

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский Томский
политехнический университет»**

На правах рукописи

Розенбаум Юлия Андреевна

**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ
АВТОМАТИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОЦЕССА
АГГЛЮТИНАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ**

Специальность: 2.2.12 – Приборы, системы и изделия медицинского назначения
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
кандидат технических наук
Аристов Александр Александрович

Томск – 2025

Оглавление

| | |
|--|----|
| Введение..... | 4 |
| Глава 1. Биофизические основы и технические аспекты выявления специфической агглютинации эритроцитов | 10 |
| 1.1 Структура и функции антигенов мембраны эритроцитов крови человека | 10 |
| 1.2 Методы обнаружения специфической агглютинации эритроцитов в клинической лаборатории..... | 15 |
| 1.2.1 Выявление агглютинации эритроцитов с использованием солевого раствора моноклональных антител (целиклонов) | 17 |
| 1.2.2 Гелевая технология агглютинации эритроцитов в агаровом геле | 20 |
| 1.3 Обзор научных подходов выявления агглютинации эритроцитов для типирования группы крови человека..... | 23 |
| Выводы..... | 29 |
| Глава 2. Аналитические и экспериментальные исследования по возможности применения оптико-вибрационного метода анализа капельных проб для обнаружения процесса агглютинации при взаимодействии иммунного комплекса антигенов эритроцитов с антителами | 30 |
| 2.1 Анализ процессов, происходящих в капельном образце при специфической агглютинации эритроцитов человека и оценка возможности выявления реакции фотометрическим методом..... | 30 |
| 2.2 Применение фотометрии капель для обнаружения иммунных комплексов..... | 39 |
| 2.3 Разработка кюветы для проведения фотометрических исследований, предназначенной для оценки наличия агглютинатов в капельном образце при применении оптико-вибрационного метода анализа..... | 46 |
| 2.4 Моделирование распределения иммунных комплексов в кювете с выступом..... | 56 |
| 2.5 Оценка влияния механических колебаний на оптические свойства капли при иммунологических реакциях эритроцитов с антителами в исследуемом образце. | 64 |
| 2.6 Исследование влияния параметров кюветы и характеристик капельной пробы на результаты анализа. | 78 |
| 2.6.1 Исследование влияния объёма пробы солевого раствора моноклональных антител и цельной крови на оптические свойства капельного образца в процессе исследования. | 78 |
| 2.6.2 Определение соотношения реагентов иммунологической реакции и параметров кюветы для размещения капельного образца..... | 83 |

| | |
|--|-----|
| 2.6.3 Оценка влияния величины гематокрита образца и параметров кюветы на результаты исследования..... | 90 |
| Выводы..... | 96 |
| Глава 3. Макет устройства для автоматизированной оценки специфической агглютинации..... | 98 |
| 3.1 Структура и принцип работы устройства..... | 98 |
| 3.2 Программа для выявления группы крови человека оптико-вибрационным методом..... | 103 |
| 3.3 Алгоритм выявления агглютинации в исследуемом образце для автоматического определения группы крови..... | 105 |
| 3.4 Правила проведения исследований по типированию крови с использованием разработанного макета устройства..... | 108 |
| 3.5 Возможные ошибки при проведении анализа..... | 110 |
| Выводы..... | 112 |
| Заключение..... | 113 |
| Список литературы..... | 115 |
| Приложение А Внедрение результатов работы..... | 128 |
| Приложение Б Примеры фотометрических кривых образцов с наличием или отсутствием реакции агглютинации эритроцитов с моноклональными антителами..... | 132 |

Введение

Актуальность темы

Иммунологические методы находят широкое применение в лабораторной диагностике, так как обладают высокой чувствительностью и поэтому превосходят все другие методы исследования антигенов и антител. Одним из видов реакций метода иммунологического исследования являются реакции, основанные на феномене агглютинации. Агглютинация представляет собой склеивание клеток или отдельных частиц – носителей антигена с помощью иммунной сыворотки к этому антигену [27, 77].

Определение групповой принадлежности крови (типирование крови) используется в клинической практике перед переливанием крови, в гинекологии при ведении беременности, до и во время хирургических вмешательств [39, 56, 60, 81]. В лабораториях для типирования крови наиболее часто используются методы: определение группы крови с использованием солевого раствора моноклональных антител (цоликлонов) и метод агглютинации в геле [20]. В основе определения группы крови с использованием цоликлонов, лежит визуальная оценка наличия или отсутствия реакции агглютинации эритроцитов человека с моноклональными антителами (Приказ № 2 МЗ РФ от 05.10.2000). Данная методика проста в использовании, не требует пробоподготовки образцов крови для исследования. Недостатками вышеописанного способа являются длительное время анализа, большой расход реактива, а также влияние субъективного фактора на этапе интерпретации результата медицинским персоналом выполняемого анализа. Особенно вероятность ошибки возрастает при оценке образцов со слабой агглютинацией, которую сложно оценить визуально, что приводит к ложноотрицательным результатам. Человеческая ошибка может привести к неблагоприятному исходу трансфузии.

Современные автоматические анализаторы для типирования крови используют метод гель-карт, который подразумевает пробоподготовку, использование дорогостоящих реактивов, дополнительного специального

оборудования, что увеличивает стоимость и время анализа. На данный момент на рынке Российского медицинского оборудования отсутствуют анализаторы для автоматического определения группы крови с использованием моноклональных антител, способные конкурировать с имеющимися иностранными приборами.

Автоматизация метода определения группы крови является актуальной задачей, поскольку открывает новые возможности для обнаружения иммунных комплексов, позволяет снизить вероятность ошибки результата анализа, уменьшить расход реактивов и биоматериала [62, 64]. Тема диссертационной работы соответствует приоритетному направлению развития науки, технологий и техники в Российской Федерации - превентивная и персонализированная медицина, обеспечение здорового долголетия.

Целью настоящей работы является разработка метода автоматического выявления агглютинации эритроцитов человека с моноклональными антителами в микрообъёме и технических средств для его реализации.

Для достижения поставленной цели в рамках диссертационной работы необходимо решить следующие **задачи**:

1. Изучение возможности применения физико-химических методов для оценки наличия агглютинации эритроцитов в капельном образце пробы без специальной подготовки биоматериала.
2. Проведение анализа физических процессов, происходящих в капельном образце, содержащем цельную кровь и моноклональные антитела при протекании реакции гемагглютинации и применении механических колебаний к данной пробе.
3. Разработка и испытание кюветы для экспериментальных исследований, способствующей лучшему выявлению процесса агглютинации в образцах оптическим методом.
4. Обоснование и проведение экспериментальных исследований, направленных на определение характеристик исследуемого капельного образца (объем, соотношение реагентов и крови) и характера вибраций для лучшего выявления агглютинатов.

5. Проведение исследований по выявлению характера поведения фотометрических кривых для различных образцов крови, как с положительной, так и отрицательной агглютинацией, с целью накопления статистически значимой информации, позволяющей выявить критерий для автоматической оценки наличия или отсутствия агглютинации в образцах.
6. На основе лабораторных и теоретических исследований выработать основные технические требования к устройству для исследования процесса агглютинации эритроцитов, которые позволят сформировать общую конструкторскую концепцию построения портативного экспресс-анализатора оценки гемагглютинации.

Методы исследования:

Для решения поставленных задач использовали принципами поэтапного моделирования биотехнической системы с использованием математического моделирования конструкции устройств, физического моделирование процессов, системного анализа.

Достоверность полученных результатов диссертационной работы подтверждались сравнением полученных данных в разработанном макете устройства для выявления иммунных комплексов в пробе со значением, полученными при стандартном, ручным методом определения агглютинации, принятым в клинической лабораторной практике.

Научная новизна работы

1. Разработан новый метод выявления иммунных комплексов, образующихся при специфической агглютинации антигенов мембраны эритроцитов с моноклональными антителами реактива цоликлона на основе оптико-вибрационного метода анализа капельных образцов.
2. Доказано влияние горизонтальных механических колебаний на рост эритроцитарных агглютинатов в случае специфической агглютинации и определены основные режимы работы вибрационной платформы, способствующие лучшему выявлению агглютинатов на основе оптического метода.

3. Разработана конструкция и определены параметры кюветы, позволяющей отделить агглютинаты от реакционной среды в процессе вибрационных воздействий на капельный образец.

Реализация и внедрение результатов работы

Результаты исследований использованы при выполнении НИР «УМНИК». Макет устройства прошел апробацию в отделении клинической лабораторной диагностики НИИ онкологии Томского НИМЦ. Результаты работы использовали в отделении электронной инженерии ТПУ при подготовке бакалавров и магистрантов по направлению «Биотехнические системы и технологии».

Положения, выносимые на защиту:

1. Регистрация изменений оптических свойств пробы в виде лежащей капли при ее аксиальном просвечивании, содержащей моноклональные антитела и цельную кровь, после 90 секунд проведения реакции, позволяет автоматически выявлять иммунные комплексы в исследуемом образце по отношению b напряжения на выходе фотоэлектрического преобразователя канала с исследуемым образцом к напряжению канала контрольного образца: если $b \geq 3$, то проба считается положительной; если $b = (1 \pm 0,2)$ то проба отрицательна.
2. Применение горизонтальных механических колебаний капельного образца, включающего моноклональные антитела и цельную кровь, с использованием двух режимов вибрации, способствует объединению агглютинатов и отделению их от прозрачной части реакционной среды, что в 4 – 5 раз увеличивает светопропускание положительного образца. Первый этап режима вибрации: частота от 5 до 10 Гц, амплитуда 0,7 – 1 мм. Второй этап режима вибрации: частота 30 – 50 Гц, амплитуда 0,15 – 0,2 мм.
3. Достоверное выявление агглютинатов наблюдается при объёме анализируемого капельного образца от 16 до 20 мкл. При этом соотношение крови к цоликлону должно составлять 1:3 или 1:4. Установленные параметры образца позволяют выявлять наличие агглютинации в образцах с различным

гематокритом, что значительно сокращает расход реагентов, по сравнению с традиционным проведением анализа в планшетах. При этом выигрыш во времени анализа составляет не менее двух раз.

Апробация результатов работы.

Основные результаты диссертационной работы докладывались на следующих конференциях: Международная конференция “Новые информационные технологии в исследовании сложных структур”, г. Томск, ТГУ 2020 г (2022 г, 2024 г); Международной конференции молодых специалистов в области электронных приборов и материалов (EDM) г. Новосибирск (2021 г, 2023 г); Всероссийской научно-технической конференции студентов, молодых ученых и специалистов, “БИОМЕДСИСТЕМЫ” г. Рязань. (2022г, 2023 г); Международной научной конференции “Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии” (ФРЭМЭ) г. Владимир-Суздаль, 2022 г; Всероссийской молодежной научной конференции "Радиоэлектроника. Проблемы и перспективы развития" г. Тамбов, 2022 г.

Публикации. Основные результаты диссертационных исследований опубликованы в 16 научных работах: 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, проиндексированы в базах данных Scopus, 13 публикации в материалах докладов международных и всероссийских конференций, в их числе проиндексированных в международных базах данных WoS и Scopus – 3.

Диссертационная работа состоит из трёх глав.

В первой главе описаны современные научные подходы для автоматического выявления иммунных комплексов, образуемых при специфической реакции агглютинации антигенов мембраны эритроцитов и моноклональных антител. Содержится информация о структуре и функции антигенов мембраны эритроцитов человека. Рассмотрены современные подходы автоматического выявления процесса агглютинации эритроцитов.

Во второй главе подробно описаны исследования, направленные на создание и апробацию предложенного нами метода определения наличия иммунных комплексов (агглютинатов) антигенов мембраны эритроцитов и

моноклональных антител. Рассмотрены физические изменения в пробе, которые происходят при проведении исследований в капельных образцах. Выработаны требования к кюветам для размещения капельных образцов. Обоснован и экспериментально найден режим вибрации для капельных образцов, обеспечивающий большее различие оптических свойств. На основе анализа процессов и экспериментальных исследованиях определена форма кюветы для проведения анализов. Представлены результаты исследований и сделаны выводы о влиянии параметров капельного образца (соотношения крови к цоликлону, объём исследуемого образца) на результат исследования.

В третьей главе представлены результаты разработки макета устройства. Исходя из полученных результатов проведенных экспериментов, выработаны требования к макету устройства для автоматического определения группы крови человека. Разработана и описана методика проведения анализа, возможные ошибки при её исполнении.

Глава 1. Биофизические основы и технические аспекты выявления специфической агглютинации эритроцитов

Кровь – жидкая ткань, циркулирующая в кровеносной системе человека. Обеспечивает жизнедеятельность клеток, тканей в организме и выполнение ими различных физиологических функций. Кровь содержит форменные элементы (лейкоциты, эритроциты, тромбоциты). Эритроциты имеют важное значение в поддержании гомеостаза живого организма. Изменение содержания эритроцитов в крови человека может привести к различным заболеваниям крови и систем органов, а большой недостаток крови может быть причиной летального исхода. Поэтому при обильных кровопотерях используют переливание крови от человека к человеку. Переливание эритроцитов (эритроцитов), которые в настоящее время получают из донорской крови добровольцев, является важным методом лечения пациентов с хронической или острой анемией [58]. Эта форма клеточной терапии является неотъемлемой частью современных систем здравоохранения [27, 39, 81].

Для того, чтобы гемотрансфузия была безопасной и без развития осложнений у пациента, следует правильно выявить группу крови донора и реципиента. Обязательным тестом перед переливанием крови является проверка совместимости донора и реципиента. Точное и надежное определение группы крови имеет решающее значение перед переливанием крови [39, 54, 58].

В клинических лабораториях используются несколько методов для определения группы крови человека, но в научной сфере ведётся поиск перспективных методик и технических решений для обнаружения агглютинации эритроцитов для обеспечения безопасности переливания крови [62, 79].

1.1 Структура и функции антигенов мембраны эритроцитов крови человека

Кровь – жидкая и подвижная соединительная ткань организма, состоящая из плазмы и форменных элементов (лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов). Примерно 85% от форменных элементов крови это – эритроциты (красные клетки

крови) [27]. Участие эритроцитов в газообмене между тканями организма является важным составляющим для физиологического функционирования систем органов. Изменение содержания эритроцитов в организме приводит к различным патологическим состояниям человека.

Зрелые красные клетки крови (эритроциты) лишены ядра и органелл, характерных для большинства клеток, но они структурированы, так чтобы выполнять важную функцию доставки кислорода и удаления углекислого газа из всех других клеток, выдерживая давление, возникающее при перемещении по мелким сосудам и синусоидам [57, 93]. В мембране эритроцитов человека содержится более 300 различных антигенных детерминант, молекулярное строение которых закодировано соответствующими генными аллелями хромосомных локусов. Количество таких аллелей и локусов в настоящее время точно не установлено. Антигены эритроцитов являются внутренними или адсорбированными поверхностными структурами, которые могут вызывать специфический гуморальный иммунный ответ, приводящий к иммуноопосредованному гемолизу [57, 104].

Наличие или отсутствие специфических антигенов на поверхности эритроцитов и специфических антител в сыворотке крови определяют группу крови человека. Антигены группы крови эритроцитов представляют собой полиморфные, наследуемые углеводные или белковые структуры, расположенные на внеклеточной поверхности мембраны красных кровяных телец (эритроцитов) [53]. Они распознаются антителами, которые вырабатываются у антиген-отрицательных индивидуумов после воздействия антиген-положительных эритроцитов через переливание крови или беременность. Выработка антител к группам крови привела к идентификации многочисленных антигенов и фенотипов, включая естественные нокаутирующие (“нулевые”) фенотипы [91, 96].

Аминокислотная последовательность, в большинстве случаев предсказанная на основе последовательности нуклеотидов, позволила получить представление о топологии и возможных функциях белков, несущих антигены группы крови, но биологическое значение большинства антигенов группы крови еще предстоит

определить [50, 52]. В целом, полиморфизмы, которые мы распознаем как антигены группы крови и которые имеют важное значение в трансфузионной медицине, не оказывают заметного влияния на функцию конкретного компонента [31, 41, 63].

Понятие «группы крови» имеет двойное толкование. Обычно под группами крови имеют в виду четыре группы системы АВ0: первую – 0(I), вторую – А(II), третью – В(III) и четвертую – АВ(IV). В широком толковании понятие «группы крови» распространяется на все существующие антигенные различия клеточных и плазменных элементов крови человека [49, 96]. Известно 38 групповых антигенных систем и коллекций, включающих более 500 антигенов эритроцитов и белков плазмы, которые можно идентифицировать с помощью специфических антисывороток [41, 52, 57]. В настоящее время существует 43 системы групп крови, содержащие 345 антигенов эритроцитов человека, признанных Международным обществом переливания крови. Система групп крови включает унаследованные антигены с помощью одного гена или кластера из двух или более тесно связанных гомологичных генов и определяется серологически с помощью специфического антитела к антигену. Всего 43 системы группы крови генетически определяются 48 генами [50].

Группа крови АВ0 была впервые обнаружена в 1900 году Карлом Ландштейнером, продемонстрирована экспериментально путем перекрестного тестирования эритроцитов и сывороток, и классифицируется на тип А, тип В, тип АВ и тип О на основе пяти гликопротеиновых антигенов – А, В, АВ, А1 и Н – которые экспрессируются на поверхность эритроцитов позже. Кроме того, олигомеры АВН также присутствуют на поверхности других клеток и в жидкостях организма или выделениях [71].

Система АВ0 представлена двумя антигенами: А и В, которые находятся в мембране клеток. Отсутствие на эритроцитах указанных антигенов обозначают цифрой 0 или буквой О. Антитела анти-А и анти-В к антигенам мембраны эритроцитов, обозначаемые греческими буквами α и β (изогемагглютинины), имеют естественное происхождение. Различают 4 группы крови, образуемые сочетаниями антигенов А, В и изогемагглютининов α и β . На эритроцитах лиц

первой группы O(I), антигены A и B отсутствуют, в плазме крови присутствуют антитела α и β . У людей со второй группой крови, A(II), на эритроцитах имеется антиген A, в плазме присутствуют антитела β . Индивиды с третьей группой, B(III), имеют на эритроцитах антиген B, в плазме присутствуют антитела α . У лиц с четвертой группой, AB(IV), эритроциты несут антигены A и B, изогемагглютинины α и β в сыворотке крови отсутствуют. Антитела группы крови ABO в основном относятся к классу иммуноглобулинов класса M, которые вырабатываются без стимуляции антигеном [63, 86, 97].

Существуют разновидности (слабые варианты) антигена A (в большей степени) и реже антигена B. Что касается антигена A, имеются варианты: "сильный" A1 (более 80%), слабый A2 (менее 20%), и еще более слабые (A3, A4, Ax – редко). Это теоретическое понятие имеет значение для переливания крови и может вызвать несчастные случаи при отнесении донора A2 (II) к группе 0 (I) или донора A2B (IV) – к группе B (III), поскольку слабая форма антигена A иногда обуславливает ошибки при определении группы крови системы ABO. Правильное определение слабых вариантов антигена A может требовать повторных исследований со специфическими реагентами [60, 75, 102, 109].

Вторым значимыми антигенами после групповых антигенов A и B при переливании группы крови между донором и реципиентом является совместимость по резус фактору (резус-антигену, стандартный резус-антиген). В настоящее время группа крови по резус фактору включает 56 антигенов, из которых антигены D, C, c, E, e наиболее значимы для переливания крови, особенно антиген D [47, 48, 71]. Людей (потенциальных реципиентов) делят на резус положительных и резус-отрицательных по наличию в их эритроцитах именно этой разновидности резус-антигена. Тех, у кого антиген D присутствует, относят к резус-положительным, а тех, у кого он отсутствует, – к резус-отрицательным. Иной подход используют при оценке резус-принадлежности доноров. В том случае, если донор содержит одну из трех разновидностей резус-антигена [Rho (D), rh' (C) или rh" (E)] его причисляют к резус-положительным. Соответственно резус-отрицательными донорами считают только тех лиц, в эритроцитах которых нет ни одной из указанных разновидностей.

Такое разделение доноров на резус-положительных и резус-отрицательных позволяет исключить возможность сенсибилизации реципиента к резус-фактору при переливании компонентов крови и тем самым в значительной степени снизить риск посттрансфузионных осложнений. Разновидности rh' (C) и rh'' (E) редко присутствуют в эритроцитах по отдельности. По данным М. А. Умновой и Р. М. Уринсон [26], лица, в эритроцитах которых содержится только rh' (C), встречаются в 2,14 % случаев; rh'' (E)-разновидность – в 0,27 %; сочетание rh' (C) и rh'' (E) – в 0,08 % случаев. В подавляющем большинстве случаев (более чем в 95 %) эти разновидности представлены в эритроцитах в комбинации с Rho (D)-антигеном, поэтому в повседневной практике у реципиентов и в большинстве случаев у доноров определяют только Rho (D)-разновидность, естественно, если группа крови донора и реципиента совпадает.

Антигенные детерминанты Rh расположены на негликозилированных нефосфорилированных полипептидах с мол. массой 30 – 32 кДа [28, 55, 78]. Полипептиды RhD и RhcE представляют собой цепь из 12 связанных со скелетом мембраны доменов [61], пересекающих мембрану эритроцита от эндо- до экзоцеллюлярного уровня. Основная часть полипептида размещена в фосфолипидном бислое. На внешней стороне клетки домены соединены 6 выступающими над поверхностью мембраны петлями, на которых также могут располагаться серологически выявляемые Rh-антигены. N- и C-концевые участки полипептида погружены внутрь клетки [42, 43, 76].

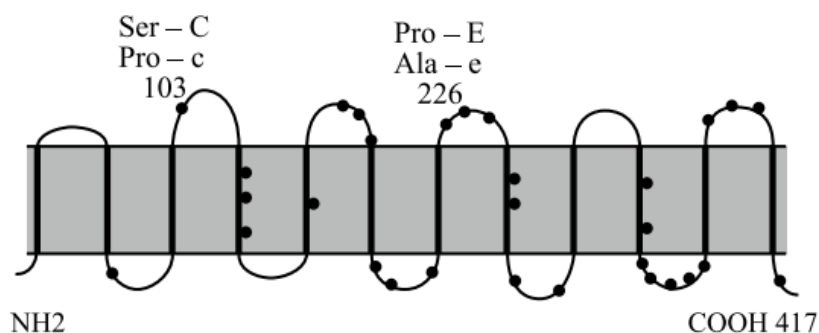


Рисунок 1.1 – Топология мембранных доменов Rh-Hr по Schenkel-Brunner [97].

Впервые в 1946 году выявлен слабый фенотип антигена D (D^u) у красных клеток крови человека. У таких людей экспрессируется уменьшенное количество антигена D на красных кровяных тельцах (эритроцитах), что вызывает слабую реактивность с анти-D антителами [92].

Сделаны научные подтверждения, что эритроциты со слабым D после трансфузии реципиенту D^- могут вызвать у него продукцию анти-D антител [94], а реципиенты со слабым D-антигеном после переливания им резус-положительной крови с нормально выраженным антигеном D могут вырабатывать резус-антитела [32]. Поэтому людей со слабым D-антигеном принято относить к D^- , если они являются реципиентами. Если люди со слабо выраженным D-антигеном (D^u) являются донорами, их причисляют к резус-положительным и их эритроциты переливают только резус-положительным больным. Поэтому при переливании крови от донора к реципиенту учитывают антигены резус-фактора.

В заключении хотелось бы отметить, что современная трансфузиологическая доктрина основывается на принципе: переливать кровь, идентичную по максимальному числу антигенных факторов, чтобы избежать появления агглютинатов в организме, которые могут вызвать серьёзные последствия для пациента [39, 81].

1.2 Методы обнаружения специфической агглютинации эритроцитов в клинической лаборатории

Определение группы крови человека является обязательным видом исследования в лаборатории перед проведением хирургических вмешательств, трансплантациях, гемотрансфузиях, оценки совместимости донора и реципиента, определения наличия резус-конфликта при планировании и ведения беременности. Определение группы АВ0 индивида может быть достигнуто с помощью различных методов. Молекулярные методы используются для определения генотипа, а затем прогнозирования фенотипа. Одним из недостатков этого метода типирования крови на основе ДНК является то, что в некоторых конкретных случаях

наблюдается несоответствие между генотипом АВ0 и фенотипом. Это связано с тем, что ген кодирует не сам антиген, а фермент, катализирующий реакцию, которая определяет наличие или отсутствие А, В или О антигенов на мембране эритроцитов. Генетические методы не адаптированы к быстрым методам определения группы крови из-за сложного оборудования для осуществления анализа, а также стоимости и времени для него [59, 80, 96].

Поэтому в клинических лабораториях используется иммунный метод анализа типирования человека, основанный на выявлении иммунологической реакции (агглютинации) исследуемой крови и реактива. Иммунологическая реакция основана на образовании агглютинатов при взаимодействии комплементарных антигенов и антител. Типирование крови проводится на основе традиционного серологического тестирования и классифицируется на прямое и обратное [90, 96, 103]. Прямое типирование включает обнаружение антигенов мембраны эритроцитов на основе агглютинации эритроцитов со специфической антисывороткой. В исследуемой крови определяем антигены. К прямому типированию относят метод стандартных сывороток (используются стандартные сыворотки), метод цоликлонов (используются моноклональные антитела). Обратное типирование используется для определения присутствия или отсутствия антител в плазме или сыворотке (используются стандартные эритроциты).

