 500 до 560 нм и от 620 до 760 нм удобны для иммунологических исследований. Также красное излучение может применяться для исследования иктеричных образцов (с высоким содержанием билирубина).

На современном рынке существует множество светодиодов, встречаются модели, совмещающие в одном корпусе кристаллы разных спектров: красный–синий, синий–зеленый, красный–зеленый и даже трехцветные — синий–зеленый–красный. Поэтому, используя такие компоненты и проведя правильную настройку системы обработки сигналов, можно спроектировать универсальный коагулометр, который будет способен проводить все виды анализов факторов свертывания.

Луч для освещения пробы должен быть достаточно узконаправленным, сфокусированным. Угол освещения светодиодов зависит от их конструкции и составляет от 15 до 140 град. Для оптических коагулометров предпочтительно использование светодиодов навесного монтажа, в колбе, с видимым телесным углом освещения 15–40 град [8].

Для устранения влияния помех, которое может вызывать мигание приборов освещения на частоте 50 Гц, а также от естественного дневного света, который будет генерировать на фотодиоде постоянный или медленно флуктуирующий сигнал, напряжение, подаваемое на светодиоды, следует модулировать частотой в единицы килогерц. Сигнал такой частоты будет легко отфильтровать и не сложно обрабатывать. Кроме того, увеличивается ресурс работы светодиода.

Приемником оптического сигнала может выступать любой фотоэлектрический преобразователь. Чаще всего для турбидиметрических иссле-

дований в качестве детектора выступает фотодиод [4], т.к. его быстродействие на порядки выше, чем у фоторезистора, при этом он обладает достаточной чувствительностью [9].

Анализы на гемостаз следует проводить при стабильной температуре 37 °С [10], поэтому блок ячеек обычно представляет из себя подогреваемую массивную металлическую плиту. Материал для ее изготовления выбирается по нескольким параметрам. Он должен обладать высокими теплоемкостью и теплопроводностью, быть легким, простым в обработке, недорогим, устойчивым к коррозии. Этим условиям удовлетворяют сплавы алюминия, такие как дюралюминий [11].

Также важной частью является конструкция измерительных ячеек и измерительных каналов. Диаметр отверстия со стороны датчика должен быть такой, чтобы лучом покрывалась вся площадь светочувствительного кристалла, в таком случае эффективность преобразования будет максимальной.

Вместе с этим для дополнительной защиты от посторонней засветки необходимо немного заглубить и светодиод, и фотодиод в плиту ячеек (рис. 3).

Диаметр отверстия для луча от светодиода целесообразно делать не больше отверстия для фотодиода, а равное ему или немного меньше.

Не менее важен объем кюветы и длина измерительного канала. Характер зависимости интенсивности света при прохождении монохроматического светового потока через слой вещества описывается законом Бугера–Ламберта–Бера [10]:

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha C b}, \quad (2)$$

где I_0 и I — интенсивности светового потока, падающего на вещество и прошедшего сквозь него; α — коэффициент светопоглощения, C — концентрация растворенного вещества, b — толщина поглощающего слоя.

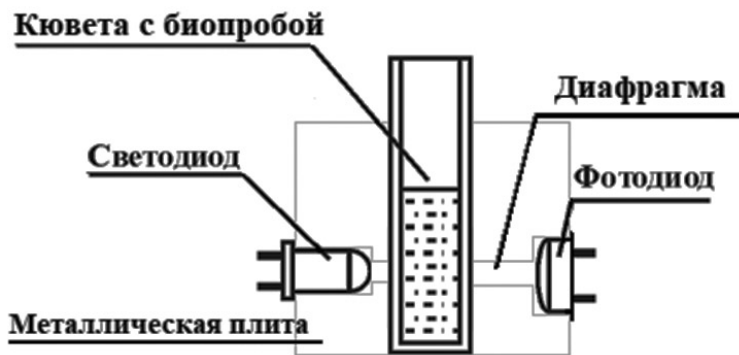


Рис. 3. Расположение кюветы, светодиода и фотодиода в плите блока измерения (пропорции показаны схематично)

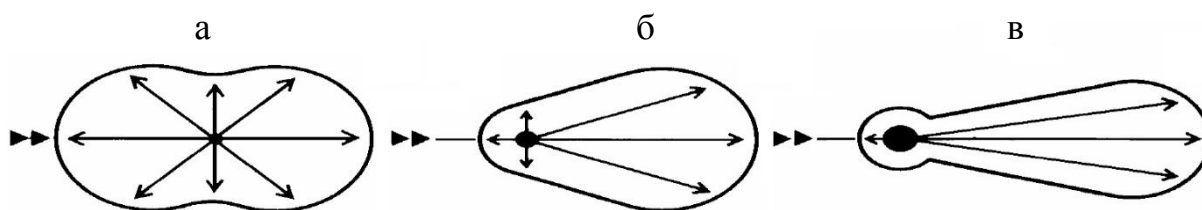


Рис. 4. Характер рассеивания света с длиной волны λ на частицах диаметра d .
а — $d < \lambda/10$, б — $d \leq \lambda$, в — $d > \lambda$

Этим законом ограничивается минимальный размер кюветы. Более ранние модели коагулометров работали с пробами до 1 мл, а путь луча в длину обычно составлял 10 мм [6]. Современные же анализаторы работают с микропробами — порядка 100 мкл и менее, путь луча в биопробе при этом может составлять до 3 мм. Так как толщина поглощающего слоя сокращается в разы, при регистрации малых концентраций изменение сигнала может быть очень мало. В этом случае особо важно обеспечить большую помехоустойчивость для сохранения точности результатов.