В современных лабораториях для определения группы крови в основном используется 2 вида анализа: выявление агглютинации эритроцитов с использованием солевого раствора моноклональных антител (цоликлонов) и гелевая технология агглютинации эритроцитов в агаровом геле. Далее будут описаны эти 2 основных метода обнаружения специфической агглютинации эритроцитов в клинической лаборатории.

1.2.1 Выявление агглютинации эритроцитов с использованием солевого раствора моноклональных антител (цоликлонов)

Определение группы крови человека с использованием цоликлонов является самым распространённым и используемым методом в современных клинических лабораториях. Цоликлоны – синтетические заменители сывороток, которые содержат в своем составе искусственные заменители агглютининов типов α и β (синтетические антитела к антигенам мембраны эритроцитов). Они называются эритротестами «Цоликлон анти-А» (имеют розовый цвет), а также «анти-В» (имеют синий цвет). Тест-системы на основе моноклональных антител часто готовят смешением антител, продуцируемых несколькими клеточными линиями, повторяя тем самым поликлональную композицию аллогенных антител, созданных природой. С помощью цоликлонов определяется наличие антигенов в мембране эритроцитов исследуемой крови по наличию иммунологической реакции в виде агглютинатов. Агглютинаты визуализируются в пробах невооружённым глазом в виде мелких крупинок.

Главное отличие цоликлонов от стандартных сывороток это очень высокая активность и авидность, то есть время наступления и выраженность реакции агглютинации (склеивания), а также отсутствие сопутствующих контаминирующих протеинов. В клинической практике используются цоликлоны: анти-А, анти-В, анти-АВ, анти-А слабый, анти- D и другие.

Проведение типирования крови человека по системе антигенов АВ0:

- 1) необходимо яркое освещение помещения и температура воздуха 15 – 25 °С;
- 2) анализ проводится в планшете, где необходимо промаркировать лунки планшета: Анти-А, Анти-В, Анти-АВ;
- 3) в подписанные лунки вносится по одной капле (приблизительно 0,1 мл) соответствующего маркировки реагентов Анти-А, Анти-В, Анти-АВ;
- 4) в каждую лунку с реактивом вносится по одной маленькой капле исследуемой крови (0,01 – 0,03 мл) рядом с большой каплей каждого реагента;

- 5) в каждой лунке необходимо смешать моноклональные антитела и кровь, используя отдельную стерильную стеклянную палочку;
- 6) плавно покачиваем планшет 2,5 – 3 минуты. Обычно агглютинаты формируются в течение 5 – 10 секунд. Запас времени необходим для обнаружения слабых вариантов антигенов.

Оценку результатов наличия реакции агглютинации в лунках проводят визуально для каждой лунки отдельно. Наличие хлопьев, мелких крупинок свидетельствует о положительной пробе, и считается, что антиген присутствует в мембране эритроцитов (рисунок 2.3). Если среда гомогенная, значит проба отрицательная и антиген не содержится в мембране исследуемых эритроцитов (рисунок 2.1).

Отрицательный результат агглютинации реакции во всех трех лунках показывает отсутствие антигенов в исследуемой крови. Группа крови в таком случае считается первой (0(I)). При наличии агглютинации крови с Анти-А и Анти-АВ говорит о наличии в мембране эритроцитов антигена А. Групповая принадлежность такого образца крови ставится второй (А(II)). Реакция в лунках с Анти-В и Анти-АВ указывает на наличие антигена В в мембране эритроцитов. Групповая принадлежность исследуемой крови считается третьей (В (III)). Если наблюдается реакция агглютинация во всех трех лунках, значит антиген А и В присутствует в мембране эритроцитов и группа крови определяется как четвёртая АВ(IV) (таблица 1.1) [75].

При наличии отрицательной агглютинации исследуемой крови с Анти-А цоликлоном проводится тест на выявление агглютинации с анти-А слабым цоликлоном, для точного определения группы крови. В случае обнаружения агглютинации крови с анти-А слабым цоликлоном, следует считать, что мембрана эритроцитов содержит антиген А.

Таблица 1.1 – фенотипы АВО, определяемые при типировании крови человека:

| Сыворотка крови | Реакция сывороток с эритроцитами | | | Эритроциты | Реакция эритроцитов с изогемагглютинами | | | Фено-тип | Генотип |
|-----------------|----------------------------------|---|---|------------|---|---|---|----------|-----------|
| | О | А | В | | αβ | β | α | | |
| Оαβ | – | + | + | О | – | – | – | О | ОО |
| Аβ | – | – | + | А | + | – | + | А | АО или АА |
| Вα | – | + | – | В | + | + | – | В | ВО или ВВ |
| АВo | – | – | – | АВ | + | + | + | АВ | АВ |

Важное значение при гемотрансфузиях, ведении беременности имеет антиген (белок) мембраны эритроцитов – резус-фактор. Поэтому определение резус-фактора является обязательным анализом для типирования группы крови человека. Резус-типирование крови в основном определяет наличие или отсутствие D-антигена в эритроцитах с помощью соответствующих антител. При необходимости проводят анализы по определению антигенов С, с, Е, е в мембране эритроцитов аналогичным методом [71].

Вывод о наличии или отсутствии антигена D в мембране эритроцитов даётся после смешивания крови с цоликлоном анти-D. При обнаружении агглютинации крови с анти-D цоликлоном, результат считается D-положительный – это значит, что резус-положительный, эритроциты содержат антиген D. Если в исследуемом образце нет реакции агглютинации, значит результат D-отрицательный, резус-отрицательный, нет антигенов D в красных клетках крови [15].

Слабые или частичные D-антигены могут присутствовать, например у новорожденных с D-отрицательными матерями, из-за уменьшения антигенных участков или потери внеклеточных D-эпитопов (9-13). В таких случаях прямой тест на агглютинацию с реагентом против D может привести к ложноотрицательным результатам, и агглютинацию можно наблюдать только с реагентом против иммуноглобулина человека [71].

1.2.2 Гелевая технология агглютинации эритроцитов в агаровом геле

Гелевая технология в микропробирках (ГТМ) была предложена Y. Lapiere в 1989 г. Метод основан на агглютинации эритроцитов в агаровом геле "сефадекс", помещенном в микропробирки [68, 74].

Обычно система представляет собой пластиковые карты, содержащие микропробирки, заполненные гелем (патент DiaMed AG, Швейцария). На гель наносятся эритроциты или смесь эритроцитов и сыворотки. Клетки всегда вносятся перед сыворотками - в отличие от стандартных серологических методик - с тем, чтобы тестируемые сыворотки не контактировали с гелем, что особенно важно при проведении антиглобулинового теста. После инкубации следует центрифугирование в строго определенном режиме. Если условия центрифугирования не выполняются (центрифугирование недостаточно длительное или слишком мягкое) могут иметь место ложноположительные результаты. Ложноотрицательные результаты также могут иметь место при нарушении условий (форсировании) центрифугирования [20, 79].

Исследуемая кровь добавляется в верхнюю часть микропробирок диагностических карт, и при центрифугировании осуществляется разделение агглютинированных и неагглютинированных эритроцитов следующим образом: неагглютинированные эритроциты имеют размер, сравнимый с размером частиц геля и свободно проходят сквозь них под действием центробежной силы, формируя на дне микропробирки компактный осадок красного цвета – отрицательный результат; агглютинированные эритроциты ввиду больших размеров задерживаются на поверхности геля или в его толще – положительный результат.

В зависимости от силы реакции агглютинации в гелевой среде принята следующая оценка полученных результатов (рисунок 1.2):

- сильноположительный (++++) – образовавшиеся агглютинаты эритроцитов задержались на поверхности геля;
- положительный (+++) – агглютинаты располагаются в верхней трети столбика геля;

- слабopоложительный (++) – агглютинаты фиксированы в верхних двух третях геля;
- очень слабopоложительный (+) – агглютинаты располагаются в нижней трети геля;
- отрицательный (-) – эритроциты формируют на дне микропробирки компактный осадок.

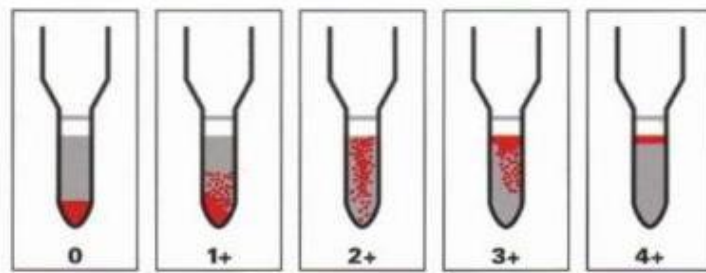


Рисунок 1.2 – Вид гель-карт, содержащей разные степени реакции агглютинации в геле

Для проведения анализа требуется следующее:

- 1) ID-карты для определения антигенов эритроцитов и антиэритроцитарных антител;
- 2) ID-центрифуга для центрифугирования карт;
- 3) термостат на +37°C;
- 4) штатив для пробирок и карт;
- 5) пробирки вместимостью 5 и 10 мл;
- 6) пипетки полуавтоматические одноканальные (10, 25, 50 мкл);
- 7) перчатки резиновые хирургические;
- 8) раствор для разведения 1 (раствор бромелина);
- 9) раствор для разведения 2 (раствор низкой ионной силы – LISS, РНИС);
- 10) 0,9% раствор хлорида натрия;
- 11) стандартные типированные эритроциты человека для выявления антител и проведения перекрестной реакции.

Существует автоматизация методов типирования крови с помощью анализаторов.

Анализатор ORTHO VISION (далее VISION) представляет собой автоматизированный инструмент иммуногематологии *in vitro*, который использует технологию гелевых карт ID-MTS с цифровой обработкой изображений для проведения тестирования на образцах пациентов. Этот анализатор автоматизирует несколько этапов процесса тестирования, таких как жидкостное пипетирование, обработка реагента, инкубация, центрифугирование, сортировка и интерпретация реакции с помощью цифровой обработки изображений и управление данными [69, 93].

Известен прибор Erytra® (DiagnophicGrifols S.A., Barcelona, Spain) – это новый полностью автоматизированный анализатор иммуногематологии с высокой пропускной способностью, прибор с высокой обрабатывающей способностью для проведения тестов на совместимость перед переливанием крови с использованием методики агглютинации в геле [45].

Существующие анализаторы для типирования крови имеют в первую очередь преимущество в снижении влияния ошибки медицинского персонала на интерпретацию результата анализа. Но следует учитывать, что методики для определения группы крови в анализаторах требуют пробоподготовки, что увеличивает время анализа и не даёт возможности использовать данные анализаторы в экспресс-лабораториях или для экспресс-определения группы крови человека, что является недостатками используемых анализаторов в лаборатории [88].

Каждый из серологических методов основан на гемагглютинации и, следовательно, подвержен влиянию субъективных факторов, что затрудняет стандартизацию и снижает точность [40, 87]. Поэтому обязательно проверяют тип крови по системе АВ0 перед переливанием её. Тем не менее, не существует специфической антисыворотки или технологии, которые могли бы гарантировать обнаружение всех редких, слабых или вариантных антигенов. Более того, некоторые заболевания, такие как острый миелоидный лейкоз, могут снижать уровень антигенов группы крови [25, 109]. Поэтому в научной сфере ведётся поиск решения по снижению возможности ошибки определения группы крови человека.

1.3 Обзор научных подходов выявления агглютинации эритроцитов для типирования группы крови человека

В обзорных статьях по способам и сенсорам для типирования крови, представлено состояние данного вопроса на сегодняшний день. В статьях отмечено, что несмотря на существующие принятые в медицинской практике методы исследования групповой принадлежности крови, постоянно появляются новые технологии определения группы крови: технологии на основе бумажных полосок, биосенсоры, микрофлюидные устройства, чипы, методы на основе секвенирование генов и т. д., которые могут достаточно точно определять группы крови, но имеют длительный цикл данного исследования и/или высокие затраты. Отмечается, что большинство новых методов тестирования имеют дополнительную подготовку биоматериала к проведению исследования, что увеличивает время анализа, а также вероятность влияния человеческого фактора на анализ.

Для повышения достоверности анализа по типированию крови необходимо увеличивать разрешающую способность метода, чтобы различать присутствие агглютинатов эритроцитов в исследуемой пробе и их отсутствие. В первом случае, когда образуются иммунные комплексы с эритроцитами (агглютинаты, «положительная реакция»), во втором случае, если тот же образец крови не агглютинирует, эритроциты остаются в основном состоянии («негативная, отрицательная» реакция). Способность различать эти два типа реакции на основе различия регистрируемых при исследовании параметров предполагается в качестве показателя разрешающей способности метода для регистрации процесса агглютинации эритроцитов. Аппараты для типирования группы крови могут регистрировать реакцию агглютинации различными методами и на основе различных физических явлений, например, фотометрией, нефелометрией, спектроскопией, цифровой фотографией и т.д. [71, 94].

Приведем некоторые подходы, которые предлагаются для оценки агглютинации эритроцитов.

В последнее время в ряде исследований используется бумажная диагностика для определения типа крови человека [38, 51, 64]. Этот метод основан на принципе реакций гемагглютинации эритроцитов исследуемой пробы и антител, которые находятся на бумажной подложке. В качестве критерия определения группы крови является длина полосы капиллярной крови, которая может быть определена после помещения биоматериала на бумажную подложку. При агглютинации клеток крови с бумажной подложкой длина полосы капиллярной крови будет уменьшаться. И наоборот, если эритроциты не несут соответствующие антигены к антителам, нанесенным на бумагу, они не будут агглютинировать и останутся в виде свободных клеток. Таким образом, длина полосы капиллярной крови увеличивается до максимального уровня [62, 67].

Известен ещё один метод выявления иммунных комплексов с использованием бумажной диагностики [64, 105]. Метод оценки основан на способности антигенов эритроцитов связываться с антителами, которые содержатся на бумаге пористой структуры. Образец крови вносится на бумагу, предварительно обработанную антителами, если происходит реакция агглютинации, то агглютинаты остаются в пористой структуре бумаги и не могут быть удалены при промывке растворами. И наоборот, при отсутствии реакции агглютинации, кровь легко вымывается.

Хроматографические методы тестирования основаны на использовании бумаги, но каждый из которых использует различные принципы, касающиеся взаимодействия аналитов, образцов и метода промывки. Один метод следует принципам хроматографии, позволяя моющему раствору элюировать несвязанные клетки крови в боковом направлении вдоль структуры бумаги (впитывание). Этот метод использовался для групп ABO и RhD [29]. Второй использует метод сквозного прохождения, при котором промывается бумага и по принципу фильтрации иммунные комплексы остаются на бумаге [64, 70, 105]. Также усовершенствование бумажной технологии предлагается в [44].

Недостатками бумажного метода является необходимость использования достаточного количества крови для теста, а также могут наблюдаться

ложноотрицательные значения анализа при низкой антигенной силе связывания крови, так как сила связывания антигена и антитела не одинаковых у разных людей.

Известен способ определения группы крови с помощью тест-набора, который состоит из полоски для анализа, раствора для промывания и приспособлений для отбора крови (патент RU 2475758, опубл. 20.02.2013) [22]. В основе данного метода определения группы крови лежит наличие проагглютинировавших эритроцитов, оставшихся на местах реакции. Анализ производят с помощью полоски, предварительно покрытой антителами анти-А или анти-В и промывающего раствора.

Широкое распространение получила регистрация агглютинации на основе анализа изображений агглютинатов. Методом цифровой фотографии используется в автоматизированной системе микропланшетов PK7200® (Olympus Diagnostics). ПЗС-камера регистрирует изображение осадка эритроцитов (или агглютинатов эритроцитов) на дне кюветы со специальной формой [65]. Форма рисунка, распределение клеток на дне кюветы анализируются в цифровой форме, что даёт возможность оценить тип реакции («положительный» или «отрицательный»). В основном проблематика подобных систем основывается на разработке алгоритма анализа изображения для быстрого и точного получения информации об агглютинатах на основе снимков в горизонтальных или вертикальных планшетах [83, 89, 99].

В области разработки систем типирования крови на основе анализа изображений, и в целом исследований по разработке способов оценки реакции гемагглютинации, из российских исследователей нам известны лишь работы Дубровского Валерия Александровича и его коллег (Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского, кафедра медбиофизики) [16, 17, 18]. Для повышения разрешающей способности оптических методов регистрации агглютинации эритроцитов ими было предложено использовать воздействие стоячей ультразвуковой волны на смесь «кровь – сыворотка – физиологический раствор» [16]. При облучении этого раствора под воздействием ультразвука в кювете формируется стоячая ультразвуковая волна, приводящая к группировке

эритроцитов и их иммунных комплексов в области узлов. Этот метод называется «акустооптическим методом» регистрации агглютинации эритроцитов и, следовательно, определения группы крови. Он основан на совместном воздействии ультразвука на реакционную смесь кровь-сыворотка с оптическим зондированием смеси. В итоге оценка наличия процесса агглютинации происходит методом анализа полученных снимков реакционной смеси. Эти исследования продолжаются, и в основном направлены на улучшение алгоритма обработки данных [17].

Из анализа литературных источников можно заключить, что наибольшее число исследований в области разработки систем оценки гемагглютинации базируется на исследовании диагностических систем, основанных на микрофлюидной диагностике и создании чипов для данного анализа.

В работе Huet M. описывается микрофлюидный чип, изготовленный литьем под давлением, содержащий встроенные реагенты для типирования крови по методу АВ0. Капля крови наносится на кончик биочипа и находящиеся в биочипе реагенты способны образовать иммунологическую реакцию с эритроцитами исследуемого образца. Визуализация агглютинации внутри биочипа достигается путем видеозаписи. Видеозапись происходит с использованием микроскопа. Интерпретация исследования происходит через 2 минуты. В исследовании разработана система для наблюдения агглютинации эритроцитов в режиме реального времени. Недостатками метода являются определение 1 биочипом агглютинации с 1 только видом антигена и невозможность использование биочипа повторно [62].

Основными проблемами вышеописанных подходов являются разработка алгоритма математической обработки результатов, выбор метода пробоподготовки для получения оптимальных метрологических параметров способа и устройства.

Alter H.J. с коллегами в лаборатории разработали устройство, которое позволяет определять группу по системе АВ0 [30]. Группу крови АВ0 на прототипе определяют с помощью антител против группы А и В (NOVACLONE из Immucor Gamma), которые вызывают агглютинацию. После короткого

центрифугирования в течение 3 мин при 220 g свободные эритроциты проходят через мембрану во второй полости на дне пробирки или в случае гемагглютинации красные клетки остаются на поверхности мембраны. Присутствие свободных эритроцитов, собранных в нижней части тестового блока, детектируется с помощью поглощения светового излучения в инфракрасном (ИК) диапазоне.

В работе Chang Y. J. [46] описан чип, который представляет плоский диск с реагентами в каналах. Под действием центробежных сил при раскручивании диска возникают течения и происходит перераспределение клеточных компонентов в каналах. По окончании исследования происходит контроль результатов визуально или с использованием видеорегистрации.

В исследованиях Kagimi S. [66] представлен метод, сочетающий в себе пассивный микрофлюидный сепаратор плазмы крови и детектор групп крови, что позволяет создать микрочип, способный определять группу крови как прямым, так и косвенным методом. Предлагаемая конструкция отделяет клетки крови от плазмы путем приложения к ним гидродинамических сил. Различия между агглютинированными и неагглютинированными образцами были различимы невооруженным глазом, а также подтверждались анализом частиц на микроскопических изображениях.

В работе Yamamoto K. et al. представлен автоматический прибор для определения группы крови. Прибор проводит последовательные процессы разведения цельной крови, ее гомогенизации и реакции с реагентами. В устройстве (чипе) высокая чувствительность достигается за счет использования реакционных камер толщиной 50 мкм, в которых можно получить четкий контраст между агглютинацией эритроцитов и непрореагировавшими эритроцитами [108].

Sklavounos A. A. et al. представил цифровое устройство для считывания и обработки изображения с реакционных каналов биочипа [101].

Nam S. W. с коллегами предложил способ обнаружения гемагглютинации с использованием 3D-микрофлюидных (микрокапиллярных) систем и оптической регистрации результата исследования. 3D-печать позволяет создавать микрожидкостные структуры для диагностических устройств. Перемешивание

жидкости в микрожидкостных чипах затруднено из-за ламинарного течения. Для возможности перемешивания жидкости внутри чипов изготовлены трехмерные микрожидкостные чипы со встроенными микроканалами и микрочейковыми структурами. Капли крови задерживаются в микрочейках и вступают в реакцию с антителами. Определение агглютинации эритроцитов с антителами происходит за счет разницы во внешнем виде [82, 85].

В исследованиях Wang X. et al. [107], Shigeyuki Uno et al. [106], а также Hiroki Ashiba et al. [37] типирование крови проводилось с использованием метода обнаружения гемагглютинации на основе спектрального сенсора волноводного типа.

Создано микрожидкостное устройство для определения группы крови с пальцевым управлением [85]. Устройство состоит из пневматических каналов и микроформ, куда предварительно загружены реагенты и 3% бычий сывороточный альбумин. Для определения группы крови разработка содержит четыре независимых жидкостных канала. Каждый канал управляется пневматическими клапанами и камерой приведения в действие. Результат отображается с помощью микрожидкостных каналов с буквами и символами (рисунок 1.3).

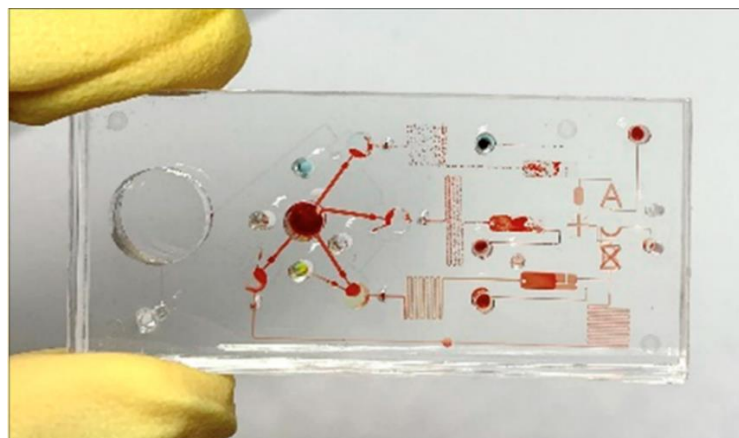


Рисунок 1.3 – Микрожидкостное устройство для определения группы крови человека [85]

Выводы

На основе проведённого анализа можно заключить, что на данный момент внедренные в медицинскую практику современные автоматические анализаторы для типирования крови используют метод гель-карт, который подразумевает пробоподготовку и дополнительное оборудование. Данные анализаторы для типирования крови имеют ряд преимуществ, в первую очередь снижение человеческих ошибок, но и недостатки. Методики для определения группы крови в анализаторах требуют проведения пробоподготовки, использование большого количества реагентов, что ведёт к увеличению стоимости анализа, также невозможно их использование для экспресс-определения группы крови так как время анализа занимает не менее 30 минут.

Поэтому автоматизация типирования крови человека по системе АВ0 остаётся важной задачей в связи с распространённостью этого типа лабораторных исследований. Кроме того важна, разработка и валидация быстрых, экономичных, простых анализаторов групп крови на месте оказания медицинской помощи, которая может использоваться для оценки на совместимость непосредственно перед переливанием крови, а также для быстрого определения группы крови в чрезвычайных ситуациях или в отдалённых районах, где доступ к лабораторному оборудованию ограничен [72, 110].

Глава 2. Аналитические и экспериментальные исследования по возможности применения оптико-вибрационного метода анализа капельных проб для обнаружения процесса агглютинации при взаимодействии иммунного комплекса антигенов эритроцитов с антителами

В разработке методик и технических средств для исследования каких-либо процессов, протекающих в пробе, необходимо учитывать биологические, биофизические, технические, экономические и эргономические аспекты. При этом выбираемый принцип исследования должен быть точным и информативным по отношению к изучаемому явлению. Методика для клинико-диагностического анализа должна обладать высокой чувствительностью, воспроизводимостью, надёжностью. Физические принципы работы устройства для осуществления клинико-диагностического метода должны основываться на характерных особенностях изучаемого процесса или явления. Метод оценки обязан соответствовать исследуемым биофизическим и биохимическим явлениям, происходящим в исследуемом объекте. Это особенно важно для исследования медицинских процессов и объектов, к которым относится разрабатываемая методика оценки агглютинации в капельном образце и прибора для её осуществления. Выявление таких явлений и закономерностей позволят выработать необходимые технические требования, на основе которых можно провести конструирование прибора для осуществления соответствующего клинико-диагностического метода.

2.1 Анализ процессов, происходящих в капельном образце при специфической агглютинации эритроцитов человека и оценка возможности выявления реакции фотометрическим методом

Наши исследования направлены на создание и апробацию нового метода определения наличия в исследуемой пробе иммунных комплексов (агглютинатов) антигенов мембраны эритроцитов и моноклональных антител (целиклонов) [4, 6, 8, 11]. В клинической лаборатории для определения наличия антигенов определённого

вида в мембране эритроцитов человека используют солевой раствор соответствующего антитела (цоликлона). При смешивании крови и цоликлона возможно осуществление иммунологической реакции, если встречаются в пробе комплементарные антиген и антитело. В таком случае считается, что мембрана эритроцитов содержит данный вид антигенов и проба считается положительной для исследуемого антигена. Если же после смешивания не образуются иммунные комплексы (агглютинаты), значит антигены отсутствуют в мембране эритроцитов и проба считается отрицательной. Рассмотрим физические изменения в пробе, которые происходят при проведении исследований на выявление иммунологической реакции в планшете. По методике, проводимой в лаборатории для выявления реакции агглютинации, в планшет вносят несколько капель солевого раствора моноклональных антител (цоликлона) и в 2 – 3 раза меньше исследуемой цельной крови. Затем необходимо перемешать с помощью стеклянной/пластиковой палочки реагенты или путём покачивания планшета, а после визуально оценить наличие иммунных комплексов.

На рисунке 2.1 представлена фотография планшета с пробой, в которой отсутствует иммунологическая реакция (отрицательная реакция). Визуально проба с образцом крови, где не произошла реакция агглютинации, остается мутной, непрозрачной, однородной. Поэтому при фотометрии таких проб значение светопропускания будет минимальным.



Рисунок 2.1 – Фотография пробы крови с моноклональными антителами, в которой отсутствует иммунологическая реакция

Фотографии на рисунках 2.2 и 2.3 отражают результат протекания иммунологических реакций крови с цоликлоном. На рисунке 2.2 представлена фотография иммунных комплексов в начале проведения анализа. Как видно из фотографии в начале исследования образуются мелкие агглютинаты. Со временем мелкие агглютинаты объединяются в крупные (рисунок 2.3). В процессе образования агглютинатов происходит изменение дисперсности среды, что делает образец более гетерогенным. И уже на начальном этапе образования иммунных комплексов видны прозрачные небольшие зоны в местах отсутствия агглютинатов (рисунок 2.2).

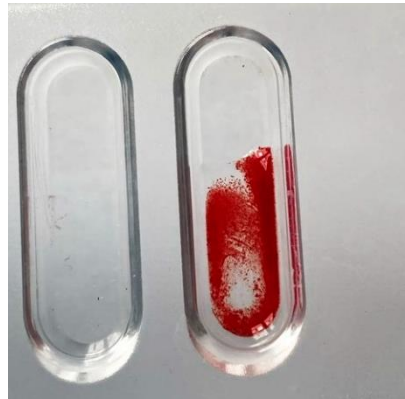


Рисунок 2.2 – Фотография пробы крови с моноклональными антителами, в которой произошла иммунологическая реакция. Начальный этап – образование мелких агглютинатов

Из фотографии рисунка 2.3 заметно, что в результате объединения мелких агглютинатов в крупные происходит ещё большее изменение дисперсности среды. Происходит отделение агглютинатов клеток от прозрачной среды. В местах пробы, где нет агглютинатов, среда гомогенная и прозрачная. Поэтому можно предположить, что при фотометрии проб, содержащих иммунные комплексы (положительные), величина светопропускания будет выше, чем в пробах, в которых отсутствуют иммунные комплексы (отрицательные).



Рисунок 2.3 – Фотография пробы крови с моноклональными антителами, в которой произошла иммунологическая реакция

Разная дисперсность среды в отрицательных и положительных пробах на реакцию агглютинации, даёт возможность использовать фотометрический метод, для обнаружения агглютинатов в исследуемых пробах.

Предполагается, что различие в дисперсности среды, при одинаковой объемной доле дисперсной фазы, будет давать разную интенсивность проходящего через образец света (светопропускания) для отрицательной и положительной пробы. Согласно данной схеме исследования, световой поток, прошедший через образец, попадает на фотоприёмник, преобразуется в выходной электрический сигнал пропорциональный его интенсивности светового потока и оценивая зависимость выходного напряжения фотопреобразователя от времени, мы получим кривые, по которым можно судить о процессах в анализируемых пробах в любой момент исследования. Так как дисперсность среды будет меняться в процессе реакции или будет отсутствовать в случае отрицательной пробы, по изменению интенсивности регистрируемого электрического сигнала можно выявить наличие, степень агглютинации клеток в образце или ее отсутствие.

Чтобы подтвердить данную гипотезу, были проведены эксперименты по фотометрии образцов, содержащие иммунные комплексы, в плоской горизонтальной кювете, представляющей собой цилиндрическое углубление в пластине из гидрофобного прозрачного материала (рисунок 2.4). Диаметр кюветы составлял 6 мм. Образец состоял из цельной крови и цоликлона в соотношении 1:3. Были взяты объёмы исследуемых образцов 16 мкл, 32 мкл, 48 мкл. Таким образом,

при увеличении объема у нас увеличивалась толщина просвечиваемого слоя. Планшет с кюветами размещался на вибрационной платформе. Исследования проводились с частотами от 10 до 25 Гц. Продолжительность вибрационного воздействия составляла 5 минут. Механическое воздействие необходимо для активации образования иммунных комплексов, подобно тому, как по методике определения агглютинации в лаборатории, используется перемешивание или покачивающие движения в планшете. В процессе исследования проводилось вертикальное фотометрирование образцов (источник света находился под кюветой, приемник – над ней). Диаметр зондирующего пучка составлял 3 мм. На рисунке 2.4 представлены фотографии проб с положительной реакцией агглютинации, сделанные после 5 минут исследования. На рисунке 2.5 приведены соответствующие кривые зависимости напряжения с фотоэлектрического преобразователя (ФЭП), регистрирующего прошедший через образец свет от времени, отражающие светопропускание анализируемых образцов.

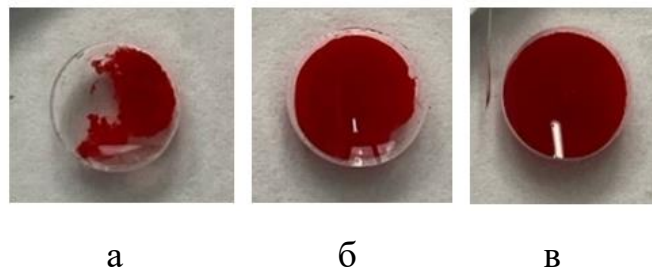


Рисунок 2.4 – Фотография образцов, расположенных в плоской горизонтальной кювете. Исследуемый образец содержит иммунные комплексы. Соотношение крови и цоликлона 1:3, объёмы образцов: а – 16 мкл, б – 32 мкл, в – 48 мкл

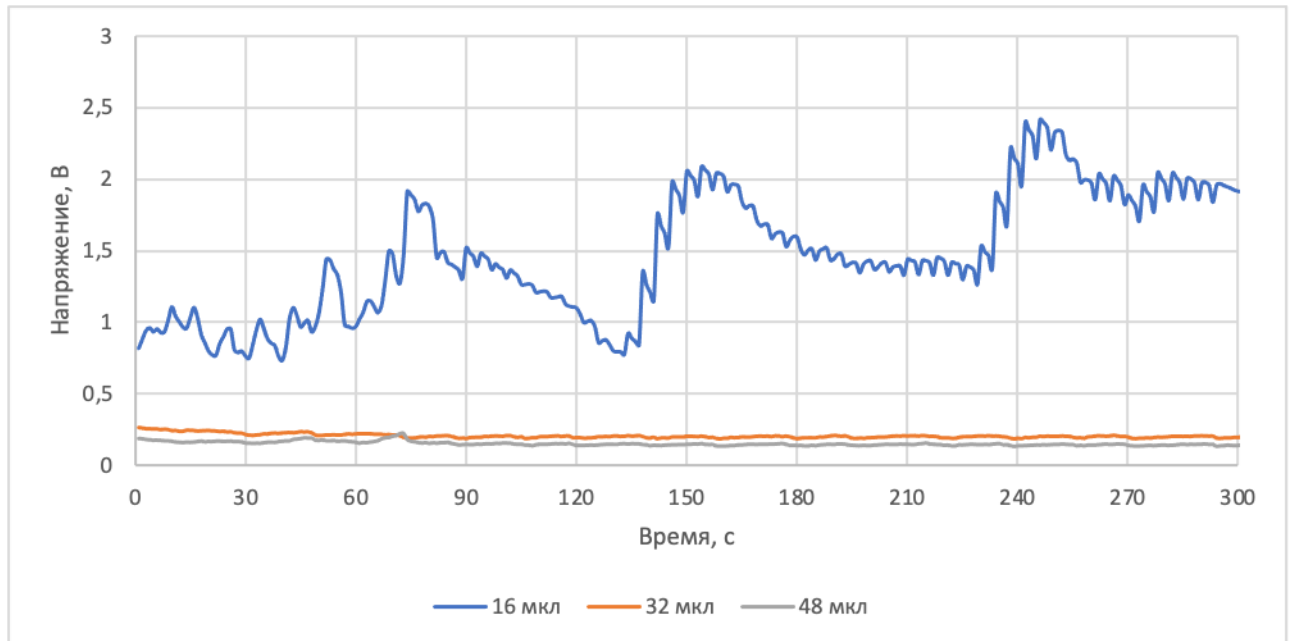


Рисунок 2.5 – Пример графика зависимости напряжения с ФЭП от времени при наличии агглютинации в образце. Плоская кювета. Соотношение цельной крови к цоликлону 1:3

По кривым напряжения от времени видно, что светопропускание пробы со временем увеличивается в кювете с объемом образца 16 мкл. Исходя из данных рисунка 2.5, следует отметить, что наблюдаются значительные колебания сигнала, которые можно связать с перемещением агглютинатов в образцах. В кюветах, которые имеют больший объем анализируемой пробы, заметного изменения светопропускания нет. Данный факт можно связать с увеличением толщины просвечиваемого слоя анализируемого образца из-за увеличения объема. Так при объеме 16 мкл толщина образца составляет 0,56 мм, при 32 мкл – 1,132 мм, при 48 мкл – 1,698 мм. При объеме проб 32 и 48 мкл образовавшиеся иммунные комплексы расположились по всей площади кюветы и образовывали значительной толщины слой клеток и дальнейшее применение механических колебаний не увеличивало светопропускание такой пробы. Поэтому важное значение имеет объем и соотношение исследуемой пробы к параметрам кюветы.

Проведены опыты, где сравнивался характер поведения кривых светопропускания образцов крови в плоских кюветах с наличием и отсутствием процесса образования иммунных комплексов при воздействии на планшет механических колебаний частотами 10 – 25 Гц. Исследуемые образцы были взяты

объёмами 20 мкл, соотношение крови к цоликлону 1 к 3. На рисунке 2.6 приведены фотографии проб после реакции. На рисунке 2.7 представлены результаты фотометрии данных образцов.



а

б

Рисунок 2.6 – Фотография образца крови, расположенного в плоской горизонтальной кювете после 5 минут исследования: а – исследуемый образец содержит иммунные комплексы, б – исследуемый образец не содержит иммунные комплексы. Соотношение крови и цоликлона 1:3, объёмы образцов 20 мкл

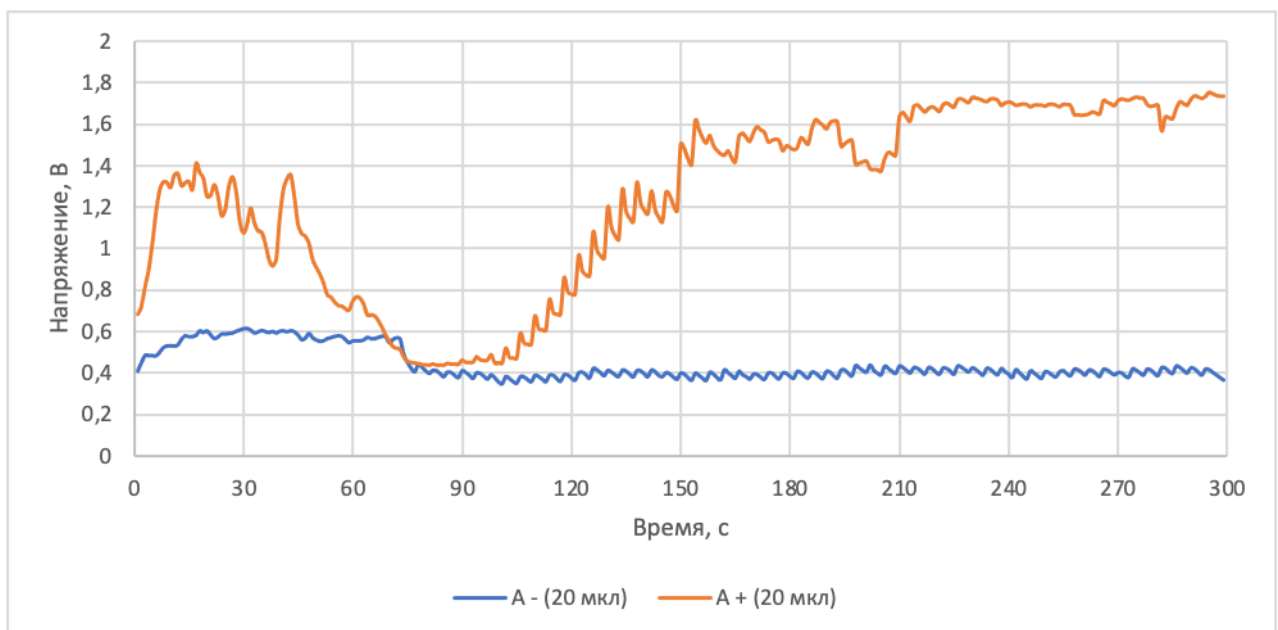


Рисунок 2.7 – График зависимости напряжения с ФЭП от времени при наличии (A+) и отсутствии (A-) агглютинации в образце плоской кюветы. Соотношение цельной крови к цоликлону 1:3, гематокрит 41

Из рисунка 2.6а видно, что при наличии агглютинации в исследуемом образце появляются прозрачные зоны, что даёт увеличение напряжения на графике светопропускания (рисунок 2.7). В ходе исследования на 100 образцах крови со значением гематокрита от 20 до 50 показано, что разница напряжения с ФЭП в конце исследования относительно начального значения напряжения (до образования иммунных комплексов) составляет от 0,3 до 1 В. Если сравнивать

светопропускание положительных и отрицательных образцов, то видно значимое различие по кривым зависимости напряжения от времени. Светопропускание проб, не содержащих иммунные комплексы, уменьшается после полного перемешивания крови и цоликлона, среда становится однородной, непрозрачной и при дальнейшей вибрации светопропускание образца не изменяется. Схематичное прохождение светового потока через положительные и отрицательные пробы представлено на рисунке 2.8, где показано, что часть лучей от источника излучения при прохождении через образцы рассеиваются в случае попадания на иммунные комплексы, либо отдельные эритроциты при отсутствии агглютинации.

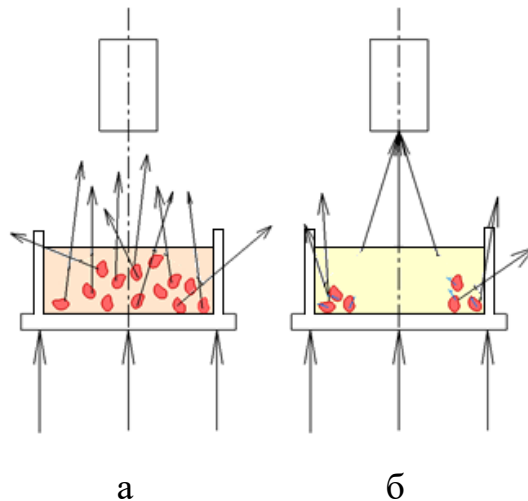


Рисунок 2.8 – Схематичное изображение прохождения светового потока через образец (кровь + цоликлон) в плоской кювете: а – отсутствие иммуннологической реакции крови с цоликлоном; б – наличие реакции агглютинации эритроцитов с цоликлоном в пробе

Эффект рассеяния будет значительно преобладать в образцах без агглютинации. В пробах же где образовались иммунные комплексы при небольшой толщине просвечиваемого слоя часть излучения проходит через просветленные участки без рассеяния, тем самым увеличивается интенсивность прошедшего светового потока.

Данный факт просветления образца является очевидным и на данном принципе теоретически может быть построено техническое устройство, позволяющее автоматически выявлять пробы, где есть или нет агглютинация клеток.

Однако на данный момент нам не известно ни одного серийно выпускаемого устройства для автоматизированной оценки процесса специфической агглютинации эритроцитов, построенного по данному принципу. Не смотря на очевидность факта изменения дисперсности и соответствующего изменения оптических свойств, возникает ряд трудностей, которые необходимо устранить, чтоб применить метод, основанный на оценке светопропускания, для автоматической оценки процесса.

Так, несмотря на наличие просветления образцов в случае положительной агглютинации в виду перемещения агглютинатов по объёму образца в процессе проведения эксперимента, будет происходить случайное перекрывание агглютинатами светового потока и наблюдаются значительные флуктуации светового потока, поэтому, несмотря на общий рост сигнала с фотоприемника возможны резкие скачки выходного напряжения (рисунок 2.5), что может привести к ложноотрицательному результату при автоматической оценке.

Из-за возможных ложноотрицательных результатов данная методика не используется в автоматических анализаторах в клинических лабораториях для проведения анализа агглютинации. Решить данную проблему возможно путём локализации агглютинатов в одной части пробы и интегрирования светового потока, выходящего из просвечиваемого образца, что позволит получить более монотонное нарастание кривой светопропускания образца [8].

Среди российских разработчиков, занимающей автоматизацией данного анализа, есть исследования, где для решения данной задачи (локализация и укрупнение агглютинатов) используются стоячие ультразвуковые волны [16, 17, 18]. Но в их работах для выявления агглютинации используется анализ видео изображения, что усложняет конструкцию прибора.

Как показали наши экспериментальные исследования и анализ литературных данных, чаще всего ошибка в анализе группы крови и резус фактора при визуальной оценке реакции возникает в случае слабого взаимодействия между антителом и антигеном, в результате чего образуются мелкие, неустойчивые комплексы, которые очень трудно различить глазом. И результат бывает заметен

лишь спустя 5 – 10 минут. Это также может привести к ложноотрицательному результату. В большинстве исследований, где описываются инструментальные методики оценки агглютинации, приводятся результаты поставленные, как правило, на пробах, где однозначно присутствует агглютинация, выявляемая глазом. Результаты исследований со слабой агглютинацией – не приводятся.

2.2 Применение фотометрии капель для обнаружения иммунных комплексов

Нами предлагается оптический метод регистрации наличия или отсутствия агглютинации эритроцитов с использованием анализируемой пробы крови с цоликлоном не в плоской кювете, а в виде лежащей капли, который ранее был использован для оценки динамики оседания эритроцитов [1, 2, 3, 6, 9, 10, 14, 34]. Схема реализации данного способа представлена на рисунке 2.9.

Образцы крови при исследовании (фотометрировании) размещаются между вертикально соосно расположенными источниками и приемниками оптического излучения в виде лежащей капли. Источник оптического излучения расположен под капельной пробой, а приемник оптического излучения – над ней. Кюветы для размещения капельных проб исследуемой биологической жидкости, выполнены из гидрофобного прозрачного материала.

Чтобы выявить наличие слабых агглютинатов, необходимо создать условия, которые позволили бы их укрупнить и в дальнейшем сепарировать их от прозрачной жидкой фазы.

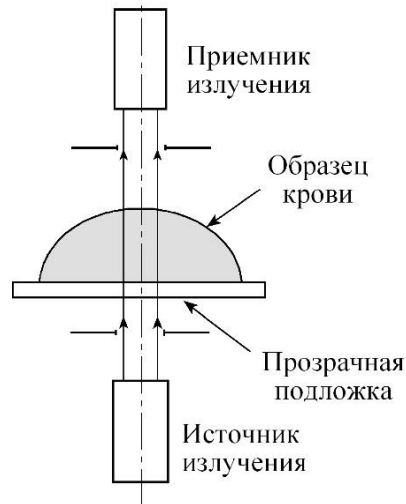


Рисунок 2.9 – Схема реализации метода фотометрирования капельной пробы, расположенной на прозрачной гидрофобной поверхности

Предполагается, что в процессе агглютинации после отделения агглютинатов от прозрачной среды, на поверхности кюветы будет образовываться слой из иммунных комплексов, а над ними будет формироваться прозрачная среда, которая может выполнять роль фокусирующей линзы. В результате этого весь световой поток, прошедший через капельный образец, будет фокусироваться на фотоприёмнике, расположенном в фокусе капли-линзы и при этом, уменьшатся колебания сигнала с фотоприемника при случайном перемещении агглютинатов в плоскости кюветы.

Ранее применение метода фотометрии капель для оценки реакции гемагглютинации было ранее рассмотрено Жогло Е.В., Аристов А.А., Рафальский А.С., Евтушенко Г.С. в работе “Исследование возможности использования метода фотометрирования капельных образцов для оценки реакции гемагглютинации” (Известия ЮФУ. Технические науки. 2010. № 8). Однако в данных исследованиях использовалась статичная капля и наблюдалась зависимость изменения выходного сигнала не только от степени агглютинации, но и от величины гематокрита и спонтанной агрегации эритроцитов образца, что затрудняло оценку результатов исследования.

Для опытов были использованы стандартные сыворотки с разным титром и цельная кровь. Перед измерением светопропусканием пробы исследуемый образец перемешивали пипеткой прямо в капле, для образования иммунных комплексов.

Результаты исследований показали низкую повторяемость результатов эксперимента и малые изменения величины светопропускания капельного образца при наличии агглютинации эритроцитов в нём. Поэтому данная методика не даёт однозначно сделать заключение о наличии иммунных комплексов в образце. Использование единожды перемешивания образца перед исследованием недостаточно, чтобы выявить разницу между пробами, где иммунные комплексы присутствуют и отсутствуют. Более того, нельзя предположить появление агглютинатов в определённом месте капельного образца, поэтому это влияет на повторяемость результатов исследования. Поэтому необходим поиск факторов, которые способны повлиять на локализацию иммунных комплексов внутри капли. Нами так же было замечено в экспериментах с капельными образцами и подтверждено анализом публикаций других авторов, в которых представлены исследования вибрирующих жидких капель [19, 84, 93], что при вибрации в каплях происходит возникновение течений, которое может привести к перераспределению компонентов образца по объёму капли. В исследованиях было показано, что колеблющиеся микролитровые капли жидкости ускоряют процесс смешивания примерно на два порядка [93]. Было показано, что движением капель на поверхности можно управлять с помощью вибрации. Поэтому механические вибрации заданной амплитуды и частоты могут локализовать агглютинаты в определенной области исследуемой капли. В идеальном случае необходимо переместить агглютинаты на периферию основания окружности капли и освободить ее центральную область, сделав её прозрачной, что усилит фокусирующие свойства образца.

Вибрационное воздействие должно дополнительно усилить процесс образования агглютинатов в капельном образце. Вибрация капель может осуществляться путем возвратно-поступательного перемещения в горизонтальной плоскости вибрационной платформы, на которой размещается кювета с образцами крови. Применение механических воздействий на капельный образец на протяжении всего исследования может являться фактором, который будет

способствовать перемешиванию, объединению и перераспределению иммунных комплексов.

Ранее в опытах по фотометрии капель использовались кюветы, имеющие плоское основание. Чтобы расположить иммунные комплексы в определённом месте в капельном образце ставится под вопрос возможности применения кюветы с плоским основанием. В данном случае иммунные комплексы могут занять всю поверхность дна кюветы, что не приведёт к значительному увеличению светопропускания образца положительной пробы. Кюветы, использованные в данной работе будут модернизированы, так как дно кюветы может способствовать локализации иммунных комплексов в определённых местах кюветы, а именно в центральной или периферической области.

Кювета в исследуемом методе будет иметь определённый диаметр, который способствует удерживанию капли выбранной величины. Также диаметр кюветы должен быть согласован с диаметром пучка зондирующего светового потока. В разрабатываемом методе обнаружения агглютинации эритроцитов световой поток будет ограничен диаметром капельного образца, таким образом при исследовании светопропускание модулируется всей площадью капли.

Капля жидкости может обладать фокусирующими свойствами. Наличие фокусирующих свойств капельного образца подтверждается проведёнными экспериментами, где исследовалось изменение интенсивности светового потока напряжения от расстояния между фотоприёмником и капельным образцом. Примеры кривых зависимости напряжения от положения фотоприёмника над капельным образцом от расстояния над каплей представлены на рисунке 2.10. Как видно из рисунка 2.10, над капельными образцами, содержащие иммунные комплексы или физиологический раствор имеется область (фокус), где повышается плотность светового потока. Если образец содержит кровь и цоликлон, между которыми нет иммунологической реакции, то при удалении от капли величина фиксируемого светового потока уменьшается.