При изготовлении деталей из дюралюминия на современных станках обработанная поверхность металла получается зеркально-гладкой, что может создавать проблемы при измерении, т.к. сильно повышается количество отраженного света, т.е. шума.

Особенно важно избежать отражений от стенок канала и ячейки при измерении концентрации D-димера. D-димеры — это продукты деградации фибрина, небольшие фрагменты белков [13]. Измерение концентрации D-димера производится иммунотурбидиметрически — методом латексной агглютинации [14]. В реакционной суспензии при этом присутствует большое количество мелких

частиц — латексных сфер диаметром 0.22–1.00 мкм [15].

Характер рассеивания зависит от соотношения длины волны света и диаметра частиц, на которых происходит рассеивание (рис. 4).

Реактивы с частицами среднего диаметра 0.7 мкм применяются для исследования в красном спектре; 0.4 мкм — в синем. Картина рассеивания в обоих случаях будет соответствовать представленной на рис. 4, б.

Учитывая вышесказанное, для правильной работы следует покрывать измерительные ячейки и каналы изнутри светопоглощающим слоем, например черной матовой краской.

ЭКСПЕРИМЕНТ

На экспериментальной установке, оптическая часть которой показана на рис. 5, в качестве источников света использовались светодиоды с длиной волны 470 нм. Фотоприемниками служили кремниевые фотодиоды, сигнал которых усиливался с помощью трансимпедансного усилителя.