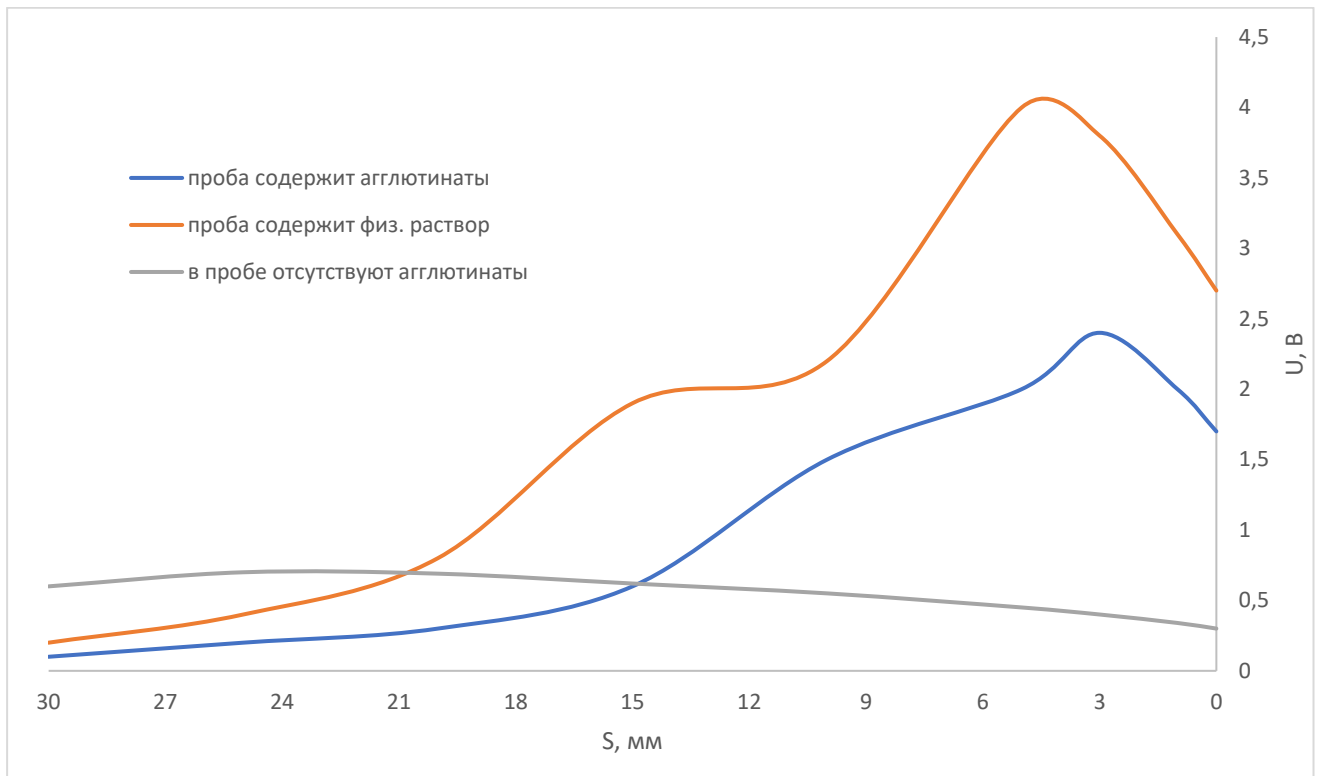


Рисунок 2.10 – Графики зависимости напряжения от расстояния между фотоприёмником и капельными образцами (соотношение цельной крови к цоликлону 1:3, объём 16 мкл, гематокрит 41)

На основе полученного результата следует, что капельный образец обладает фокусирующими свойствами и при дальнейших экспериментах фотоприёмник нужно устанавливать в фокусе капли-линзы, образующейся при наличии иммунологической реакции в капельном образце.

Методика проведения исследований по фотометрии капель

Для автоматического определения наличия агглютинатов в исследуемом образце по разрабатываемой методике необходимо на специальном планшете создать капельные образцы. Для этого в измерительную кювету автоматической пипеткой-дозатором вносится цельная кровь и агглютинирующий реагент (цоликлон) в определённом объёме и соотношении. После нанесения реагентов и крови на поверхности кювет должны быть сформированы устойчивые лежащие капли, основание которых полностью растекается по периметру кюветы (не допускается растекание капли за границу периметра кюветы и наличие в ней пузырьков воздуха).

Данная система помещается в камеру фотометрического прибора, подается питание к механизму, создающему вибрации капле в горизонтальной плоскости. В ходе вибрации капельный образец аксиально, снизу просвечивается потоком оптического излучения. Фотоприемник, расположенный над образцом в фокусе капли-линзы принимает прошедший через образец световой поток, сигнал усиливается и записывается на ПК. Нахождение позиции фокуса капли осуществляется путем поиска позиции фотоприемника, в котором наблюдается наибольшей интенсивности сигнал при перемещении приемника верх-вниз над прозрачным образцом, имеющим такой же объем что и исследуемая в эксперименте капля. При этом образец жидкости должен быть прозрачным. В экспериментах в качестве такой жидкости мы использовали раствор цоликлона, поскольку он составляет основной объем реакционной прозрачной среды, образовавшейся после агглютинации эритроцитов.

Все вычисления, вывод графиков и запись данных, полученных в ходе исследований выполняет персональный компьютер (ПК), который использует компьютерную программу, написанную в среде LabView [24].

Интенсивность светового потока, попадающего на фотоприемник, определяется оптическими свойствами просвечиваемого образца и меняется с течением времени в зависимости от процессов, протекающих в капельной пробе. В случае изучения процесса гемагглютинации увеличение прозрачности среды наблюдается вследствие уменьшения дисперсности среды при образовании эритроцитарных агглютинатов, что схематично отражено на рисунке 2.11.

Исходя из вышеописанных наблюдений, можно предположить наличие зависимости величины тока фотометрического канала от геометрии полукапельной пробы и оптических свойств просвечиваемой среды, которые определяются физическими и физико-химическими процессами, протекающими в пробе. В свою очередь, на оптические свойства среды оказывает локализация агглютинатов кювете, на что может повлиять форма кюветы и характер механических воздействий на пробу [4, 5].

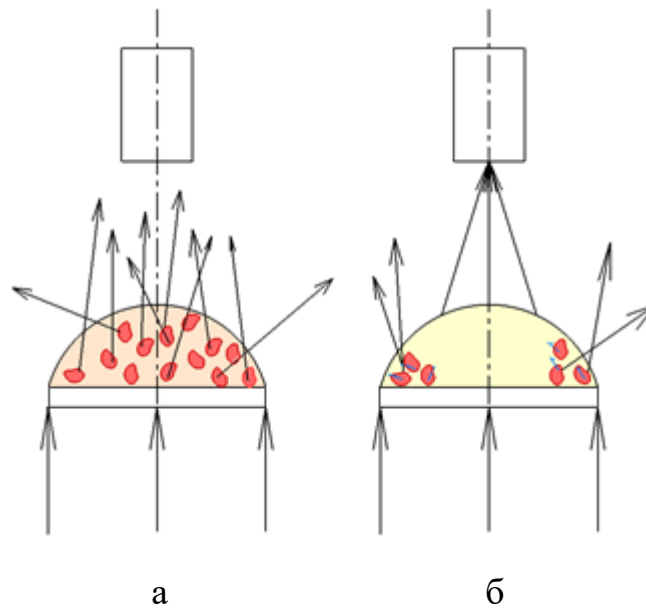


Рисунок 2.11 – Схематическое изображение прохождения светового потока через образец (кровь + цоликлон) в виде лежащей капли: а – отсутствие иммунологической реакции крови с цоликлоном; б – наличие реакции агглютинации эритроцитов с цоликлоном в пробе

Основным критерием оценки степени изменения оптических характеристик капельных образцов в ходе исследования будет служить введённая нами величина U_{max} . Это максимальное значение напряжения с ФЭП, зарегистрированное после 90 с исследования в образце. Исходя из значений U_{max} можно делать вывод о наличии или отсутствии иммунных комплексов в исследуемом образце. Для автоматического определения положительной или отрицательной пробы необходимо сравнение значения исследования с контрольным образцом. Поэтому введена физическая величина (b), которая показывает отношение напряжений с ФЭП исследуемой пробы и контрольной. Величина будет находиться по формуле:

$$b = U_{max} / U_{max \text{ контр}} \quad (1)$$

где U_{max} – максимальное значение напряжения, зарегистрированное после 90 с исследования в пробе;

$U_{max \text{ контр}}$ – максимальное значение напряжения, зарегистрированное после 90 с исследования в контрольной пробе.

С целью увеличения разрешающей способности метода необходимо добиться получения максимальной разницы в значении между контрольной пробой и положительной на реакцию агглютинации пробой.

Далее будут описаны исследования и полученные результаты, связанные с выявлением наиболее подходящих параметров оптической измерительной системы с целью наиболее точного выявления наличия или отсутствия иммунных комплексов в исследуемом образце с помощью фотометрии капель.

Задачи экспериментальных исследований

Можно выделить основные задачи, выполнение которых позволит решить обозначенную выше проблему – выявление иммунных эритроцитарных комплексов на основе оптического метода с высокой точностью:

- определить характеристики вибрационной системы, которые способствовали бы более быстрому образованию иммунных комплексов в образце, даже в случае слабой агглютинации.
- разработать конструкцию фотометрической кюветы для размещения пробы, которая бы позволяла отделять образовавшиеся иммунные комплексы от прозрачной части реакционной среды при вибрации образцов.
- определить объём капельного образца и соотношение крови и цоликлонов в исследуемом образце.

2.3 Разработка кюветы для проведения фотометрических исследований, предназначенной для оценки наличия агглютинатов в капельном образце при применении оптико-вибрационного метода анализа

Место нахождения иммунных комплексов является вероятностным явлением, так как точно сказать, где и когда образуются агглютинаты, какой величины они будут невозможно. Поэтому использование кюветы в виде лунки с плоским основанием не даёт возможности с высокой достоверностью в ряде

случаев фотометрическим методом определить реакцию агглютинации в капельном образце.

Поэтому были выработаны требования к кюветам для размещения капельных образцов. Кювета должна быть изготовлена из прозрачного гидрофобного материала и иметь форму, обеспечивающую сохранение формы капли (не выходить за пределы основания кюветы) при вибрации. Кювета должна способствовать лучшему объединению мелких агглютинатов в крупные и отделению иммунных комплексов от прозрачной жидкой части для увеличения светопропускания образца и обеспечить при этом высокую повторяемость результатов. Под локализацией иммунных комплексов подразумевается размещение максимального количества агглютинатов в одном месте кюветы, в центре её или на периферии (чтобы часть образца была прозрачна для оптического излучения).

При первых исследованиях с использованием кювет, имеющих плоское основание (рисунок 2.12 в), для размещения капель (кровь + цоликлон), в процессе образования агглютинатов даже при наличии механических колебаний, иммунные комплексы, как правило, занимают всю поверхность кюветы. Это не даёт возможности использования фотометрического метода выявления агглютинатов. Так как светопропускание в такой пробе меняется незначительно (рисунки 2.14).

Поэтому для определения процесса агглютинации в капельном образце с использованием фотометрического метода были рассмотрены кюветы с разной формой поверхности (рисунок 2.12). Нами было предложено 3 вида формы поверхности кюветы: кювета с плоским основанием, кювета с углублением в центре основания, кюветы с выступом в центре основания. Путём изготовления на фрезерном станке из листового полиметилметакрилата (органического стекла) были изготовлены кюветы с различными параметрами.

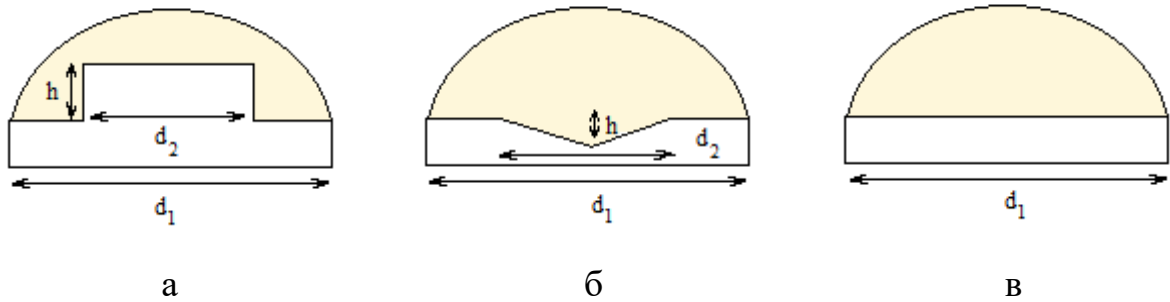


Рисунок 2.12 – Схематичное изображение экспериментальных кювет с капельным образцом: а – кювета с выступом в центре; б – кювета с углублением в центре, в – плоская кювета (h – высота выступа или углубления, d_1 – диаметра кюветы, d_2 – диаметр выступа)

Для всех видов кювет были проведены эксперименты с капельными образцами (объём 16 мкл, соотношение крови к цоликлону 1 к 3) при применении механических колебаний частотой 10 и 55 Гц. Время исследования 2 минуты. Цоликлоны А, В и Д были взяты для проведения исследований. Результаты экспериментов отражены в графике зависимости напряжения от времени (рисунок 2.14).

После проведения экспериментов в плоской кювете образуется слой иммунных комплексов, который занимает всю площадь основания кюветы, это видно из фотографии, представленной на рисунке 2.13. Поэтому можно сделать вывод, что при использовании в экспериментах механических воздействий на кюветы с ровной горизонтальной поверхностью не даёт возможности использования фотометрического метода выявления агглютинатов. Так как изменение светопропускания в такой пробе практически отсутствует (рисунок 2.14).

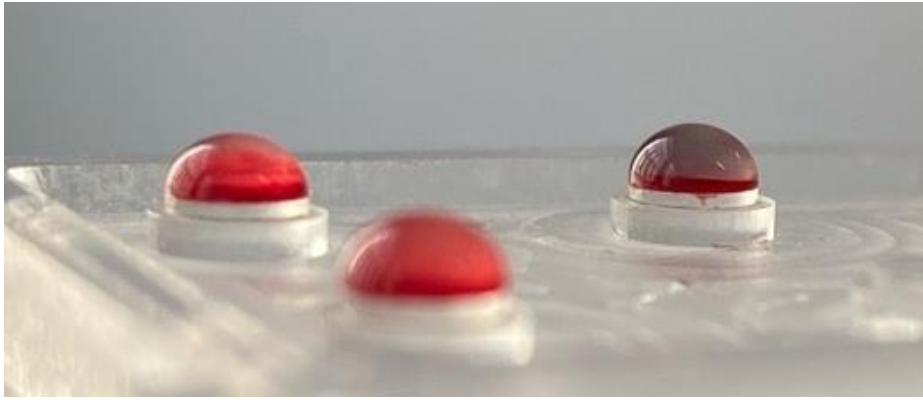


Рисунок 2.13 – Фотография капельного образца, расположенного в плоской горизонтальной кювете. Исследуемый образец содержит иммунные комплексы. В каплях виден осевший слой из агглютинатов

Исходя из графиков, представленных на рисунке 2.14 для плоских кювет, напряжение не значительно увеличивается со временем при применении механических колебаний к кюветам с положительными образцами на иммунологическую реакцию.

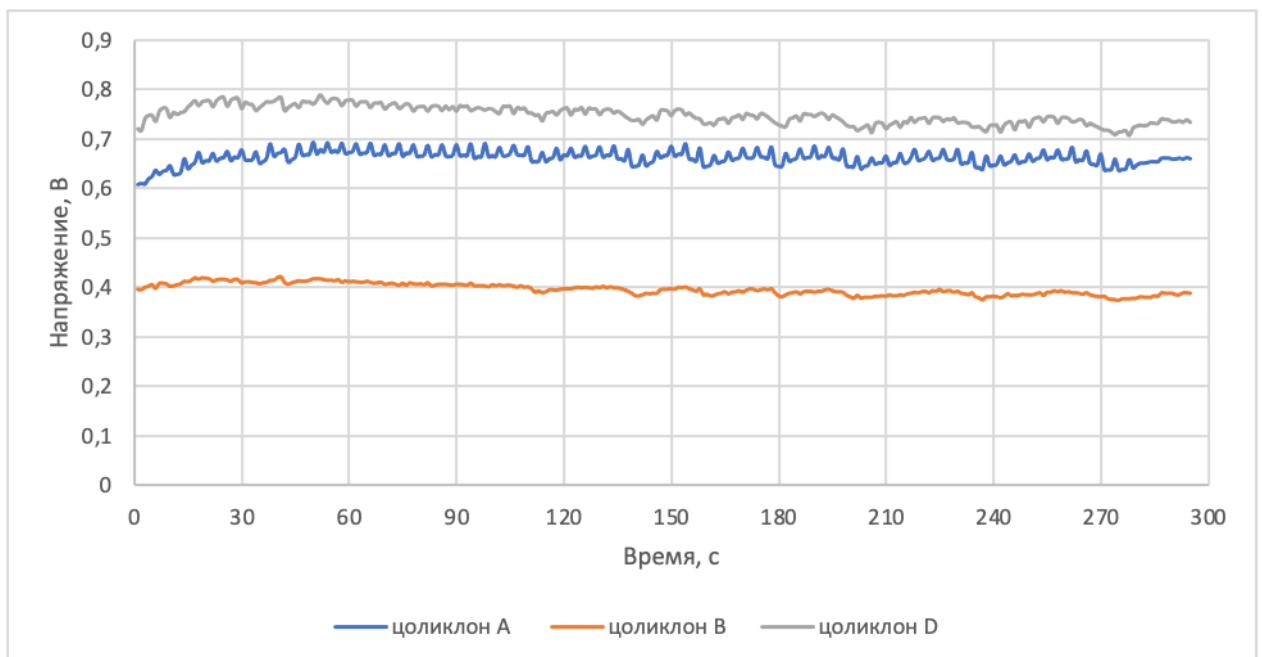


Рисунок 2.14 – График зависимости напряжения от времени при наличии агглютинации в капельном образце кюветы с плоским основанием (соотношение цельной крови к цоликлону 1:3, объём 16 мкл, гематокрит 41)

Иммунные комплексы образовались и осели на дне капельного образца, покрыв всю площадь кюветы. Верхняя часть капли прозрачная, но ввиду наличия агглютинатов на всей поверхности кюветы светопропускание такого образца очень

низкое из-за. Поэтому кюветы с плоским дном не подходят для выявления иммунологических комплексов в исследуемых капельных образцах.

Второй вид испытанных нами кювет был с углублением в центре (рисунок 2.15). Предполагалось, что иммунные комплексы будут собираться в центре кюветы, а края кюветы будут освобождаться от агглютинатов и световой поток будет проходить через прозрачные участки капли свободные от иммунных комплексов. Схематично прохождение светового потока через кювету изображено на рисунке 2.15 [4].

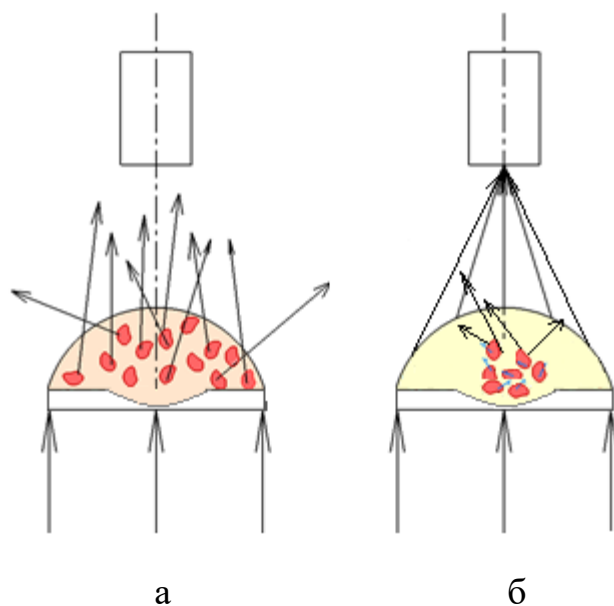


Рисунок 2.15 – Схематичное изображение прохождения светового потока через образец (кровь + цоликлон) в виде лежащей капли в кювете с углублением, а – отсутствие иммунологической реакции крови с цоликлоном, б – наличие реакции агглютинации эритроцитов с цоликлоном в пробе

Для того, чтобы подтвердить гипотезу о локализации иммунных комплексов в центре кюветы, при наличии углублений провели серию опытов с кюветами, имеющими разный размер углубления от 0,4 до 1,6 мм, использовался одинаковый диаметр основания кюветы 5 мм.

На рисунках 2.16 – 2.20 представлены графики зависимости напряжения от времени при наличии агглютинации для кювет с разным размером углубления в основании. Для каждой кюветы определена разница между напряжениями в начале исследования и спустя 117 с.

Из рисунка 2.16 видно, что для образца с углублением 1,6 мм разница между напряжением начальным и конечным составляет примерно 1,6 В за время 120 секунд.

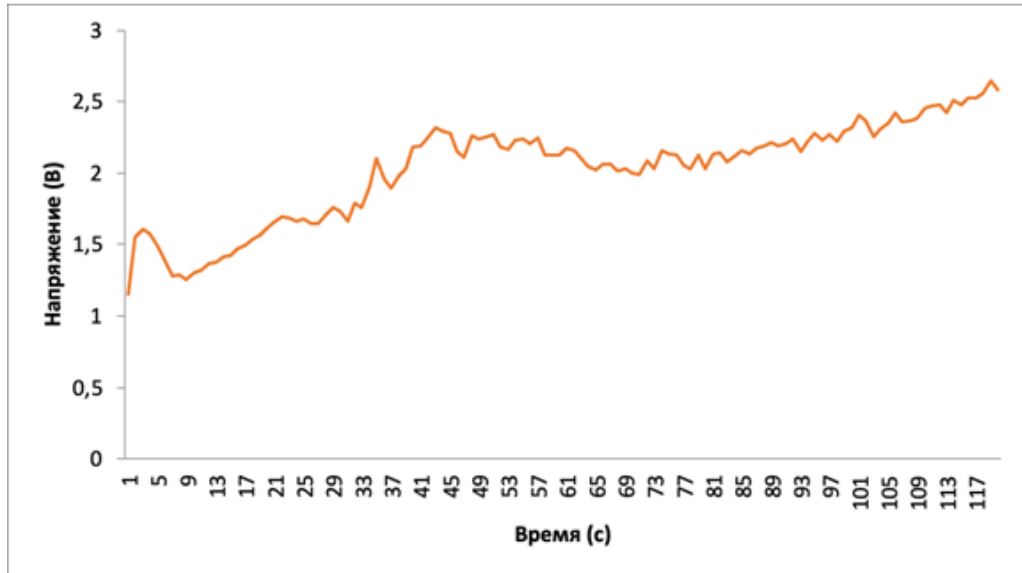


Рисунок 2.16 – График зависимости напряжения от времени при наличии агглютинации в кювете с углублением, $h = 1,6$ мм (соотношение цельной крови к цоликлону 1:3, объём 16 мкл, гематокрит 41)

Из рисунка 2.17 видно, что для образца с углублением 1,4 мм разница между напряжением начальным и конечным составляет примерно 2,7 В за время 120 секунд.

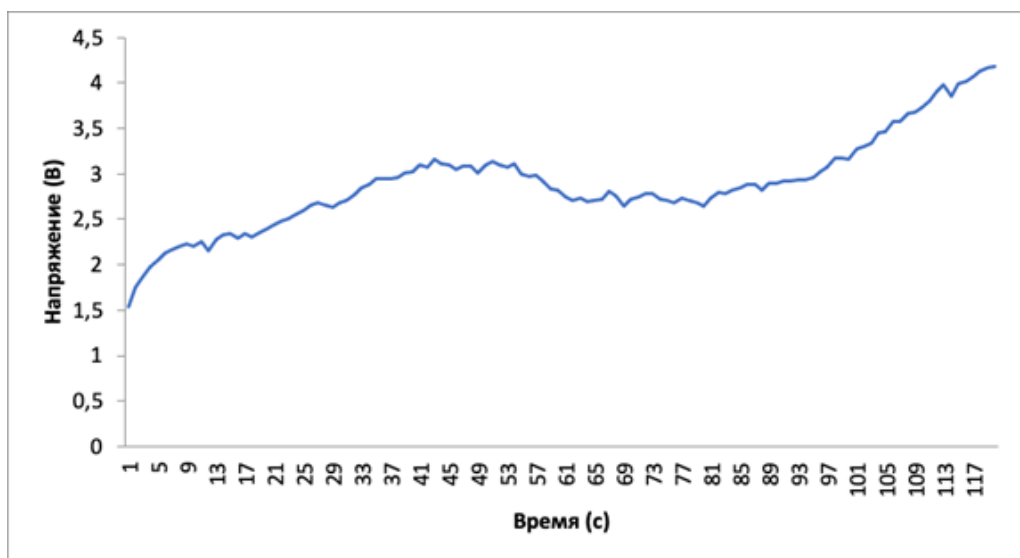


Рисунок 2.17 – График зависимости напряжения от времени при наличии агглютинации в кювете с углублением, $h = 1,4$ мм (соотношение цельной крови к цоликлону 1:3, объём 16 мкл, гематокрит 41)

Для кюветы с углублением 1,2 мм разница напряжений составила 4 В (рисунок 2.18).

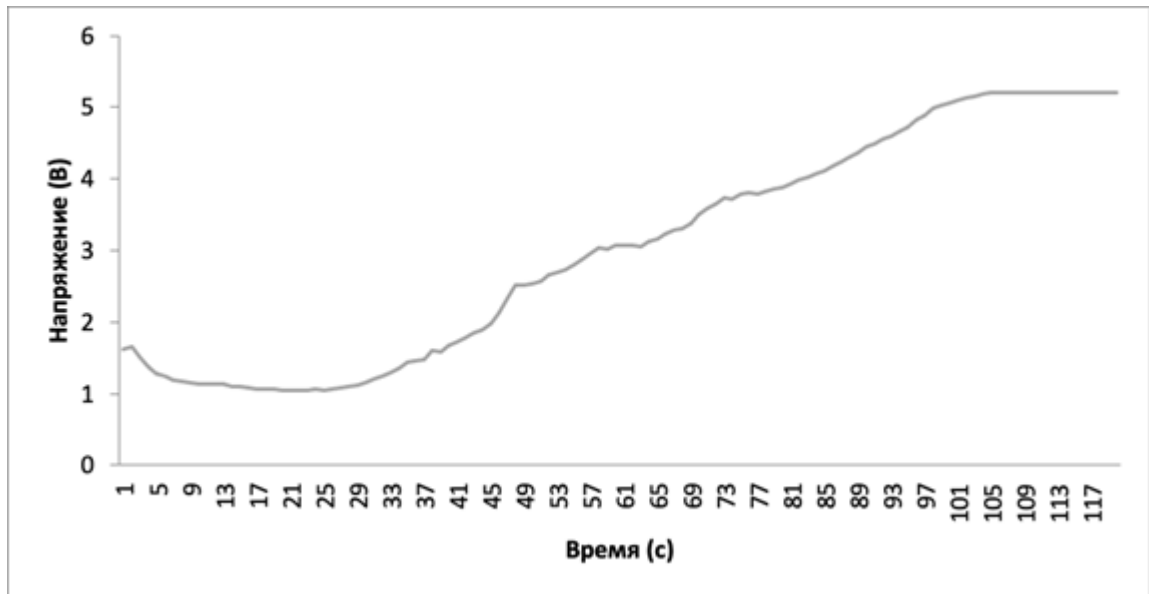


Рисунок 2.18 – График зависимости напряжения от времени при наличии агглютинации в кювете с углублением, $h = 1,2$ мм (соотношение цельной крови к цоликлону 1:3, объём 16 мкл, гематокрит 41)

Для кюветы с углублением 0,8 мм разница напряжений составила 1,75 В (рисунок 2.19).

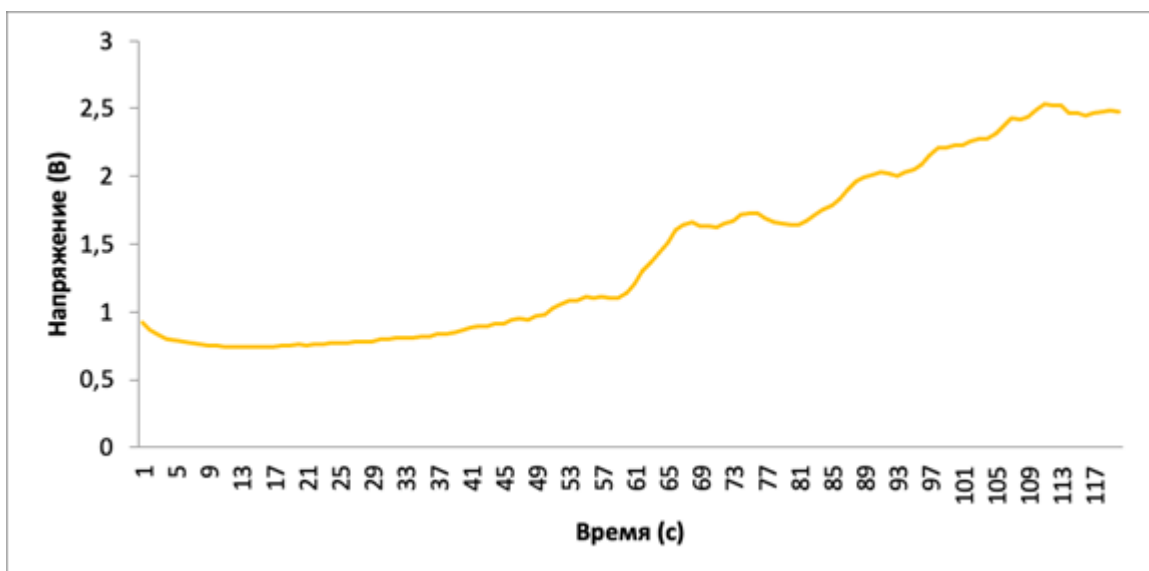


Рисунок 2.19 – График зависимости напряжения от времени при наличии агглютинации в кювете с углублением, $h = 0,8$ мм (соотношение цельной крови к цоликлону 1:3, объём 16 мкл, гематокрит 41)

Для кюветы с углублением 0,4 мм разница напряжений составила 1,08 В (рисунок 2.20).

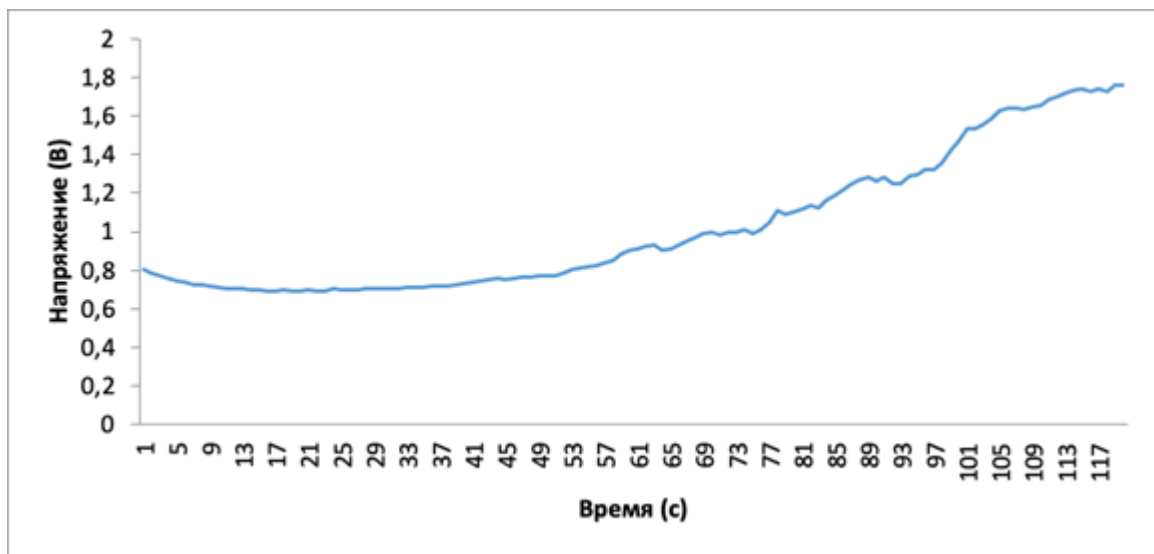


Рисунок 2.20 – График зависимости напряжения от времени при наличии агглютинации в кювете с углублением, $h = 0,4$ мм (соотношение цельной крови к цоликлону 1:3, объём 16 мкл, гематокрит 41)

Исходя из полученных данных, наибольшая разность напряжений отмечается в кювете с углублением 1,2 мм. Но при исследованиях было замечены флуктуации светового потока, которые отражались на кривых зависимости напряжения от времени. Это может быть связано с возможностью выхода иммунных комплексов на периферию капельного образца из углубления основания кюветы. При образовании агглютинатов в кюветах с углублением, световой поток проходит через края капельного образца, свободного от агглютинатов, поэтому количество света, пройденного через такой образец, показало светопропускание меньше по сравнению с количеством света проходящего через центральную часть капельного образца в кюветах с выступом, описанных ниже.

Третий вид кюветы, разработанный для эксперимента, имеет выступ в виде цилиндра в середине основания кюветы. Схематичное изображение кюветы представлено на рисунке 2.21. Такая форма основания кюветы должна смещать иммунные комплексы в положительных пробах на периферию капли, за пределы выступа кюветы. В таком случае центр капельного образца становится свободным от агглютинатов и соответственно через цент капля увеличивается световой поток

от светодиода и зависимость напряжения от времени растёт [4, 95]. Схематично процесс хода световых лучей капельных образцов, помещённых на кювете с выступом в центре основания изображено на рисунке 2.21.

Пример графика изменения напряжения от времени для кюветы с выступом представлен на рисунке 2.22. Из рисунка 2.22 видно, что для образца в кювете с выступом 0,6 мм разница напряжения составляет 3,8 В.

В разделах работы 2.3 – 2.6 будут представлены исследования, где представлены результаты влияния высоты выступа на результат исследования.

Из полученных данных, описанных выше, наибольшая разность напряжения отмечается в кювете с углублением 1,2 мм и кювете с высотой выступа 0,6 мм. В дальнейших исследованиях для работы была выбрана кювета с выступом в центре основания, так как способствует локализации иммунных комплексов на периферии капельного образца при применении механических колебаний (рисунок 2.21).

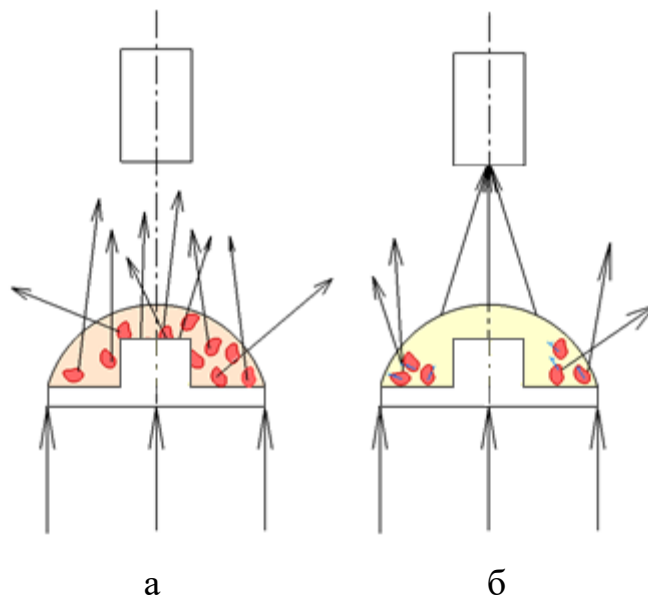


Рисунок 2.21 – Схематичное изображение прохождения светового потока через образец (кровь + цоликлон) в виде лежащей капли в кювете с выступом: а – отсутствие иммуннологической реакции крови с цоликлоном; б – наличие реакции агглютинации эритроцитов с цоликлоном в пробе

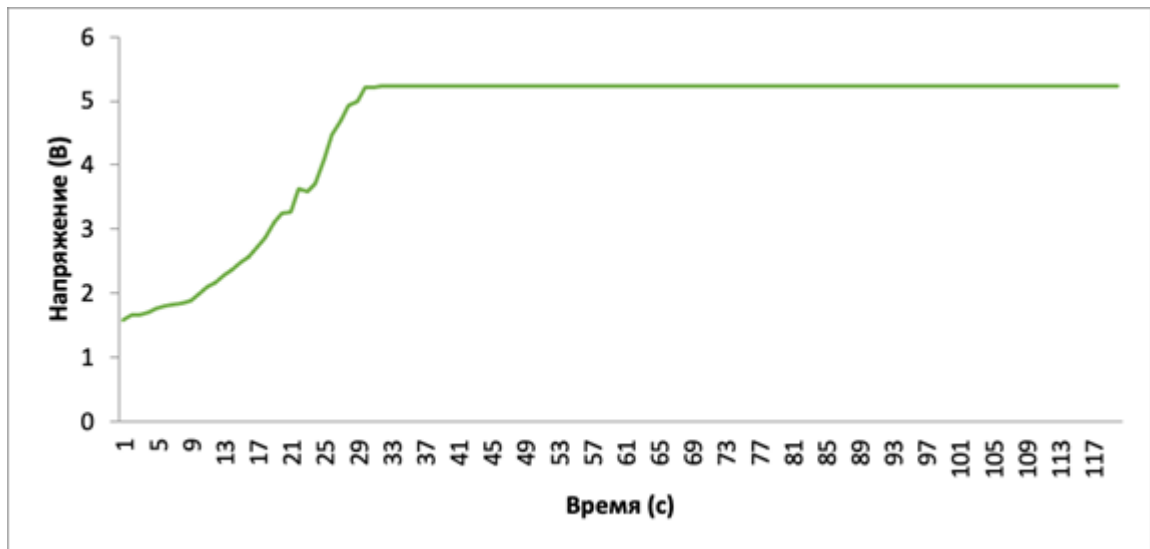


Рисунок 2.22 – График зависимости напряжения от времени при наличии агглютинации в кювете с выступом, $h = 0,6$ мм (соотношение цельной крови к цоликлону 1:3, объём 16 мкл, гематокрит 41)

Светопропускание за счёт очистки от иммунных комплексов центральной части кюветы увеличивается, что даёт возможность использовать фотометрический метод для анализа. Во внимание взяли, что частота получения агглютинатов на периферии капельного образца в кюветах с выступом гораздо выше, чем локализация иммунных комплексов в центральной части капельного образца у кювет с углублением разной глубины.

Поскольку методика основана на разнице светопропускания капельных образцов на начальном этапе исследования и конечном, то способность капли пропускать свет обусловлена двумя состояниями капельного образца. В начале исследования при формировании капельного образца из крови и солевого раствора моноклональных антител среда такого раствора мутная дисперсная, поэтому светопропускание образца на первых секундах измерения низкая, напряжение ФЭП, отражающее способность капли к светопропусканию находится в диапазоне значений 0,5 – 1,5 В. Второе важное состояние капельного образца, возникающее после применения горизонтальных механических вибраций также зависит от дисперсности и прозрачности анализируемой капли. Образование иммунных комплексов увеличивают гетерогенность среды, но под действием механической вибрации агглютинаты должны сместиться на периферию капельного образца и

светопропускание центральной части капли увеличится и будет зависеть от оптических свойств формируемой линзы. Оптические свойства линзы в свою очередь будут зависеть от прозрачности жидкой фазы, которая формируется между выступом кюветы и верхом капли. Такое расстояние обозначили МК на рисунке 2.23, где схематично изображена модель кюветы с капельным образцом.

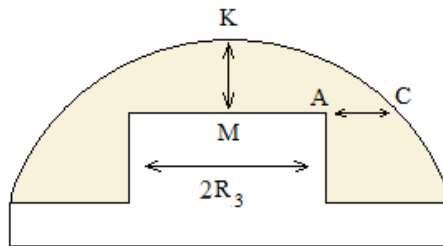


Рисунок 2.23 – Схематичное изображение кюветы с выступом в центре основания

Расстояние МК влияет на разницу светопропускания отрицательных проб на реакцию агглютинации. Расстояние должно иметь такую величину, чтобы отрицательные пробы не обладали высоким значением светопропускания.

Поэтому увеличить разницу между начальным и конечным светопропусканием капли мы можем, повлияв на расстояние КМ между выступом кюветы и каплей.

2.4 Моделирование распределения иммунных комплексов в кювете с выступом

Был проведён анализ возможности освобождения от агглютинатов центральной области капли при различных параметрах выступа. Так как при применении механических колебаний на капельный образец, расположенный на кювете, содержащую в центре основания выступ, происходит смещение иммунных комплексов за пределы выступа основания кюветы (рисунок 2.21), то объём капельного образца за пределами выступа основания кюветы должен быть достаточным для расположения всех образуемых агглютинатов. Это необходимо для того, чтобы центр капли стал свободным от иммунных комплексов. Поэтому необходимо рассчитать объём капельного образца за выступом кюветы, который

будет местом для расположения агглютинатов в положительной пробе. На рисунке 2.24 схематично изображен капельный образец, находящийся в кювете для исследования. По рисунку 2.24 видно, что объём заштрихованной фигуры, в которой должны находиться агглютинаты, ограничен границей поверхности исследуемого капельного образца, высотой и диаметром выступа кюветы. Необходимо рассчитать объём фигуры, заштрихованной на рисунке. Фигура похожа на усечённый конус со сквозным по середине выступом в виде цилиндра.

Принимая, что капля является сегментом шара радиуса R (рисунок 2.25), были проведены опыты по нахождению радиуса шара для разного объёма капли и с разной высотой выступа кюветы.

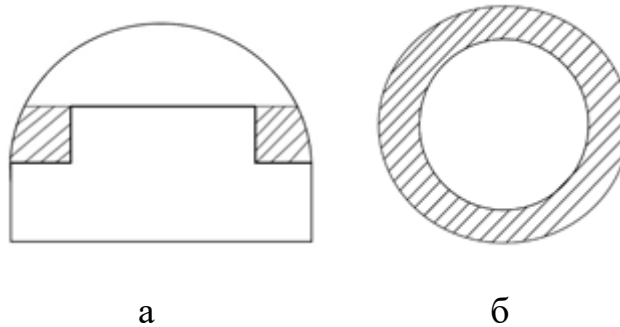


Рисунок 2.24 – Изображение капельного образца, помещённого на кювету. Заштрихованные фигуры - области нахождения агглютинатов: а - вид сбоку капельного образца, б – вид сверху капельного образца

На кювету с выступом высотой от 0,3 до 0,8 мм помещали капли объёмом от 12 до 24 мкл, делали фотографии каждого образца и по ним вычисляли радиус сферы, ограничивающей поверхность капли. Капельный образец состоял из цельной крови и цоликлона в соотношении 1:3.

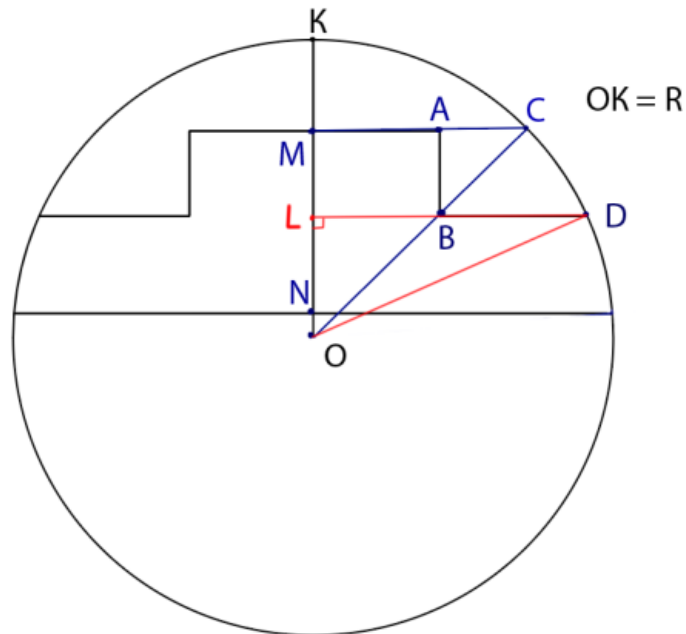


Рисунок 2.25 – Геометрическая модель капельного образца, помещённого на кювету с выступом основания

Важным является значение расстояния ON от центра радиуса сферы капли до основания кюветы. Для нахождения расстояния ON , требуется нахождение расстояния от центра сферы, сегментом которой является капельный образец, до точки основания кюветы. Поэтому по сделанным фотографиям капельных образцов, лежащих на кювете с разной высотой выступа, было найдено искомое расстояние.

На рисунке 2.26 представлены фотографии капельных образцов разного объёма нанесённых на кювету с высотой выступа 0,7 мм, диаметр выступа 3 мм, диаметр основания кюветы 4,8 мм. По рисункам видно, что с увеличением объёма капли уменьшается расстояние (ON). Расстояние ON было рассчитано с учетом экспериментальных данных. Значения расстояний ON нужны для нахождения объёма фигуры, которая способна вместить образуемые иммунные комплексы.

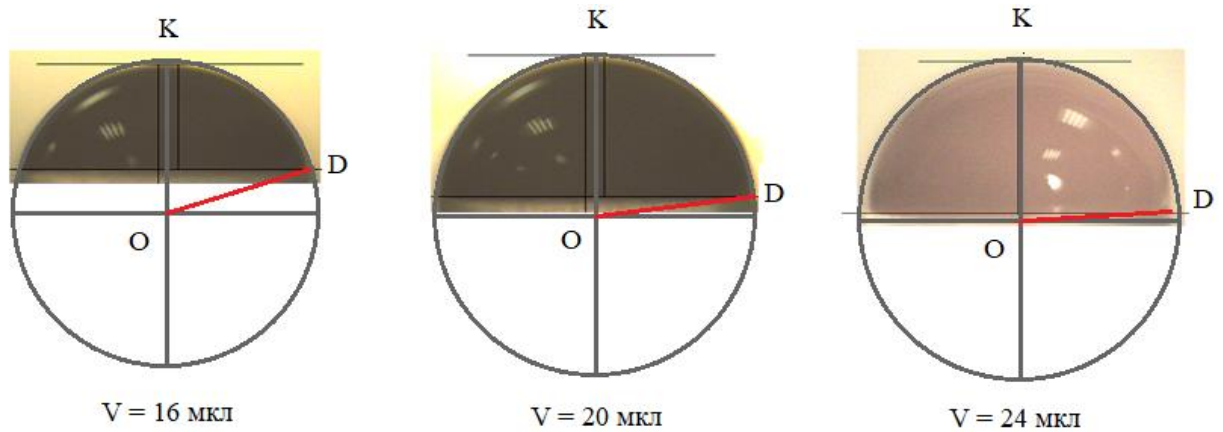


Рисунок 2.26 – Фотографии капельных образцов, содержащих разные объёмы капель (высота выступа 0,7 мм кюветы, диаметр выступа 3 мм, диаметр основания кюветы 4,8 мм, соотношение крови к цоликлону 1:3)

Для объёма 16 мкл при увеличении высоты выступа кюветы увеличивается кривизна поверхности капельной пробы, центр сферы смещается вверх в связи с чем уменьшается расстояние ON . Для объёмов пробы 20 и 24 мкл практически не происходит изменения радиуса сферы (рисунок 2.27).

Проведём расчёты объёма фигуры, которая будет вмещать в себя образуемые иммунные комплексы. Искомая фигура и выступ кюветы в виде цилиндра входят в состав усечённого конуса. Поэтому объём искомой фигуры будет находится из разности между объёмом усечённого конуса и объёмом цилиндра, имеющий параметры выступа кюветы.

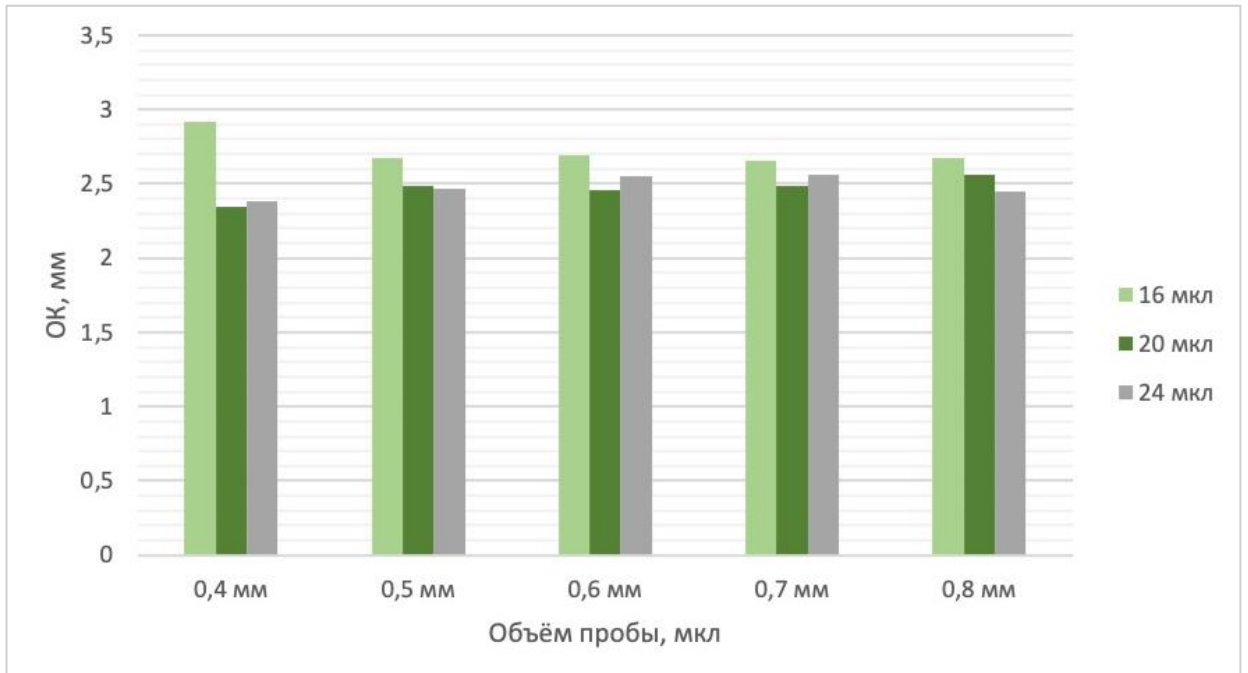


Рисунок 2.27 – Зависимости радиуса сферической поверхности капельного образца от объёма пробы и высоты выступа кюветы

Произведём нужные расчёты и вычислим объём фигуры (V_{ϕ}), которая должна вмещать агглютинаты в положительных пробах на иммунологическую реакцию.

Объём усеченного конуса (V_k) находится по формуле:

$$V_k = \frac{1}{3} \pi H (R_1^2 + R_2^2 + R_1 R_2) \quad (2)$$

где H – высота выступа кюветы (LM);

R_1 – расстояние (CM);

R_2 – радиус основания кюветы (LD).

Объём цилиндра ($V_{\text{ц}}$), находящегося внутри усеченного конуса, находится по формуле:

$$V_{\text{ц}} = \pi R_3^2 H \quad (3)$$

где R_3 – радиус выступа кюветы (AM).