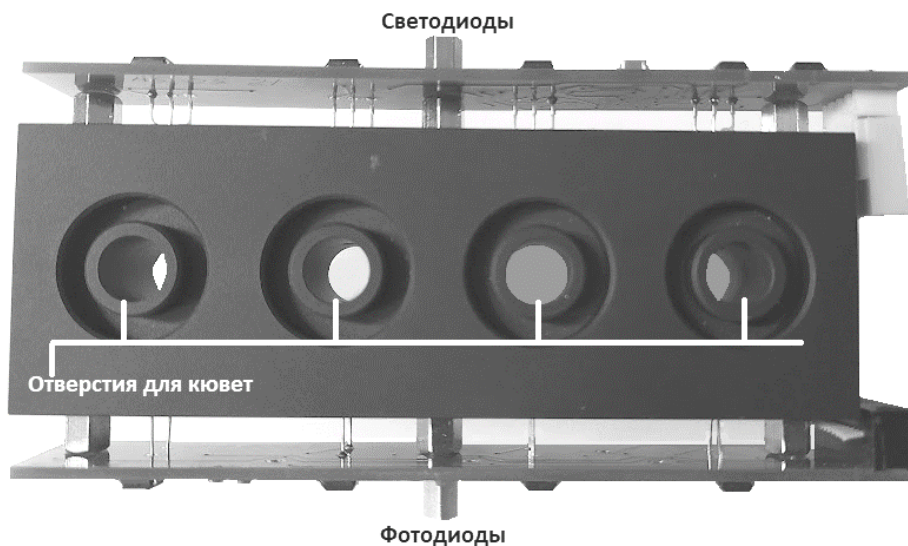


Рис. 5. Оптический блок экспериментальной установки

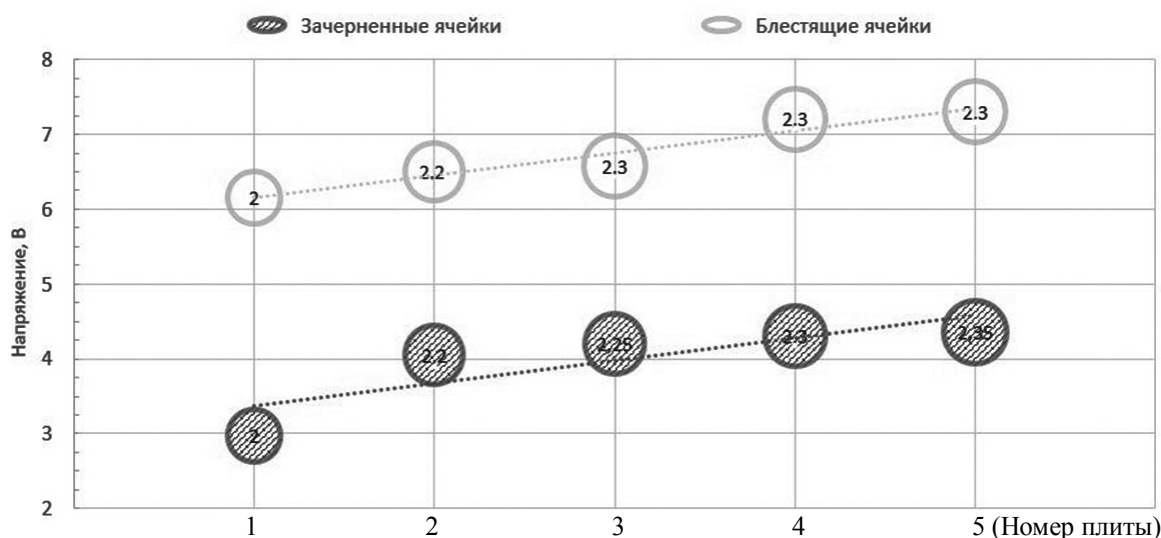


Рис. 6. График зависимости величины напряжения от диаметра отверстия

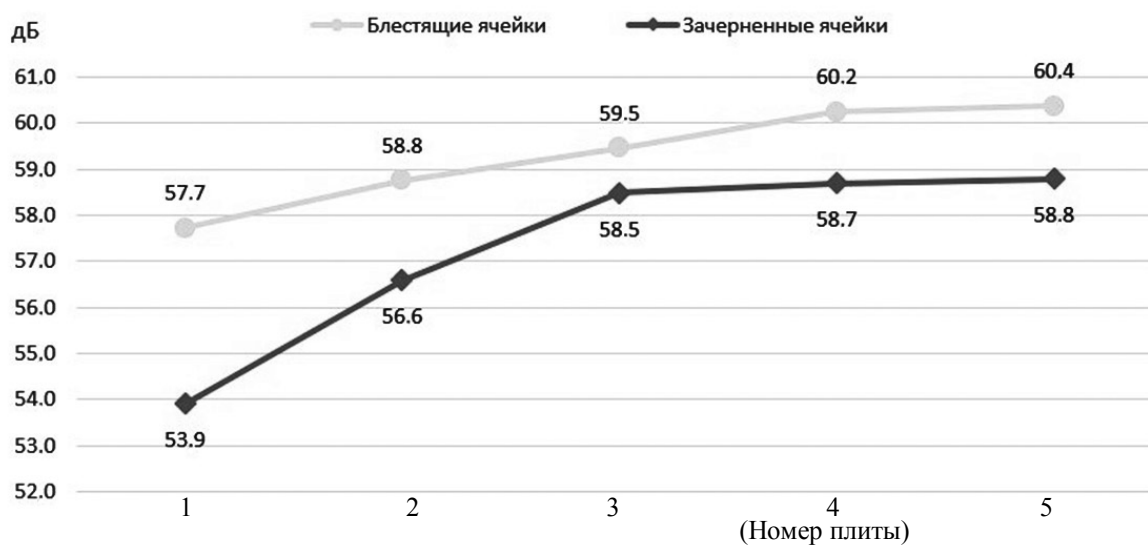


Рис. 7. Соотношение сигнал/шум

Сигналы фиксировались аналоговым осциллографом с минимальным пределом измерения 2 мВ. Все значения — амплитудные, частота 1 кГц, форма — меандр.

Измерения проводились на десяти плитах, в каждой по четыре независимых, но одинаково настроенных канала. Пять плит имели гладкую обработанную металлическую поверхность (далее — блестящие плиты), другие были покрыты черной матовой краской (далее — зачерненные плиты). Среди каждой группы были экземпляры с разными диаметрами измерительных каналов. Для блестящих: 2 и 2.2 мм и три по 2.3 мм. Для зачерненных: 2, 2.2, 2.25, 2.3, 2.35 мм. (Присвоим плитам группы соответственные номера 1–5.)

Уровни напряжений, замеренные на четырех каналах каждой плиты, были приведены к среднему арифметическому, т.к. разница между каналами определяется в основном погрешностью светодиодов.

Наиболее значимое влияние оказал тип поверхности плиты. Паразитная засветка из-за многократного отражения от блестящих стенок без покрытия значительно увеличивает выходной сигнал, график показан на рис. 6.

Прирост напряжения за счет изменения диаметра от минимального к максимальному составил 18.7 % для блестящих и 46.2 % для зачерненных плит. При этом средняя разница амплитуд между плитами разной обработки составила 69.7 %.

Из полученных данных было рассчитано соотношение сигнал/шум. Рис. 7 наглядно показывает часть напряжения шума в общем сигнале. В этом случае шум — часть помех, созданная электрической схемой. Блестящие плиты имеют отношение лучше, однако разница с зачерненными невелика.

Вместе с этим доля паразитного отраженного сигнала на блестящих плитах достигает 7.1% (рис. 8).

На зачерненных плитах доля этого сигнала не превышает 0.2% (рис. 9).

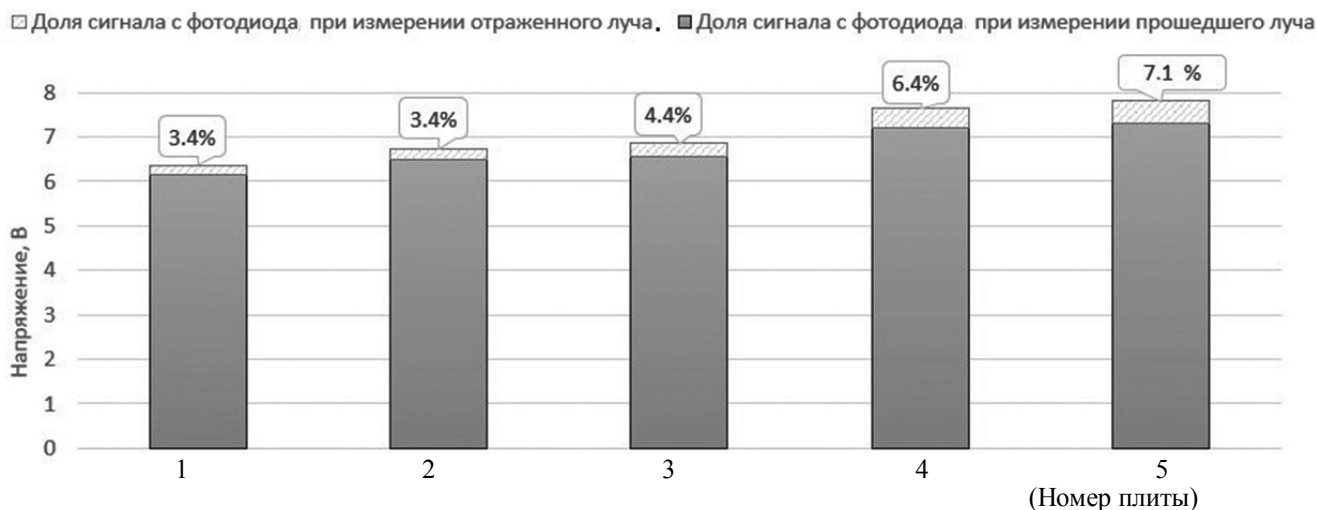


Рис. 8. Соотношение полезного сигнала и отраженного, снятого в отверстиях для кювет, при измерении на блестящих плитах (на выносках указаны процентные доли для отраженного луча)