Объём фигуры, где должны размещаться иммунные комплексы, (V_{ϕ}) находится по формуле:

$$V_{\phi} = V_k - V_{\text{ц}} \quad (4)$$

С учётом формул (2) и (3) получаем:

$$V_{\phi} = \frac{1}{3} \pi H (R_1^2 + R_2^2 + R_1 R_2) - \pi R_3^2 H \quad (5)$$

Преобразуя формулу, получаем:

$$V_{\phi} = \frac{1}{3}\pi H(R_1^2 + R_2^2 + R_1R_2 - 3R_3^2) \quad (6)$$

Для нахождения объёма фигуры, неизвестным остаётся R_1 (СМ), который находится, исходя из рисунка 2.25, по формуле:

$$R_1 = AM + AC \quad (7)$$

Исходя из описанного, остаётся неизвестным величина AC – расстояние от выступа кюветы до границы капельного образца. Это расстояние будет зависеть от высоты, радиуса выступа кюветы, от объёма капли и может быть найдено экспериментально. Поэтому были проведены исследования по определению неизвестных параметров с целью нахождения объёма искомой фигуры $ABDC$ (рисунок 2.25).

Найдём AC с использованием теоремы Пифагора.

$$AC = CM - AM \quad (8)$$

$$CM = \sqrt{CO^2 - MO^2} \quad (9)$$

$$MO = MN + NO \quad (10)$$

Таким образом расстояние AC находится по формуле:

$$AC = \sqrt{CO^2 - (MN + NO)^2} - AM \quad (11)$$

Исходя из параметров используемой кюветы, где радиус выступа основания ($AM = R_3$) 1,5 мм, высота выступа кюветы (MN) 1,5 мм, рассчитали значение AC . Полученные расчётные значения AC для разных объёмов и высоты выступа кюветы представлены на рисунке 2.28. Исходя из значений диаграммы на рисунке 2.28, можно сделать вывод, что чем больше объём капельного образца, тем больше значение AC , то есть расстояние от края выступа кюветы до поверхности капли (рисунок 2.25). Через промежуток AC иммунные комплексы попадают на периферию кюветы. Следует отметить, что при малых объёмах капель расстояние от выступа кюветы до границы капельного образца носит неоднозначный характер.

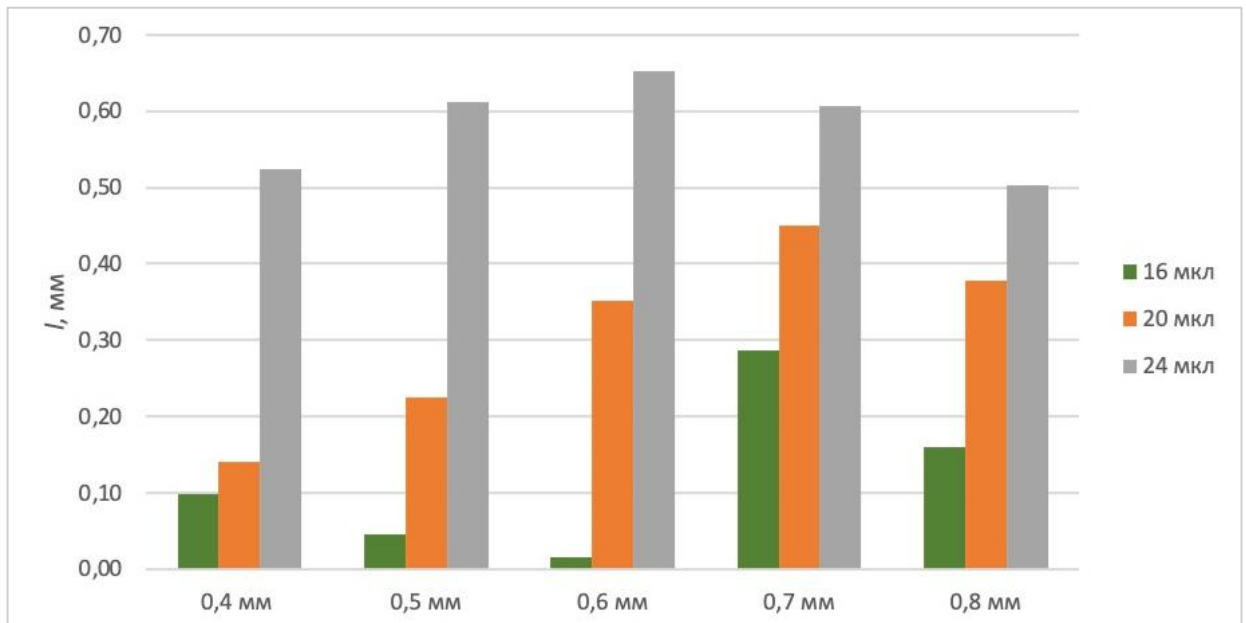


Рисунок 2.28 – Диаграмма значений расстояния АС для кювет с высотой выступа от 0,4 мм до 0,8 мм. Объёмы капельных образцов от 16 мкл – 24 мкл, диаметр выступа 3 мм, диаметр основания кюветы 4,8 мм)

После нахождения искомой величины АС, преобразуем формулу (6). С учётом всех преобразований, объём фигуры, куда должны поместиться иммунные комплексы находится по формуле:

$$V_{\phi} = \frac{1}{3} \pi LM (CO^2 - (MN + NO)^2 + LD^2 + LD \sqrt{CO^2 - (MN + NO)^2} - 3AM^2) \quad (12)$$

Полученные расчётные значения объёма искомой фигуры (V_{ϕ}), при разных объёмах капель и высоты выступа, представлены на рисунке 2.29. Исходя из значений диаграммы на рисунке 2.29, можно сделать вывод, что чем больше объём капельного образца, тем больше объём фигуры, в которой должны будут располагаться иммунные комплексы в случае их образования в капельном образце.

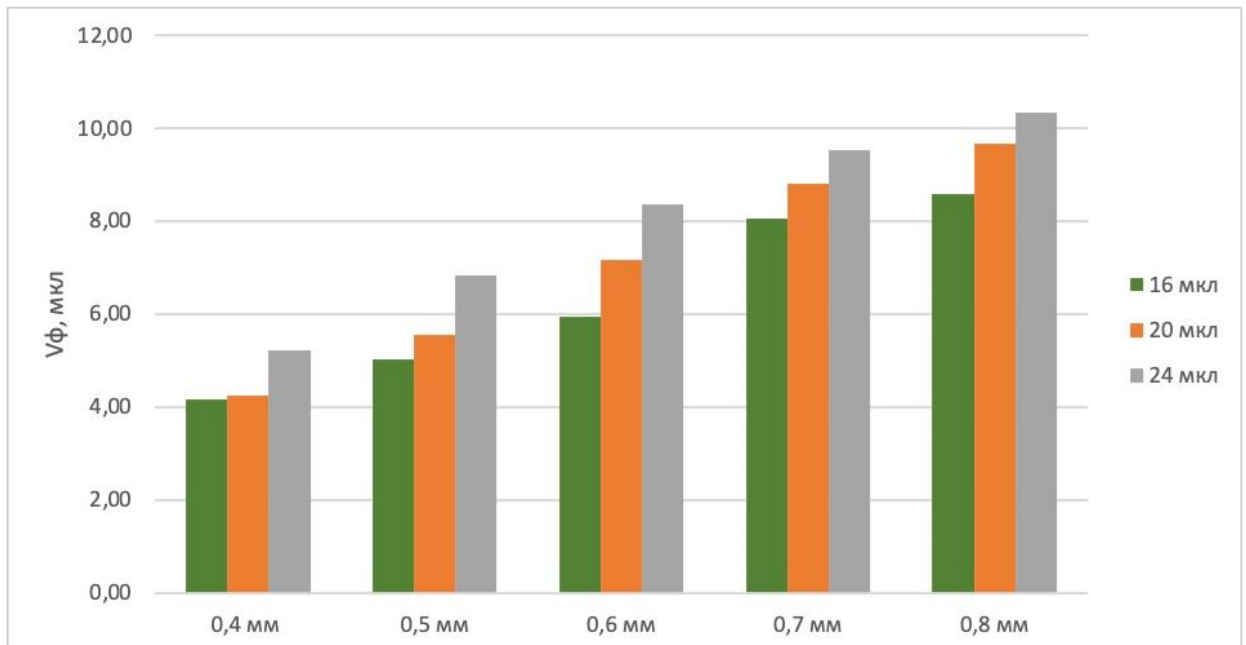


Рисунок 2.29 – Диаграмма значений объёма фигуры (V_{ϕ}) для кювет с высотой выступа 0,4 мм – 0,8 мм. Объёмы капельных образцов 16 мкл – 24 мкл, диаметр выступа 3 мм, диаметр основания кюветы 4,8 мм

При этом объем фигуры не должен быть меньше объёма образующихся иммунных комплексов ($V_{\text{эр}} \ll V_{\phi}$), который напрямую зависит от объёма исследуемой пробы, соотношения в ней крови и цоликлона, а также от величины гематокрита (НСТ).

Формула выражения гематокрита:

$$НСТ = \frac{V_{\text{форменных элементов крови}}}{V_{\text{плазмы}}} \quad (13)$$

или

$$НСТ = \frac{V_{\text{форменных элементов крови}}}{V_{\text{плазмы}}} 100\% \quad (14)$$

Эритроциты составляют подавляющее большинство форменных элементов крови, поэтому показатель гематокрита в большей степени указывается на содержание эритроцитов в крови. Отсюда объём эритроцитов в пробе находится по формуле:

$$V_{\text{эр}} = k \frac{НСТ * V_{\text{пробы}}}{100\%}, \quad (15)$$

где k – коэффициент отношения объёма крови к объёму цоликлона.

Расчётный объём эритроцитов в пробе для разных объёмов капель при значении гематокрита представлен на рисунке 2.30. Для того, чтобы все

агглютинированные эритроциты переместились из центра капли на периферию, объём фигуры капельного образца, где должны располагаться агглютинаты, должен быть в 3 – 4 раза больше, чем объём эритроцитов, добавляемых в исследуемый микрообъём образца.

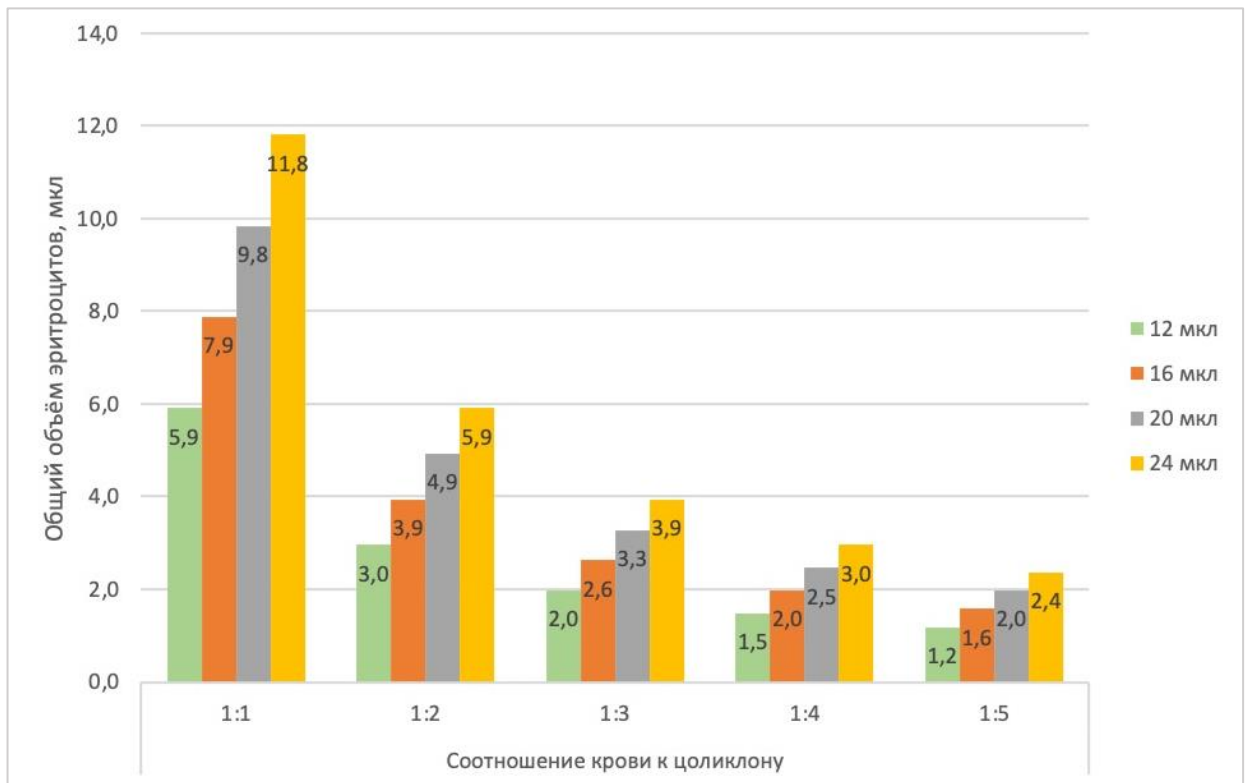


Рисунок 2.30 – Диаграмма значений объёма эритроцитов в исследуемой пробе.

Исходя из данных рисунка 2.30 при использовании соотношения крови к цоликлону 1:3 и 1:4 получено максимальное значение содержания эритроцитов в образце, которое соответственно равно 3,9 и 3,0 мкл. Из данных расчетов следует, что кюветы, которые будут иметь объём фигуры ABDC (рисунок 2.25) вмещающий иммунные комплексы, должны иметь выступ высотой 0,6 – 0,8 мм.

2.5 Оценка влияния механических колебаний на оптические свойства капли при иммунологических реакциях эритроцитов с антителами в исследуемом образце.

Образование иммунного комплекса – динамический процесс, который зависит от времени, концентрации добавленных в пробу моноклональных антител

и исследуемого биоматериала, а также от механических движений, применяемых к поверхности, где расположен капельный образец. В клинической лаборатории, где проводятся анализы с выявлением процесса агглютинации в пробах, медицинский персонал располагает на плоскости планшета для исследования 1 каплю цоликлона и 1 каплю цельной крови и смешивание производит с помощью палочки или путём покачивания планшета до полного перемешивания и наступления иммунологической реакции. Это делается для того, чтобы равномерно распределились по образцу добавляемые реагенты для анализа, а также для лучшей визуализации реакции агглютинации в пробе.

Поэтому, для лучшего образования агглютинатов в разрабатываемом методе необходимо использовать механическое воздействие на капельный образец. На рисунках 2.31 и 2.32 представлены фотографии исследований по обнаружению процесса агглютинации в планшете и используемых нами кюветах при покачивании образцов руками.

Визуально пробы с капельными образцами, содержащие агглютинаты, гетерогенны (рисунок 2.32), в центре имеют просветление. Пробы, в которых отсутствуют агглютинаты визуальны гомогенны (рисунок 2.32). При проведении анализа в планшете в положительных пробах на реакцию агглютинации наблюдаются зоны просветления, а также заметны иммунные комплексы в виде крупинок, которые можно объединить при продолжительном покачивании.

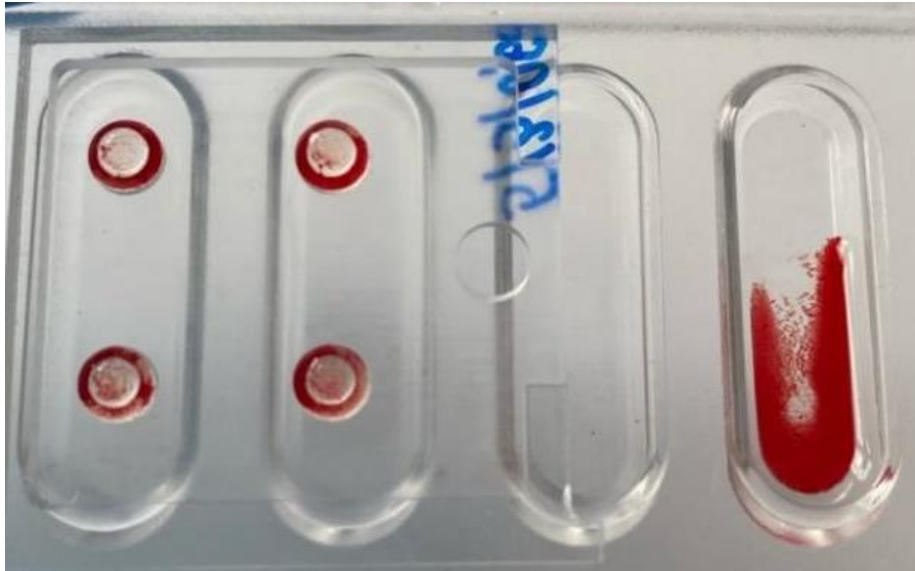


Рисунок 2.31 – Фотография пробы с положительной реакцией агглютинации.
Слева анализ выполнен в кюветах с каплями, справа в планшете

На рисунке 2.33 представлены фотографии в начальный этап образования агглютинатов (рисунок 2.33 а) и итоговый результат реакции агглютинации при продолжительном перемешивании (рисунок 2.33 б).

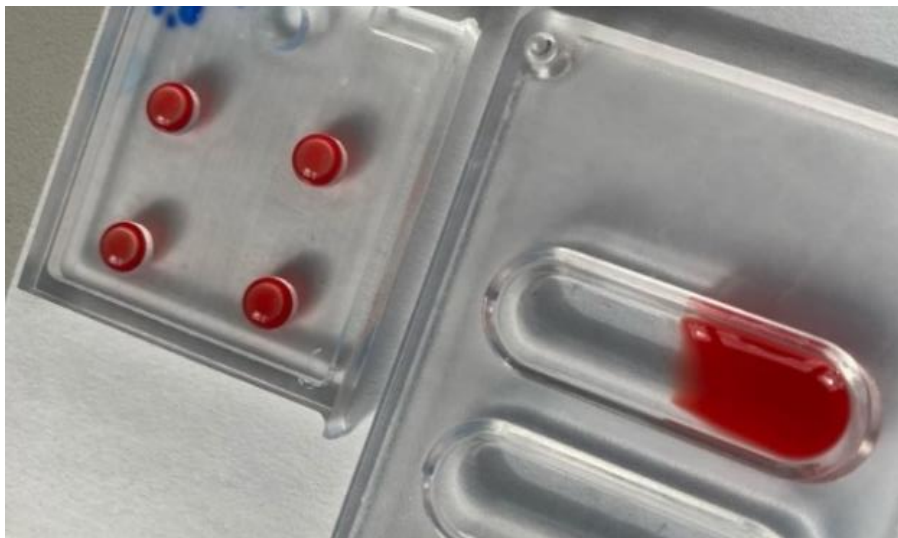


Рисунок 2.32 – Фотография пробы с отрицательной реакцией агглютинации.
Слева анализ выполнен в кюветах с каплями, справа в планшете

При отсутствии механических воздействий на пробу, явных различий между положительным и отрицательным образцом по наличию реакции агглютинации может не наблюдаться, как в капельном образце, так и в планшете. Соответственно визуальным и фотометрическим методами не всегда возможно определить пробу, содержащую реакцию агглютинации. Поэтому, применение механических

воздействий на анализируемую пробу необходимо для лучшего смешивания и выявления иммунологической реакции между антигеном и антителом.

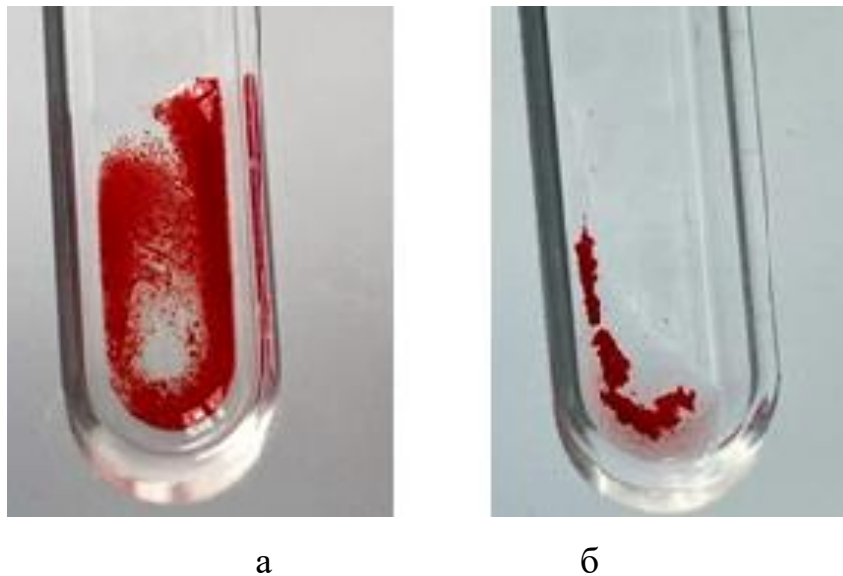


Рисунок 2.33 – Фотография пробы с положительной реакцией агглютинации: а - начало образования иммунных комплексов, б – вид иммунных комплексов при продолжительном перемешивании

Для того чтобы иммунные комплексы собрать в одном месте кюветы необходимо подобрать режим механических воздействий на платформу, на которой расположены кюветы с капельными образцами [12, 23].

Известно, что вибрации капель жидкости приводят к микрогидродинамическим явлениям, возбуждению колебаний самой капли и капиллярных волн на поверхности, возникновению внутренних течений [84, 93]. Поэтому необходимо подобрать такой режим вибрации, который будет способствовать перемешиванию жидкостей в капельном образце, объединению мелких агглютинатов в более крупные, вытеснению максимально возможного количества иммунных комплексов на периферию капельного образца, непосредственно за пределы цилиндрического выступа кюветы [8, 23]. Чтобы в центре кюветы была зона просветления в капельном образце в случае положительной пробы.

Как показано в главе 2.2 лучший результат при проведении исследований получается при использовании кювет с выступом в центре кюветы основания

(рисунок 2.12 а). Для подбора режима механических воздействий на платформу, содержащую кюветы с капельными образцами, были проведены исследования с кюветами, имеющими разную высоту выступа основания от 0,45 до 0,84 мм. Диаметр выступа кюветы составлял 3 мм. Исследования проводились с объёмами капельных образцов 16 мкл, 20 мкл, 24 мкл, соотношение цельной крови и капельного образца составляло 1:3 и 1:4, время воздействия механических колебаний составляло до 180 секунд. В исследованиях применялись механические колебания с частотой от 10 до 80 Гц. Для специфической агглютинации эритроцитов использовались цоликлоны антител А и антител В. Антигены А и В имеют одинаковую природу происхождения, кодируются одним видом генов, поэтому ведут себя одинаково в реакциях агглютинации. Результаты исследований далее представлены в виде диаграмм, где отражены максимальные значения напряжения, зарегистрированного с фотоэлектрического преобразователя после 90 секунд от начала эксперимента [95].

Проанализируем данные, полученные в кюветах с разной высотой выступа (0,68– 0,84 мм), с соотношением реактива к цоликлону 1:3 и 1:4 при непрерывных механических колебаниях 10 Гц в течении 180 с. Механическое воздействие оказывалось в течении всего исследования. Все исследуемые пробы были с положительной реакцией агглютинации.

Исходя из рисунка 2.34 видно, что для кювет с высотами выступа 0,68 мм, 0,74 мм, 0,84 мм, диаметром основания 5 мм, диаметром выступа 3мм величина максимального значения напряжения с фотоэлектрического преобразователя (ФЭП) находится в пределах от 3,2 до 5,2 В в пробах с положительной агглютинацией.

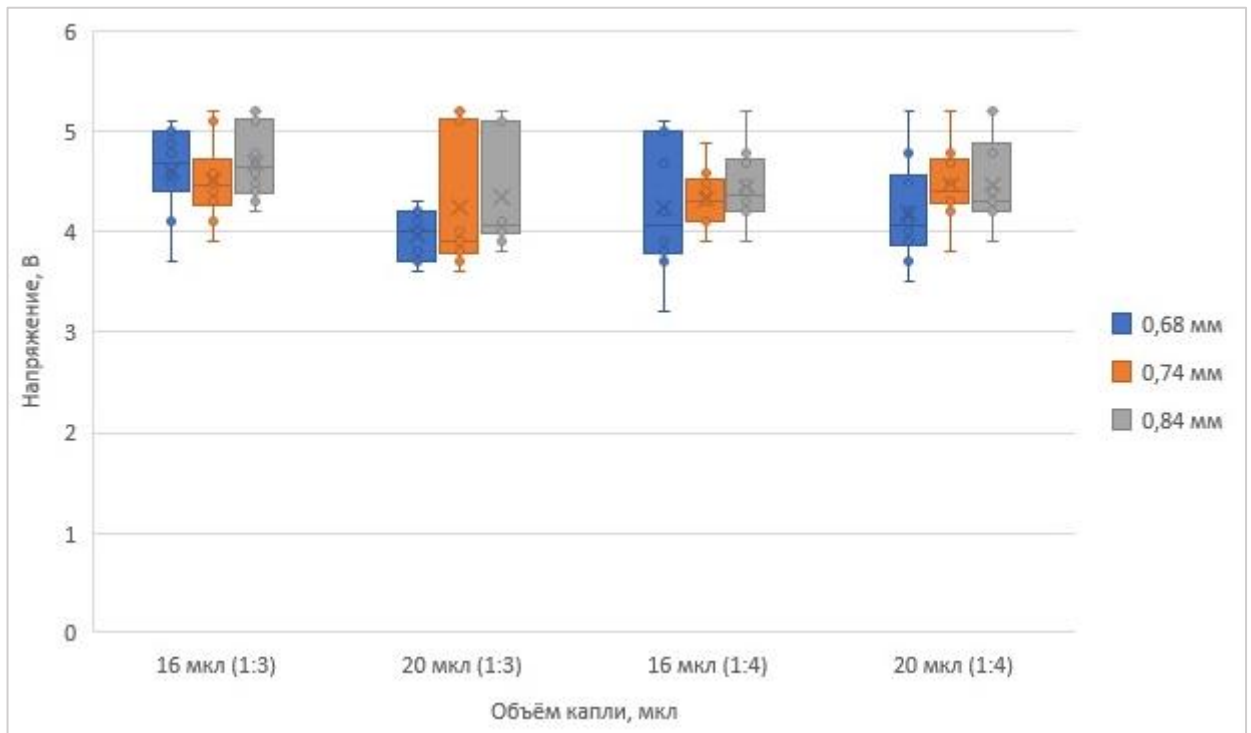


Рисунок 2.34 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 35 – 45 (положительные пробы). Высота выступа кювет 0,68 – 0,84 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3, 1:4; частота вибрации 10 Гц; цоликлон В

Механическое воздействие частотой 10 Гц на кюветы с капельными образцами способствует перемешиванию содержимого капельного образца и образованию агглютинатов и лучшему вытеснению их на периферию капельного образца при использовании кювет с выступом от 0,68 до 0,84 мм. При увеличении объёма капельного образца до 20 мкл лучшее светопропускание наблюдается у капель, имеющих соотношение цельной крови к цоликлону 1:4 для кювет с высотой выступа 0,74 – 0,84 мм. Не смотря на положительный эффект от вибрации, следует отметить, что в 70% экспериментов в пробах при применении механических колебаний частотой 10 Гц остаются агглютинаты в центральной части кюветы, как видно на рисунке 2.39, и поэтому такой режим не в полной мере удовлетворяет нашим требованиям.