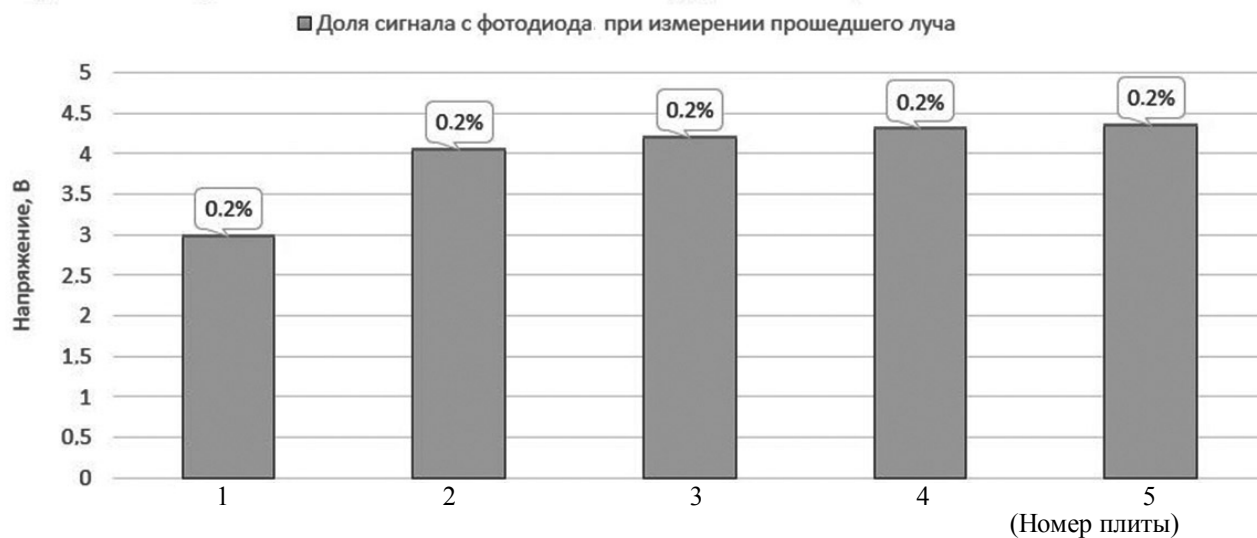


Рис. 9. Соотношение полезного сигнала и отраженного, снятого в отверстиях для кювет, при измерении на зачерненных плитах (на выносках указаны процентные доли для отраженного луча)

Отраженный сигнал снимался с отверстий для кювет, и это только одно направление распространения отраженных лучей, однако разница очень велика, что наглядно показывает положительное влияние зачерняющего покрытия.

Сигналы с зачерненных и блестящих плит сопоставлены на рис. 10.

По графикам на рис. 6 и 10 можно заметить еще одну проблему плит без покрытия — неодинаковая обработка. Сделанные в разное время и на раз-

ных станках, они различаются по отражательной способности.

Несмотря на то, что отраженный сигнал был измерен только с верхних отверстий для кювет, общую картину можно оценить, сравнив разницы

сигналов на зачерненных и блестящих плитах при одинаковых диаметрах отверстий.

В таком случае видно (рис. 10), что более половины уровня напряжения на фотодиоде может создаваться за счет отражения.

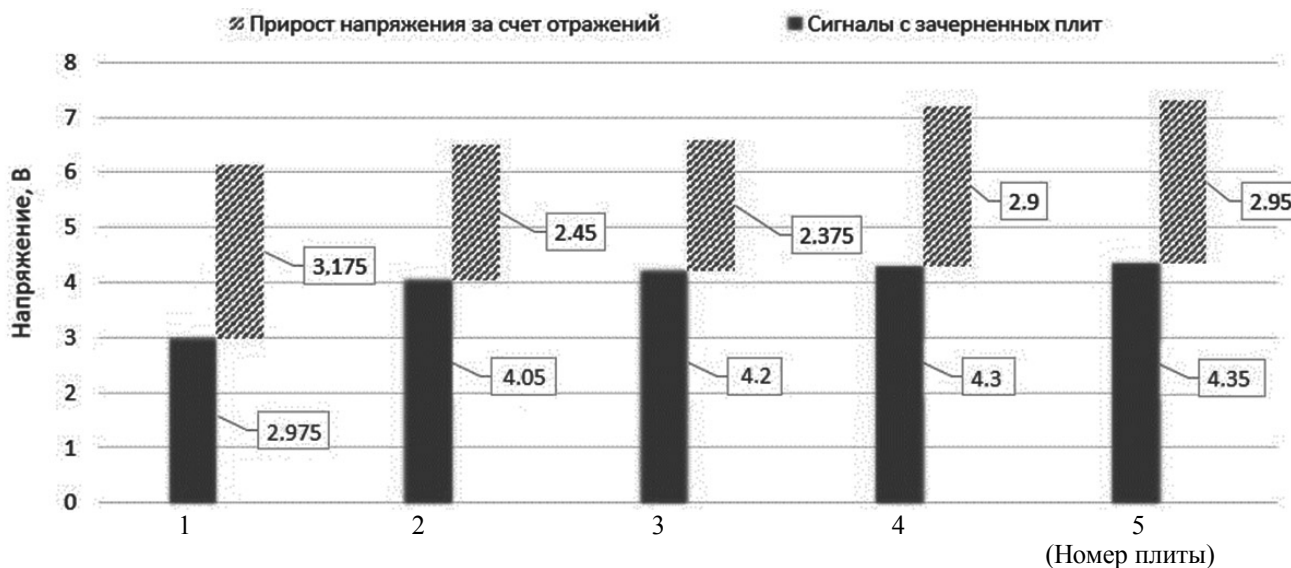


Рис. 10. Соотношение полезного сигнала и паразитного, возникшего в результате отражений при измерении на блестящих плитах

ВЫВОДЫ

По результатам теоретического анализа и эксперимента можно сделать вывод об эффективности предложенных мер по снижению помех в оптических узлах коагулометров.

Может показаться, что полезный сигнал во много раз больше любых измеренных шумов и проблема как таковая не стоит. Однако не стоит забывать, что критерий регистрации времени образования сгустка — относительное изменение сигнала, а не его абсолютное значение. Кроме того, реагенты и плазма крови сами по себе являются препятствием на пути луча и сильно снижают сигнал. При протекании реакции, особенно при исследовании плазмы со сниженными показателями гемостаза, дельта сигнала может составлять десятки милливольт.

Еще сложнее картина становится при иммунологических измерениях, когда сам реагент меняет характер распространения паразитного сигнала в худшую сторону.

Продуманная конструкция и технология могут сделать оптический коагулометр универсальной системой, способной выполнять очень широкий спектр анализов на гемостаз. Высокая точность и специфичность результатов удовлетворяет са-

мым современным требованиям современной медицины в области диагностики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бокарев И.Н., Доронина А.М., Козлова Т.В. и др. Лабораторные методы исследования системы свертывания крови: методические рекомендации, пособие. Москва: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, Российская ассоциация тромбозов и геморрагий и патологии сосудов им. А.А. Шмидта-Б.А. Кудряшова, 2011. 15 с.
2. Брутцова Н.А. Преимущества автоматических методов исследования плазменного звена гемостаза при ишемической болезни сердца // Тромбоз, гемостаз и реология. 2008. № 4(36). С. 43–46. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=13062753>
3. McCraw A., Hillarp A., Echenagucia M. Considerations in the laboratory assessment of haemostasis // Haemophilia. 2010. Vol. 16, is. 5. P. 74–78. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2010.02302.x
4. Все о коагулометрах (портал). URL: <http://www.coagulometers.ru/index.htm> (дата обращения: 19.04.2022).
5. Долгов В.В., Свириг П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. Тверь: ООО "Издательство "Триада", 2005. 227 с.

6. Долгов В.В., Ованесов Е.Н., Щетникович К.А. Фотометрия в лабораторной практике. М.: Высшая школа, 2004. 142 с.
7. Meinke M., Müller G., Friebe M., Helfmann J. Optical properties of platelets and blood plasma and their influence on the optical behavior of whole blood in the visible to near infrared wavelength range // J. of Biomed. Opt. 2007. Vol. 12, no. 1. DOI: 10.1117/1.2435177
8. Шуберт Ф. Светодиоды / пер. с англ. под ред. А.Э. Юновича. 2-е изд. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2008. 496 с.
9. Гусев В.Г. Электроника и микропроцессорная техника: учебник. М.: КНОРУС, 2013. 800 с.
10. Bronić A., Herak D.C., Margetić S., Milić M. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: National recommendations for blood collection, processing, performance and reporting of results for coagulation screening assays prothrombin time, activated partial thromboplastin time, thrombin time, fibrinogen and D-dimer // Biochemia Medica. 2019. Vol. 29, no. 2. DOI: 10.11613/BM.2019.020503
11. Коровский Ш.Я. Авиационное электрорадиоматериаловедение. М.: Машиностроение, 1972. 355 с. URL: <https://search.rsl.ru/ru/record/01007410945>
12. Гусев В.Г. Получение информации о параметрах и характеристиках организма и физические методы воздействия на него. М.: Машиностроение, 2004. 597 с.
13. Linkins L.-A., Lapner S.T. Review of D-dimer testing: Good, Bad, and Ugly // International Journal of Laboratory Hematology. 2017. Vol. 39, is. S1. P. 98–103. DOI: 10.1111/ijlh.12665
14. Török-Nagy B. Generation and characterization of D-dimer specific monoclonal antibodies for use in latex agglutination test // PLoS One: электронный журнал. Дата публикации: 14.02.2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0212104
15. G&T PolymerTechnologies (портал): Реакция латекс-агглютинации. URL: <http://gtpt.ru/primeneniya/lateksnaya-agglyutinatsiya/> (дата обращения: 15.04.2022).

Уфимский государственный авиационный технический университет, г. Уфа

Контакты: Луговая Полина Олеговна,
polina_l@astra.ru

Материал поступил в редакцию 25.04.2022

CONSTRUCTION OF AN OPTICAL COAGULOMETER SYSTEM AND WAYS TO REDUCE INTERFERENCE

P. O. Lugovaya, T. V. Mirina

Ufa state aviation technical University, Russia

The latest standards of laboratory diagnostics of hemostasis involve the study of micro-samples — tens of microliters, however, the analysis of such small volumes is a difficult task. It is necessary to minimize the interference associated with not only the device electronics, but also the optical node. The article suggests some ways to reduce interference when designing the optical system of coagulometers. The reasons for the appearance of these interferences from the point of view of physics and optics are presented. The method of determining the optimal wavelength for hemostasis tests is described, recommendations are given on the choice of emission sources and photodetectors. The design of a thermostatically controlled plate and measuring channels is proposed. An experiment has been conducted that clearly shows the effectiveness of the proposed methods for reducing interference. The influence of various factors and design features on the useful output signal is described.