Далее были проведены эксперименты в тех же кюветах, но применялись механические колебания в диапазоне частот от 10 до 25 Гц с амплитудой колебаний порядка 0,7 – 1 мм. Замечено, что при проведении опытов с частотой механических колебаний более 10 Гц происходит разбивание агглютинатов, а не перемешивание

как в случае с частотой 10 Гц. Поэтому капля остаётся гетерогенна по всему объёму, просветлений нет. И различий между отрицательной пробой и положительной на реакцию агглютинации не наблюдается (рисунок 2.35). Из фотографий, представленных на рисунке 2.35, видно, что капля не имеет просветления в центре, она гетерогенная, мутная и практически не отличается от образца, где нет реакции агглютинации.

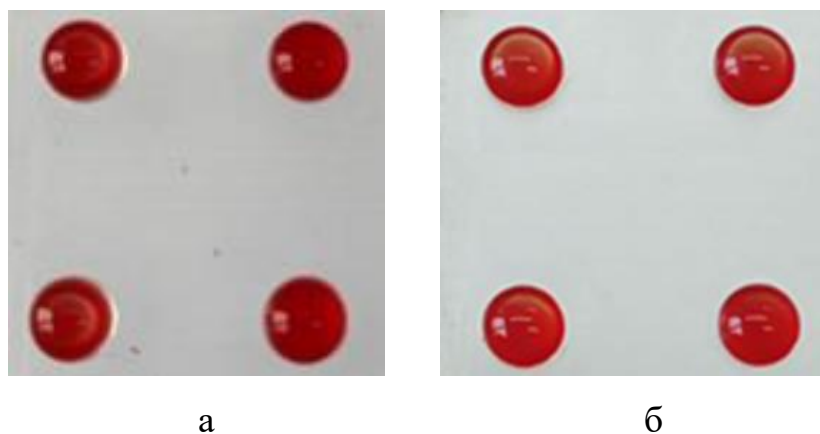


Рисунок 2.35 – Фотография капельных образцов при воздействии механических колебаний (а – частота колебаний 15 Гц, б – частота колебаний 25 Гц)

В следующей серии опытов были использованы периодические колебания по 5 секунд с задержкой 2 секунды. Частота механических колебаний составляла от 27 до 80 Гц. Чтобы не вызвать распад агглютинатов, использовали меньшую амплитуду колебаний 0,15 – 0,2 мм [95].

Исследования проводились с объёмами капельных образцов 16 мкл, 20 мкл, соотношение цельной крови и цоликлона составляло 1:3 и 1:4, время воздействия механических колебаний составляло до 180 секунд. Для специфической агглютинации эритроцитов взяты цоликлоны антител А.

Проанализируем данные, полученные в кюветах с разной высотой выступа, с соотношением реактива 1:3 и 1:4 при периодических механических колебаниях 27 Гц, 55 Гц, 80 Гц в течении всего исследования. Механическое воздействие использовано было в течении всего исследования. Для всех представленных графиков использовался цоликлон А и В. Все исследуемые пробы содержали реакцию агглютинации. Результаты исследований представлены в виде диаграмм

максимальных значений напряжения, снятого с фотоэлектрического преобразователя после 90 секунд от начала эксперимента.

Проанализируем данные, представленные на рисунке 2.36, полученные в кюветах с разной высотой выступа 0,84 мм, 0,74 мм, 0,68 мм при непрерывных механических колебаниях 80 Гц [8, 23].

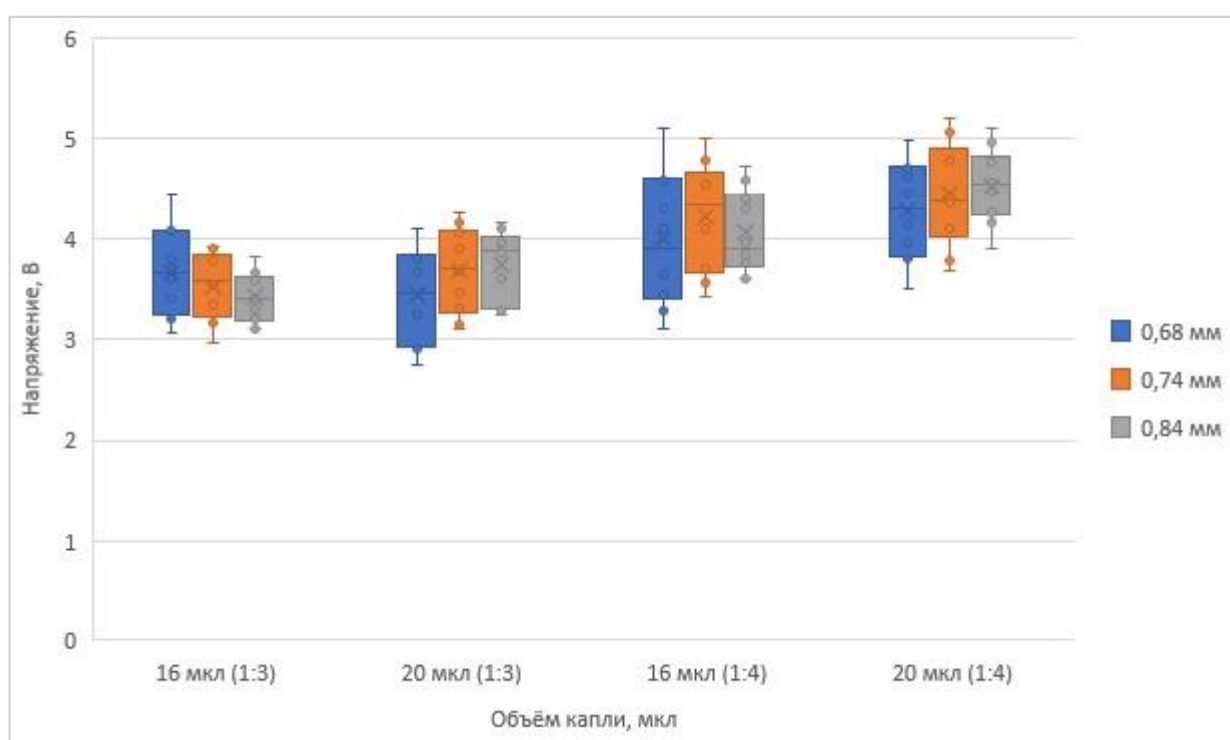


Рисунок 2.36 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 35 – 45 (положительные пробы). Высота выступа кювет 0,68 – 0,84 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3, 1:4; частота 80 Гц; цоликлон В

При анализе изменения светопропускания капельных образцов объемами 16 мкл, 20 мкл, соотношением цельной крови к цоликлону 1:3 или 1:4 при применении механических колебаний с частотой 80 Гц наблюдается увеличение величины напряжения от 2,74 до 5,2 В. Подобранный вибрация способствует распределению агглютинатов на периферию капельного образца, но следует отметить, что во многих пробах остаются иммунные комплексы в виде полос в центральной части кюветы, что видно на фото, представленном на рисунке 2.40.

Далее представлены результаты экспериментов для капельных образцов, содержащих иммунологическую реакцию эритроцитов с цоликлонами при

применении периодических механических воздействий на планшет с кюветами частотами 27 Гц, 41,6 Гц, 55 Гц с паузами в течении 2 с. Исследования проводились с разными объёмами капельных образцов 16 мкл, 20 мкл, 24 мкл, соотношение цельной крови и капельного образца составляло 1:3. Вибрация осуществлялась периодами длительностью 5 с с паузами между вибрациями 2 с. Время воздействия механических колебаний составляло 160 – 180 секунд. Для специфической агглютинации эритроцитов взяты цоликлоны антител А. Результаты исследований представлены в виде диаграмм максимальных значений напряжения, снятого с фотоэлектрического преобразователя после 90 секунд от начала эксперимента [3, 23, 95].

Исходя из полученных данных диаграмм, представленных на рисунках 2.37 – 2.38, для кювет с высотой выступа от 0,45 до 0,74 мм наблюдается наибольшее светопропускание капельных проб при применении механических вибраций с частотой 55 Гц. Значение разности напряжений составляет от 3,86 до 5,2 В. При проведении исследований было отмечено наличие иммунных комплексов в центральной части капельного образца, что влияет на светопропускание пробы и увеличивает диапазон максимальных значений напряжения с фотоэлектрического преобразователя. Чтобы увеличить светопропускание образцов и приблизить максимальное значение напряжения к 5,2 В в экспериментах необходимо собрать иммунные комплексы за пределами выступа кюветы [3, 23, 95].

Исходя из полученных результатов, которые отражены в диаграммах (рисунки 2.37 и 2.38) лучшее светопропускание образцов, содержащих цоликлон D и кровь, получено при применении периодических механических колебаний частотой 55 Гц длительностью 5 с с паузами 2 с, в анализируемых кюветах в центре практически отсутствуют иммунные комплексы. И немаловажный фактор для реакции агглютинации антител D с антигенами мембраны эритроцитов, это образования мелких агглютинатов, которые объединяются в более крупные через больший промежуток времени по сравнению с аналогичной реакцией антител А или В с соответствующими антигенами.

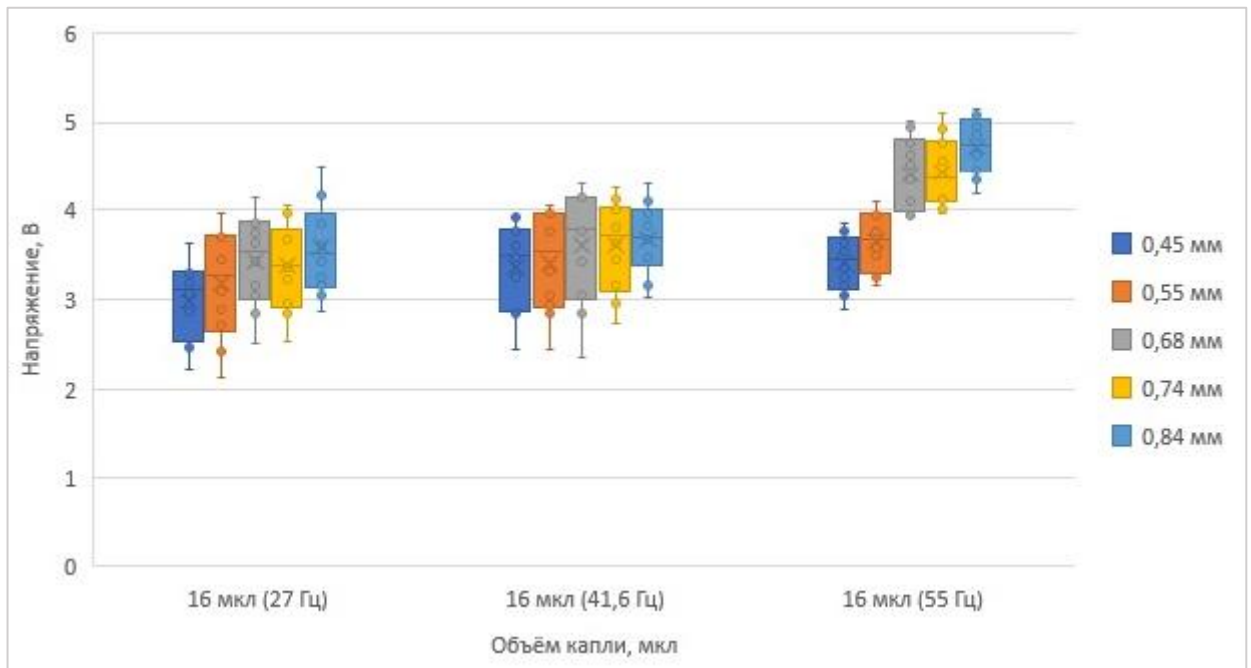


Рисунок 2.37 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 35 – 45 (положительные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3, 1:4; цоликлон В

Поэтому неотъемлемым плюсом применения механических колебаний на иммунологическую реакцию антитела D и антигена класса D, это ускорение реакции. Для реакции аглютинации между эритроцитами крови и моноклональными антителами типа A или типа B, нет значимого различия между светопропусканием проб положительных на аглютинацию после применения периодических колебаний частотой 27 Гц по 5 с с паузами 2 с или применение периодических колебаний частотой 55 Гц по 5 с с паузами 2 с [8, 23].

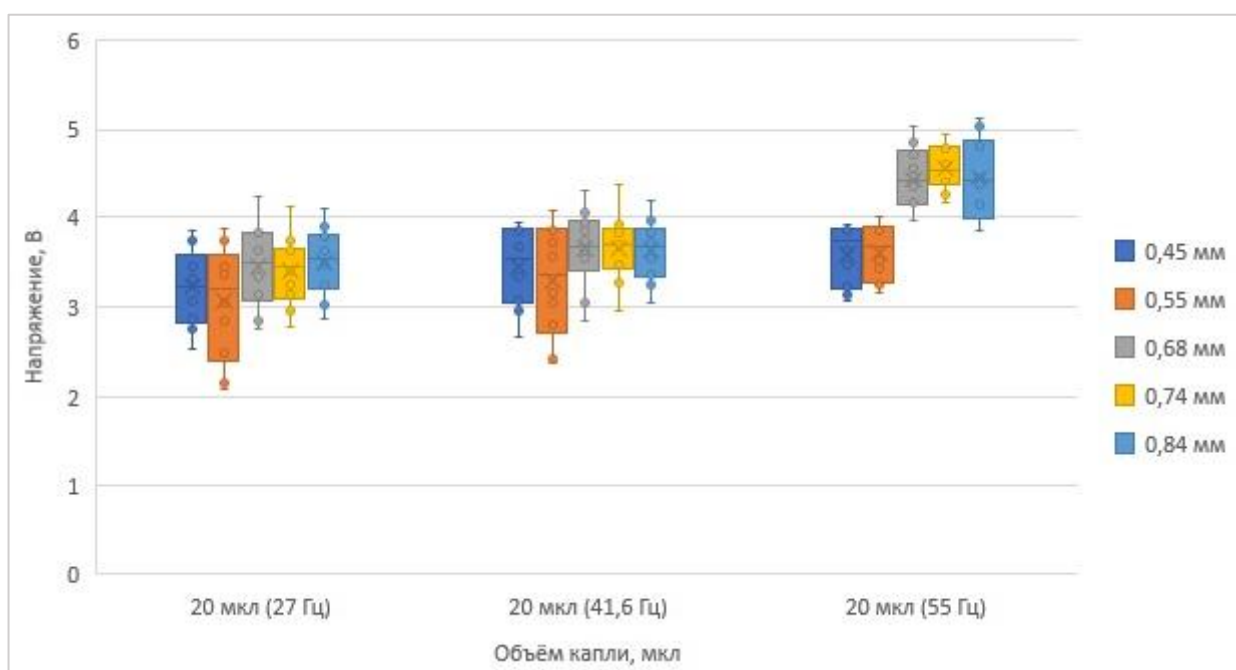


Рисунок 2.38 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 35 – 45 (положительные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; цоликлон В

В ходе исследований было выявлено, что при частоте вибрации капле 10 Гц и амплитуде 0,7 – 1 мм образуются иммунные комплексы, но они располагаются по всему объёму капли. Следствием чего является флуктуация уже образовавшихся агрегатов по капле и хаотичное изменение светового потока (чередование увеличения и снижения светопропускания). Чаще всего в капельном образце после применения поступательных механических воздействий частотой равной 10 Гц остаётся тонкий слой мелких агглютинатов, которые соединены друг с другом. На рисунке 2.39 представлены фотографии, где виден тонкие слои агглютинатов разных размеров в центре капельного образца [8, 23, 95].

Если применять к исследуемому капельному образцу периодические механические колебания более высоких частот 27 – 80 Гц, то чаще всего в центре капли образуются полосы из агглютинатов. Полосы могут быть прямые, а могут иметь волнистую форму. На рисунке 2.40 представлены фотографии скоплений агглютинатов разных размеров в центре капельного образца при применении механических колебаний частотой 80 Гц [8, 23, 95, 100].

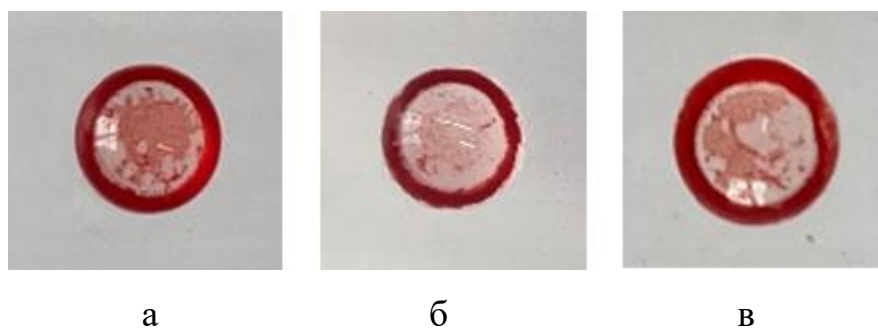


Рисунок 2.39 – Фотографии капельных образцов, содержащих иммунологические комплексы, после воздействия механических колебаний частотой 10 Гц (а – соотношение крови 1 к 3, объём образца 16 мкл, б – соотношение крови 1 к 4, объём образца 20 мкл, в – соотношение крови 1 к 3, объём образца 20 мкл)

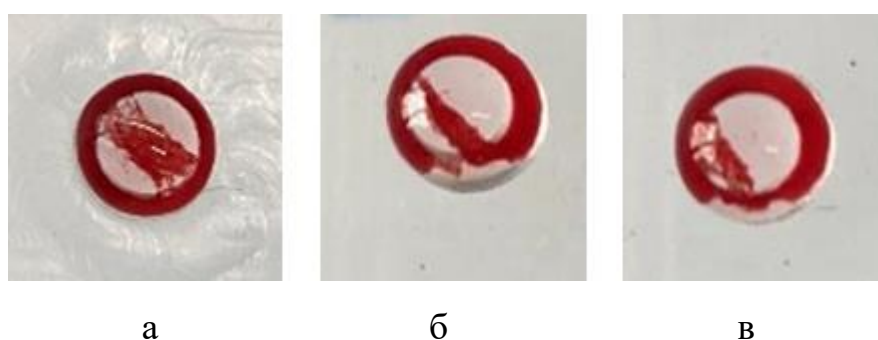


Рисунок 2.40 – Фотографии капельных образцов, содержащих иммунологическую реакцию, после воздействия механических колебаний частотой 80 Гц (а – соотношение крови 1 к 3, объём образца 20 мкл, б - соотношение крови 1 к 4, объём образца 16 мкл, в – соотношение крови 1 к 3, объём образца 16 мкл)

Для увеличения светопропускания исследуемых капельных образцов мы решили подобрать режим вибрации, который будет состоять из 2-х этапов. Первый этап будет коротким по времени около 30 секунд и подаваться будут механические колебания частотой 10 Гц, которые будут способствовать перемешиванию крови и моноклональных антител (целиклона). Затем сразу будет включаться второй этап вибрации капельных образцов в течении 120 с и частота механических колебаний будет составлять 55 Гц. Второй этап механических воздействий должен способствовать объединению мелких агглютинатов в крупные и перемещению их за пределы выступа кюветы, тем самым увеличивать светопропускание исследуемого образца.

Для доказательства гипотезы были проведены опыты видеорегистрации процесса образования агглютинатов при применении в течении 3 минут двух этапов вибрации. Первый этап включал в себя непрерывные механические

колебания частотой 10 Гц с амплитудой 1 мм, а второй этап – периодические механические колебания частотой 55 Гц по 5 с с паузами 2 с между колебаниями с амплитудой 0,12 – 0,2 мм [8, 23].

Из фотографий, которые представлены на рисунке 2.41, хорошо видно образование мелких агглютинатов в центре образца при первом этапе вибрации, это значит, что кровь и цоликлон перемешались. Также перешивание реагентов доказывает прозрачная среда над выступом кюветы, через которую мы видим иммунные комплексы.

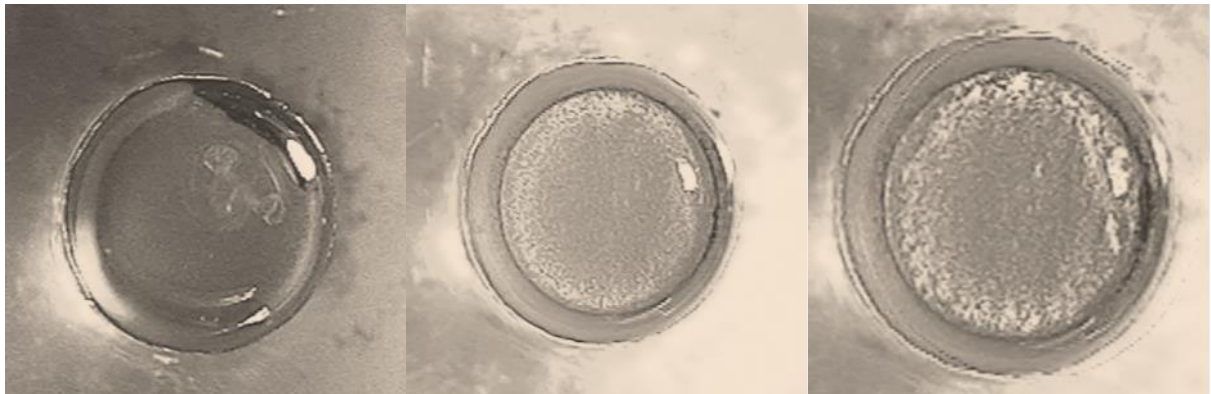


Рисунок 2.41 – Фотографии капельных образцов, содержащих иммунологическую реакцию, после воздействия механических колебаний частотой 10 Гц в течении 30 секунд. (цоликлон Д, соотношение 1:3, объём образца 16 мкл)

На рисунке 2.42 представлены фотографии того же капельного образца, на которых видно, как вибрация способствует перемещению агглютинатов за пределы выступа кюветы, то есть локализации иммунных комплексов на периферии капельного образца [23, 95].

По фотографиям, представленным на рисунке 2.43, видна траектория движения крупных агглютинатов, которые образовались из мелких агглютинатов в центральной части капельного образца. К завершению подачи механических воздействий центральная часть кюветы полностью освобождена от агглютинатов, а значит имеет хорошее светопропускание (рисунки 2.44 и 2.45). Можно заметить траекторию, по которой иммунные комплексы локализовались за пределами выступа кюветы [23, 95].