Keywords: optical coagulometer, optical system of the hemostasis analyzer, wavelength selection for coagulography, noise reduction

INTRODUCTION

Clotting tests are currently the most common for the study of hemostasis [1]. Their relative cheapness, simplicity and, at the same time, accuracy made them very popular.

Due to the fact that the manual method is very laborious and does not have high accuracy, there is a tendency to abandon manual methods in favor of semi-automatic coagulometers. However, the problem of insufficient equipment for laboratories in Russia remains relevant [1].

Currently, there are two semi-automatic recording methods in coagulometry: optical and mechanical.

According to some data, coagulometers based on the optical method of measurement are more accurate [2, 3], they are easier to automate [4], expand the capabilities of one device for performing both clotting and immunoturbidimetric, and chromogenic research. In addition, it can be adapted for icteric and lipemic plasmas [2]. A well-designed optical system of a coagulometer can be sensitive to the entire spectrum of coagulation analysis in a wide range of hemostasis parameters.

THEORETICAL FOUNDATION OF THE OPTICAL MEASUREMENT METHOD

There are two optical methods for measuring hemostasis parameters: nephelometry and turbidimetry [5].

Nephelometric coagulometers determine the moment of formation of a fibrin clot by changing the light scattering. The detector in the nephelometric

study is angled to the incident beam on the sample (Fig. 1, direction B).

Turbidimetric coagulometers record the moment of plasma coagulation when a light beam passes through a sample, estimating only the transmission of the light flux (Fig. 1, direction A). Because the fibrin clot generated as a result of the reaction raises the optical density of the bioassay, less light enters the detector, and the system compensates for this by lowering the voltage across the photodetector [6].

Fig. 1. Detection of fibrin clot formation using turbidimetric (direction A) and nephelometric (direction B) methods

The coagulometer can be programmed at what increase in optical density in relation to the initial level (ΔD) the clotting moment should be recorded. The time from the introduction of the clotting inductor into the optical cuvette until the specified ΔD is reached is defined as the plasma clotting time in the test under study.

In turbidimetric studies, the intensity of the transmitted light flux I_t can be determined by the equation:

$$\lg \frac{I_t}{I_0} = k \frac{Cbd^3}{d^4 + a\lambda^4}, \quad (1)$$

where I_0 is the intensity of the incident light flux; I_t is the intensity of the flow passed through the solution; C is the concentration of scattering particles in the solution; b is the thickness of the absorbing solution layer; d is the average diameter of scattering particles;

k and a are constants depending on the nature of the substance and the method of measurement; λ is the wavelength.

As a source of emission in coagulometry, LEDs are most often used, less often — lasers.

The choice of wavelength for each type of research is made based on the physicochemical and optical properties of blood plasma and reagents used.

In turbidimetric studies, it is preferable to use short wavelengths: blue and near ultraviolet. This is due to the fact that the portion of scattered light increases in inverse proportion to the fourth power of the wavelength, which can be seen in formula (1); accordingly, at a shorter wavelength, the transmitted light makes up a greater part of the incident light, i.e. is more intense.

Also, the study of solutions is recommended to be carried out at an irradiation wavelength corresponding to the maximum absorption, i.e. the wavelength for which the absorption index is maximum [6].

Human blood plasma has a yellowish tint, therefore, the absorption maximum is in the blue part of the spectrum [7]. Fig. 2 shows the absorption spectrum of plasma from a pool of healthy donors during the passage of 1 cm of the sample.

Fig. 2. The absorption spectrum of human blood plasma in the case of passing one centimeter of the sample

Based on the above, it can be concluded that the 370–470 nm range is the most preferred for standard clotting measurements.

Hemostasis analyses can also be carried out in the green, red and infrared parts of the spectrum. Wavelengths from 500 to 560 nm and from 620 to 760 nm are proper for immunological studies. Also, red emission can be used to study icteric samples (with a high content of bilirubin).

There are many LEDs on the modern market, some models combine crystals of different spectra in one housing: red-blue, blue-green, red-green, and even tricolor blue-green-red. Therefore, by using such components and properly configuring the signal processing system, it is possible to design a universal coagulometer that is able to perform all types of clotting factor analyses.

The sample illumination beam must be sufficiently narrowly directed, focused. The illumination angle of the LEDs depends on their design and ranges from 15 to 140 degrees. For optical coagulometers, it is preferable to use surface-mounted point-to-point LEDs in a flask with a visible solid illumination angle of 15–40 degrees [8].

To eliminate the influence of interference, which can be caused by flashing of lighting devices at a fre-

quency of 50 Hz, as well as by natural daylight, that generates a constant or slowly fluctuating signal on the photodiode, the voltage supplied to the LEDs should be modulated with a frequency of units of kilohertz. A signal of this frequency is easy to filter and to process. In addition, the service life of the LED gets increased.

Any photoelectric converter can act as an optical signal receiver. Most often, a photodiode acts as a detector in turbidimetric studies [4], since its speed is orders of magnitude higher than that of a photoresistor, while it has sufficient sensitivity [9].

Hemostasis tests should be carried out at a stable temperature of 37 °C [10], so the block of cells is usually a heated massive metal plate. The material for its manufacture is selected according to several parameters. It should have high heat capacity and thermal conductivity, be light, easy to process, inexpensive, and resistant to corrosion. These conditions are met by aluminum alloys, such as duralumin [11].

Another important characteristic is the design of the measuring cells and measuring channels. The diameter of the hole on the side of the sensor should be such that the entire area of the photosensitive crystal is covered by the beam, in this case the conversion efficiency is maximum.

At the same time, for additional protection from extraneous illumination, it is necessary to slightly deepen both the LED and the photodiode into the cell plate (Fig. 3).

Fig. 3. The location of the cuvette, LED and photodiode in the plate of the measuring unit (proportions are shown schematically)

It is advisable to make the diameter of the hole for the LED beam no larger than that of the hole for the photodiode, but equal to it or slightly less.

Equally important are the volume of the cuvette and the length of the measuring channel. The nature of the dependence of the light intensity during the passage of a monochromatic light flux through a layer of substance is described by the Bouguer–Lambert–Beer law [10]:

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha C b}, \quad (2)$$

where I_0 and I are the intensities of the light flux falling on the substance and passing through it; α is the coefficient of light absorption, C is the concentration of the dissolved substance, b is the thickness of the absorbing layer.

This law limits the minimum size of the cuvette. Earlier models of coagulometers worked with samples up to 1 ml, and the beam path in length was usually 10 mm [6]. Modern analyzers work with microsamples — about 100 μ l or less, while the beam path in

a biosample can be up to 3 mm. Since the thickness of the absorbing layer is reduced by several times, the change in the signal can be very small when recording low concentrations. In this case, it is especially important to ensure greater noise immunity in order to maintain the accuracy of the results.

When manufacturing duralumin details on modern machines, the treated metal surface is mirror-smooth, which can create problems for measurement, because the amount of reflected light, i.e. noise, increases greatly.

It is especially important to avoid reflections from the channel and cell walls when measuring the D-dimer concentration. D-dimers are fibrin degradation products, small fragments of proteins [13]. Measurement of D-dimer concentration is carried out immunoturbidimetrically, by the method of latex agglutination [14]. In this case, the reaction suspension contains a large number of small particles — latex spheres with a diameter of 0.22–1.00 μm [15].

The nature of scattering depends on the ratio of the wavelength of light and the diameter of the particles on which scattering occurs (Fig. 4).

Fig. 4. Scattering of light with wavelength λ on the particles of the diameter d .
a — $d < \lambda / 10$, б — $d \leq \lambda$, в — $d > \lambda$

Reagents with particles of an average diameter of 0.7 μm are used for research in the red spectrum; 0.4 μm — in the blue. The scattering pattern in both cases will correspond to that shown in Fig. 4, б.

In view of the above, for proper operation, the measuring cuvettes and channels should be covered from the inside with a light-absorbing coating, such as black matte paint.

EXPERIMENT

On the experimental setup, the optical component of which is shown in Fig. 5, LEDs with a wavelength of 470 nm were used as light sources. Silicon photodiodes served as photodetectors, the signal of which was increased using a trans-impedance amplifier.

Fig. 5. Optical block of experimental setup

The signals were recorded with an analog oscilloscope that has a minimum measurement limit of 2 mV. All values are amplitude, frequency 1 kHz, meander shape.

The measurements were carried out on ten plates, each with four independent but identically arranged channels. Five of the plates had a smooth, machined metal surface (hereinafter referred to as the shiny plates), others were covered with black matte paint (hereinafter referred to as the blackened plates). Each group included specimens with different diameters of the measuring channels. For shiny ones: 2, 2.2 mm and three 2.3 mm each. For blackened: 2, 2.2, 2.25, 2.3, 2.35 mm. (Let's assign the corresponding numbers 1–5 to the plates of the group).

The voltage values measured on the four channels of each plate were reduced to the arithmetic mean, since the difference between the channels is determined mainly by the error of the LEDs.

The type of plate surface has the most significant influence. Spurious light due to multiple reflections from shiny uncoated walls significantly increases the output signal, the graph is shown in Fig. 6.

Fig. 6. Graph of the dependence of the voltage value on the diameter of the hole

The increase in voltage due to the change in diameter from the minimum to the maximum amounted to 18.7% for shiny and 46.2% for blackened plates. The average amplitude difference between plates of different processing was 69.7%.

From the obtained data, the signal-to-noise ratio was calculated. Fig. 7 clearly shows the portion of the noise in the overall signal. In this case, the noise is part of the interference created by the electrical circuit. Shiny plates have a better ratio, but the difference with blackened ones is small.

Fig. 7. Signal-to-noise ratio

At the same time, the portion of the spurious reflected signal on shiny plates reaches 7.1% (Fig. 8).

Fig. 8. The ratio of the useful and reflected signals in the holes for the cuvettes, when measured on shiny plates (the percentages for the reflected beam are indicated above)

On blackened plates, the portion of this signal does not exceed 0.2% (Fig. 9).

Fig. 9. The ratio of the useful signal and the reflected signal in the holes for the cuvettes, when measured on blackened plates (the percentages for the reflected beam are indicated above)

The reflected signal was measured in the holes for the cuvettes, and this is only one direction of propagation of the reflected rays, but the difference is very large, which clearly shows the positive effect of the black coating.

The signals from the blackened and shiny plates are compared in Fig. 10.

Fig. 10. The ratio of the useful signal to the parasitic signal resulting from reflections in the measurements on shiny and blackened plates

According to the graphs in Figs. 6 and 10 one can see another drawback with uncoated plates — unequal processing. Made at different times and with the use of different machines, they differ in reflectivity.

Although the reflected signal was only measured from the top cuvette holes, the overall picture can be assessed by comparing the difference of signals on blackened and shiny plates with the same hole diameters. Fig. 10 shows that more than half of the voltage value on the photodiode can be created due to reflection.

CONCLUSION

Based on the results of theoretical analysis and experiment, it can be concluded that the proposed method to reduce interference in the optical units of coagulometers are effective.

The useful signal may seem to be many times greater than any measured noise and the problem as such is not worth it. However, one should not forget that the criterion for recording the clot formation time is the relative change in the signal, and not its absolute value. In addition, reagents and blood plasma are themselves an obstacle to the path of the beam and greatly reduce the signal. When the reaction proceeds, especially when studying plasma with reduced hemostasis, the signal delta can be tens of millivolts.

The picture becomes even more complicated during immunological measurements, when the reagent itself changes the nature of the propagation of the parasitic signal for the worse.

Thoughtful design and technology can make the optical coagulometer a versatile system capable of performing a very wide range of hemostasis tests. High accuracy and the specificity of the results meet the most modern requirements of modern medicine in the field of diagnostics.

REFERENCES

1. Bokarev I.N., Doronina A.M., Kozlova T.V., et al. *Laboratornye metody issledovaniya sistemy svertivaniya krovi:*

- metodicheskie rekomendatsii, posobie* [Laboratory methods for testing the blood clotting system: guidelines, manual]. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya i sotsial'nogo razvitiya RF, Rossiiskaya assotsiatsiya trombozov i gemorragii i patologii sosudov im. A.A. Shmidta–B.A. Kudryashova, 2011. 15 p. (In Russ.).
2. Bruttsova N.A. [Advantages of automatic methods of hemostatic plasmic research in ischemic heart disease]. *Tromboz, gemostaz i reologia* [Thrombosis, hemostasis and rheology], 2008, no. 4(36), pp. 43–46. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=13062753> (In Russ.).
3. McCraw A., Hillarp A., Echenagucia M. Considerations in the laboratory assessment of haemostasis. *Haemophilia*, 2010, vol. 16, is. 5, pp. 74–78. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2010.02302.x
4. *Vse o koagulometrah* [All about coagulometers]. URL: <http://www.coagulometers.ru/index.htm> (accessed: 19.04.2022). (In Russ.).
5. Dolgov V.V., Svirin P.V. *Laboratornaya diagnostika narushenii gemostaza* [Laboratory diagnosis of hemostasis disorders]. Tver: OOO "Izdatel'stvo "Triada" Publ., 2005. 227 p. (In Russ.).
6. Dolgov V.V., Ovanesov E.N., Shchetnikov K.A. *Fotometriya v laboratornoi praktike* [Photometry in laboratory practice]. Moscow: Vysshaya shkola Publ., 2004. 142 p. (In Russ.).
7. Meinke M., Müller G., Friebe M., Helfmann J. Optical properties of platelets and blood plasma and their influence on the optical behavior of whole blood in the visible to near infrared wavelength range. *J. of Biomed. Opt.*, 2007, vol. 12, no. 1. DOI: 10.1117/1.2435177
8. Schubert F.E. *Light-Emitting Diodes. 2nd ed.* Cambridge, Cambridge University Press Segal AS, 2006. 422 p. (Russ. ed.: Shubert F.E. *Svetodiody. 2-e izd.* Translate A.Eh. Yunovich. Moscow: FIZMATLIT Publ., 2008. 496 p.).
9. Gusev V.G. *Ehlektronika i mikroprotsessornaya tekhnika: uchebnik* [Electronics and microprocessor technology: textbook]. Moscow, KNORUS Publ., 2013. 800 p. (In Russ.).
10. Bronić A., Herak D.C., Margetić S., Milić M. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: National recommendations for blood collection, processing, performance and reporting of results for coagulation screening assays prothrombin time, activated partial thromboplastin time, thrombin time, fibrinogen and D-dimer. *Biochemia Medica*, 2019, vol. 29, no. 2, Id: 020503. DOI: 10.11613/BM.2019.020503
11. Korovskii Sh.Ya. *Aviatsionnoe ehlektromaterialovedenie* [Aviation electroradiomaterial science]. Moscow, Mashinostroenie Publ., 1972. 355 p. URL: <https://search.rsl.ru/record/01007410945> (In Russ.).
12. Gusev V.G. *Poluchenie informatsii o parametrah i kharakteristikakh organizma i fizicheskie metody vozdeistviya na nego* [Obtaining information on the parameters and characteristics of the body and physical methods of exposure to it]. Moscow, Mashinostroenie Publ., 2004. 597 p. (In Russ.).
13. Linkins L.-A., Lapner S.T. Review of D-dimer testing: Good, Bad, and Ugly. *International Journal of Laboratory*

- Hematology*, 2017, vol. 39, is. S1, pp. 98–103. DOI: 10.1111/ijlh.12665
14. Török-Nagy B. Generation and characterization of D-dimer specific monoclonal antibodies for use in latex agglutination test. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 2, Id: e0212104. DOI: 10.1371/journal.pone.0212104
15. G&T PolymerTechnologies. *Reaktsiya lateks-agglyutinatsii* [Latex agglutination reaction]. URL: <http://gtpt.ru/primeneniya/lateksnaya-agglyutinatsiya/> (accessed: 15.04.2022). (In Russ.).

Contacts: *Lugovaya Polina Olegovna*,
polina_l@astra.ru

Article received by the editorial office on 25.04.2022