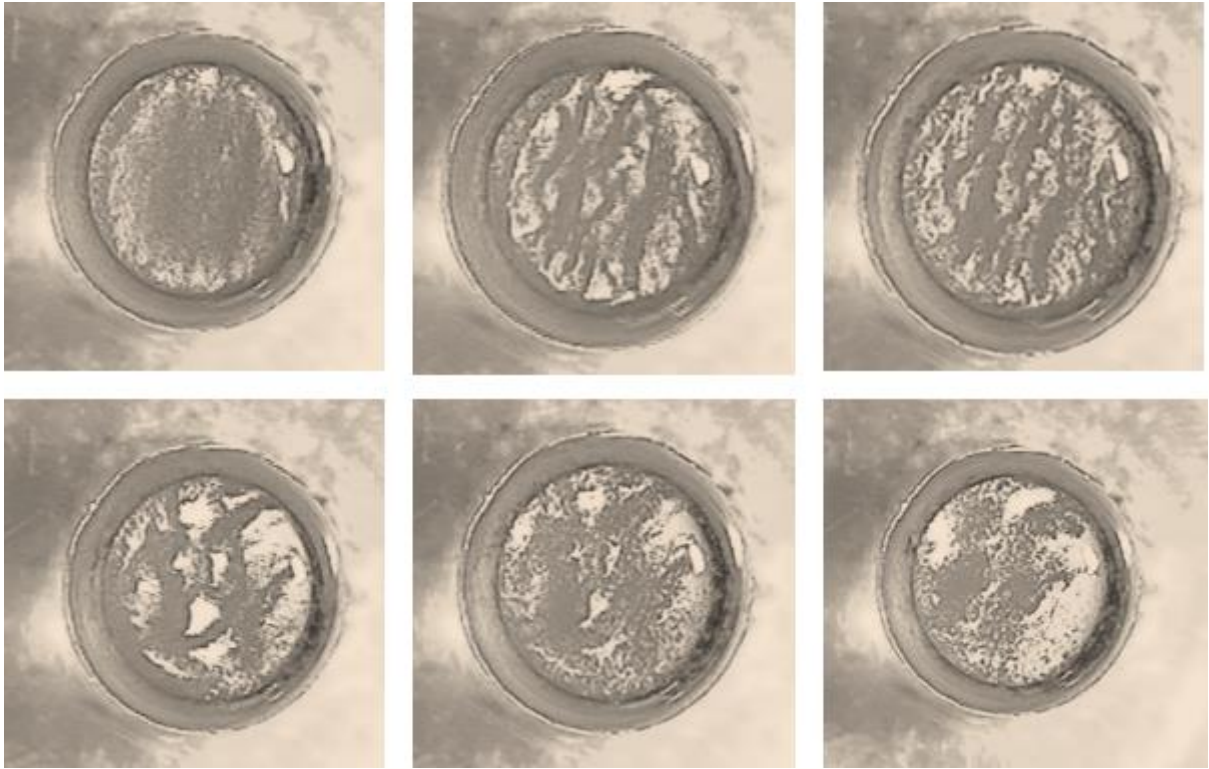


Рисунок 2.42 – Фотографии капельных образцов, содержащих иммунологическую реакцию, после воздействия пачек механических колебаний частотой 55 Гц в течении 31 по 42 секунды. (цоликлон D, соотношение 1:3, объём образца 16 мкл)

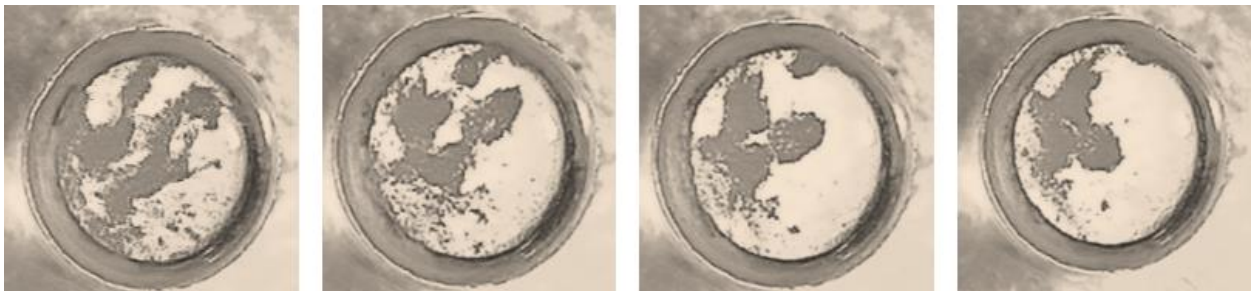


Рисунок 2.43 – Фотографии капельных образцов, содержащих иммунологическую реакцию, после воздействия механических колебаний частотой 55 Гц в течении следующих 43 – 55 секунд (цоликлон D, соотношение 1:3, объём 16 мкл)

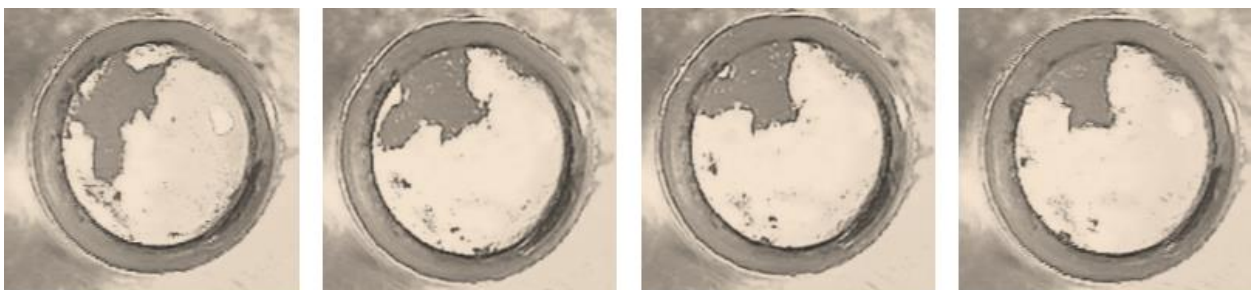


Рисунок 2.44 – Фотографии капельных образцов, содержащих иммунологическую реакцию, после воздействия механических колебаний частотой 55 Гц от 55 до 75 секунд с начала подачи вибрации. (цоликлон D, соотношение 1:3, объём 16 мкл)

Применение комбинированной механической вибрации с частотами 10 Гц и 55 Гц, уменьшает вероятность образования «тонких плёнок» из агглютинатов в центре кюветы, что увеличивает светопропускания капельного образца [23, 95].

В следующем разделе будут представлены исследования, где уже применяется комбинированный режим вибрации капельных образцов.

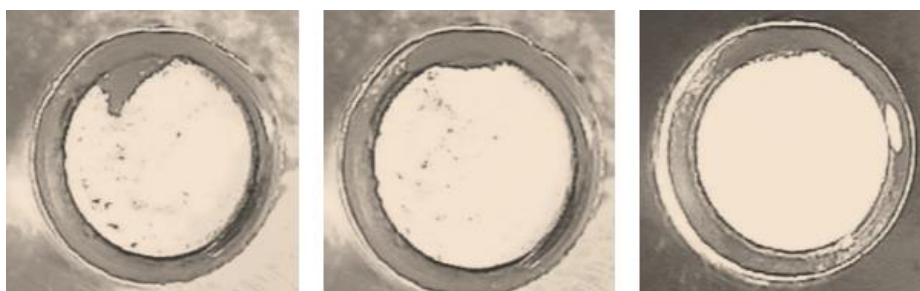


Рисунок 2.45 – Фотографии капельных образцов, содержащих иммунологическую реакцию, после воздействия механических колебаний частотой 55 Гц от 75 до 90 секунд с начала подачи вибрации. (цоликлон D, соотношение 1:3, объём образца 16 мкл)

2.6 Исследование влияния параметров кюветы и характеристик капельной пробы на результаты анализа.

Важным фактором для работы является объём и соотношения реагентов в исследуемой пробе. Главными требованиями к капельному образцу для проведения экспериментов является устойчивость к растеканию капли и сохранение полусферической формы. Эти параметры определяются параметрами кюветы и объёмом наносимой капельной пробы.

2.6.1 Исследование влияния объёма пробы солевого раствора моноклональных антител и цельной крови на оптические свойства капельного образца в процессе исследования.

Объём анализируемой капли складывается из объёма исследуемой крови и объёма солевого раствора моноклональных антител. Исследуемым материалом является цельная кровь, которая содержит эритроциты, способные к агглютинации с моноклональными антителами. Важный параметр крови, который характеризует

долю эритроцитов в общем объёме крови это гематокрит. Поэтому в исследованиях учитывался гематокрит исследуемых образцов крови. Чем выше значение гематокрита, тем больше может образоваться иммунных комплексов в случае положительной пробы. А в случае отрицательной пробы разные значения гематокрита могут влиять на светопропускание капельных образцов.

При разработке автоматизированной методики необходимо взять во внимание объёмы и соотношение реактивов стандартной методики выявления агглютинации, которую используют в лаборатории. Согласно методу выявления агглютинации эритроцитов с использованием солевого раствора моноклональных антител (цоликлонов), в лунки вносится приблизительно 0,1 мл реагента (цоликлона) и 0,01 – 0,03 мл исследуемой крови. Исходя из данных, соотношение крови к цоликлону составляет от 1:10 до 1:3. Большее разведение исследуемого образца крови с низким значением гематокрита при автоматизации анализе может привести к ложноотрицательному ответу, так как светопропускание пробы будет иметь большое значение, что не позволит различить отрицательную и положительную пробу для выявления реакции агглютинации. При добавлении большого объёма крови к реагентам, можем получить ложноотрицательный ответ, так как недостаток антител не приведёт к образованию всех возможных агглютинатов. Так как ведётся разработка универсальной методики для определения группы крови, важно учитывать низкое и высокое значение гематокрита. Исходя из вышеописанного, первая серия опытов была направлена на выявление объёма капельного образца. В главе 2.2 нами было выявлено, что наиболее подходящая форма кюветы для условий эксперимента стала кювета с выступом. В исследованиях были взяты кюветы с одинаковыми диаметром основания 4,75 мм и диаметром выступа 3 мм, но с разными значениями высоты выступа (0,45 мм, 0,55 мм, 0,68 мм, 0,74 мм, 0,84 мм) [33, 35, 95].

Далее будут представлены данные экспериментов с образцами крови и солевыми растворами моноклональных антител (цоликлон А, цоликлон В, цоликлон D) в соотношении 1 к 3. В исследованиях использовали объёмы капельных образцов от 12 до 26 мкл с разницей между последующим значением

объёма 4 мкл. Так как гематокрит – процентный показатель, который отражает долю эритроцитов в единице объёма крови, то его значение в исследуемом образце влияет на количество образуемых агглютинатов в капельном образце, поэтому для выявления подходящего объёма в смоделированной нами системе брали образцы крови с высоким значением гематокрита (40 – 50).

Результаты исследований представлены в виде диаграмм, которые показывают максимальное значение напряжения после 90 секунд от начала эксперимента. На рисунке 2.46 представлены диаграммы максимального значения напряжения с ФЭП для разного объёма проб.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что кюветы с величиной выступа 0,45 и 0,55 мм не подходят для проведения анализа проб с высоким значением гематокрита, поскольку образующиеся агглютинаты остаются в центральной части капельного образца, что уменьшает светопропускание пробы.

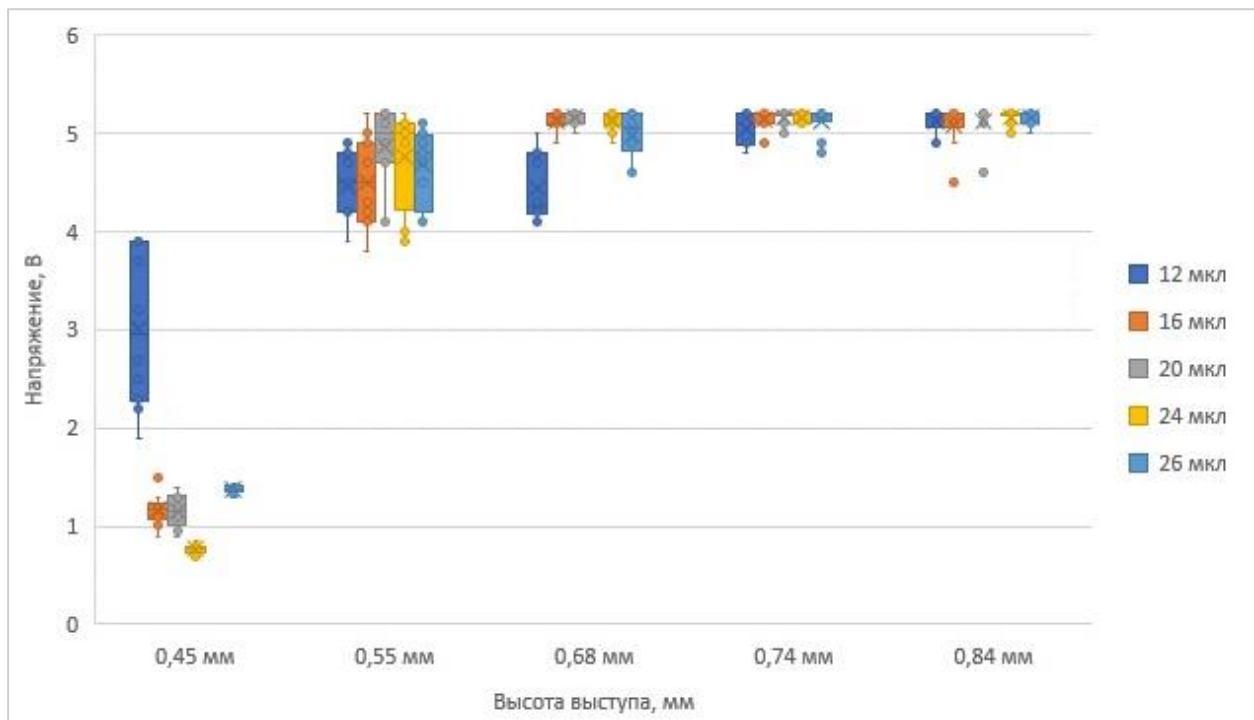


Рисунок 2.46 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для разного объёма проб. Выступ кювет высотой 0,45 – 0,84 мм, соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; гематокрит 40 – 50; цоликлон В (положительные пробы)

Для проверки наличия агглютинации дополнительно оценивалось визуально наличие иммунных комплексов (агглютинатов) в центре капельного образца и проводились фотосъёмки кювет после исследования. Отсутствие агглютинатов в центре капельного образца является главным критерием отбора высоты выступа кюветы (рисунки 2.47 – 2.51).

Рисунок 2.47 подтверждает ранее сделанный нами вывод о низкой способности к светопропусканию капельного образца положительной пробы в кювете с выступом 0,45 мм. Большая часть иммунных комплексов в экспериментах с данной кюветой остаётся в центральной части капли, что уменьшает светопропускание образца.

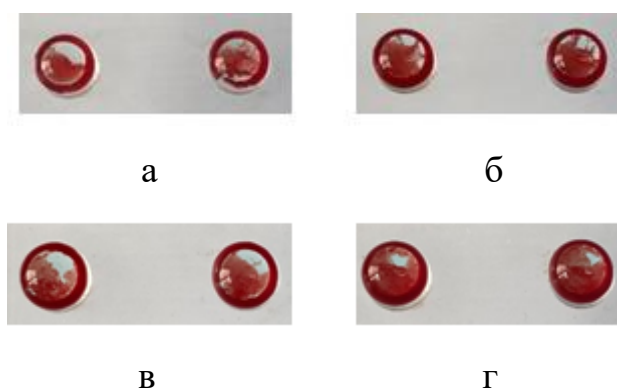


Рисунок 2.47 – Фотография пробы с положительной реакцией агглютинации в кювете с выступом 0,45 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; гематокрит 45,7; цоликлон В (а – объём 12 мкл; б – объём 16 мкл; в – объём 20 мкл; г – объём 24 мкл)

Из рисунка 2.48 видно, что иммунные комплексы в части проб при использовании кювет с выступом высотой 0,55 мм остаются в центральной части капли, что снижает светопропускание образца. Это может приводить к ложноотрицательному результату для проб с высоким гематокритом.

Исходя из фотографий проб (рисунки 2.49 – 2.51) с положительной реакцией агглютинации в кюветах с выступами 0,68 мм, 0,74 мм, 0,84 мм при использовании объёмов капель 16 – 24 мкл визуально агглютинаты после применения механических колебаний располагались на периферии капельного образца. Таким образом центральная часть пробы не содержит иммунных комплексов в капельных образцах, находящихся на кюветах с высотой выступа основания от 0,68 мм до 0,84

мм. Отсутствие иммунных комплексов в центре капельных образцов подтверждается данными о высоком значении выходного сигнала с фотоэлектрического преобразователя, представленными на рисунке 2.46.

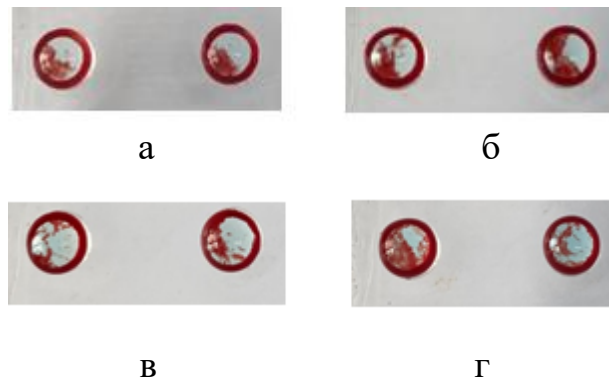


Рисунок 2.48 – Фотография пробы с положительной реакцией агглютинации в кювете с выступом 0,55 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; гематокрит 46; цоликлон В (а – объём 12 мкл; б – объём 16 мкл; в – объём 20 мкл; г – объём 24 мкл)

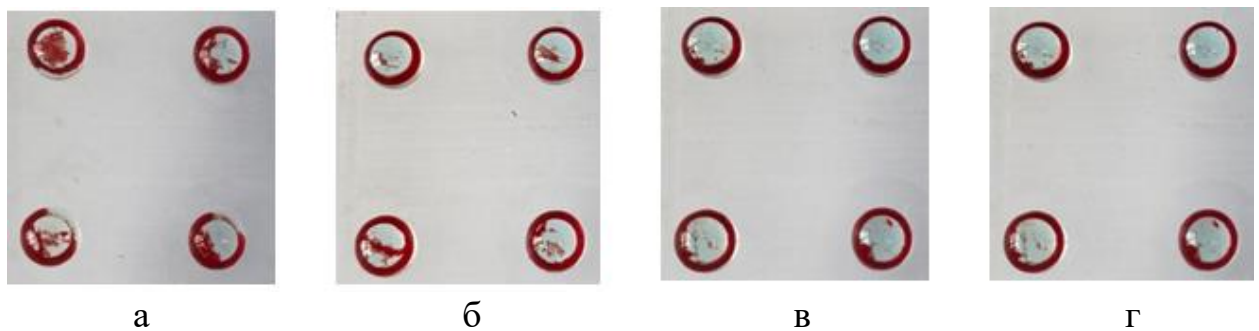


Рисунок 2.49 – Фотография пробы с положительной реакцией агглютинации в кювете с выступом 0,68 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; гематокрит 47,3; цоликлон В (а – объём 12 мкл; б – объём 16 мкл; в – объём 20 мкл; г – объём 24 мкл)

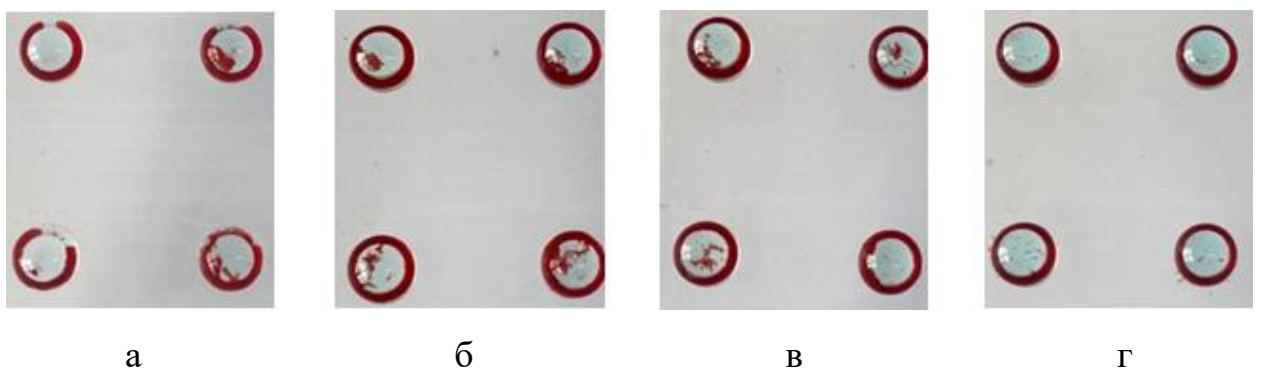


Рисунок 2.50 – Фотография пробы с положительной реакцией агглютинации в кювете с выступом 0,74 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; гематокрит 47,3; цоликлон В (а – объём 12 мкл; б – объём 16 мкл; в – объём 20 мкл; г – объём 24 мкл)

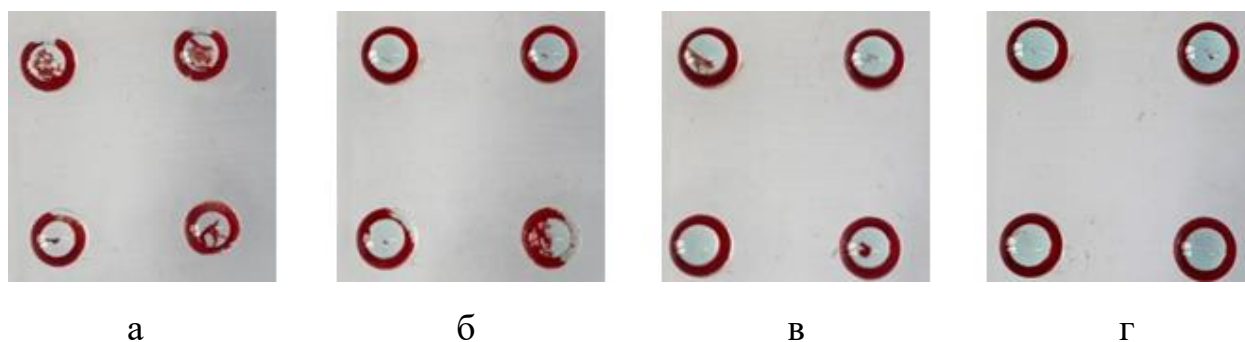


Рисунок 2.51– Фотография пробы с положительной реакцией агглютинации в кювете с выступом 0,84 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; гематокрит 47,3; цоликлон В (а – объём 12 мкл; б – объём 16 мкл; в – объём 20 мкл; г – объём 24 мкл)

В ходе исследований было замечено, что при увеличении объёма капельного образца, его устойчивость снижается. Образцы объёмами более 20 мкл при вибрационном воздействии часто разливались. А капельный образец объёмом 12 мкл в ряде случаев сохраняет в центральной части капли иммунные комплексы, что приводит к снижению светопропускания, и как следствие – ложноотрицательным результатам. Поэтому в дальнейших исследованиях для определения диапазона соотношений использовались объёмы 16 и 20 мкл.

2.6.2 Определение соотношения реагентов иммунологической реакции и параметров кюветы для размещения капельного образца.

Соотношение реагентов в исследуемой пробе является важным параметром, так как от него зависит количество образуемых иммунных комплексов в положительных пробах для реакции агглютинации. Соотношения крови к солевому раствору моноклональных антител (цоликлон) были взяты от 1:1 до 1:5. Для следующих исследований были взяты образцы крови с высоким уровнем гематокрита (40 – 50), аналогично предыдущим опытам.

На рисунке 2.52 представлены диаграммы максимального значения напряжения с фотоэлектрического преобразователя (ФЭП) при разном соотношении крови и цоликлонов и значением гематокрита 40 – 50.

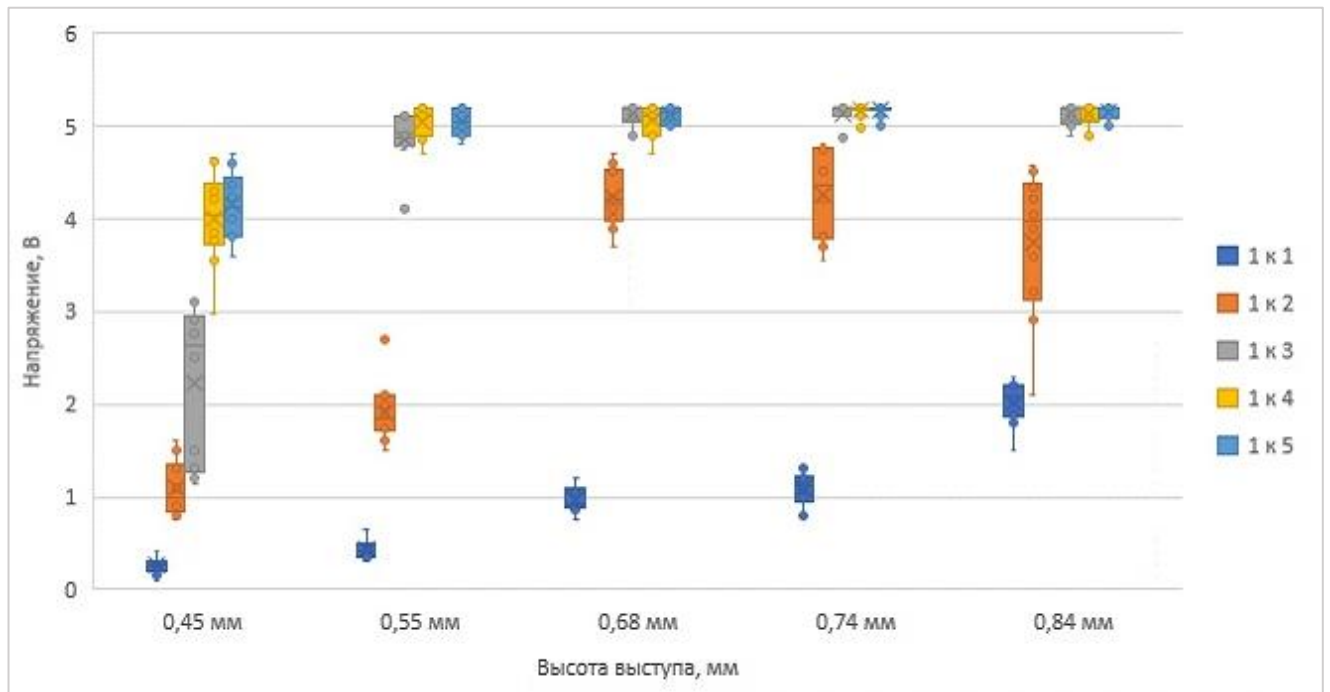


Рисунок 2.52 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП при разном соотношении крови и цоликлонов и значением гематокрита 40–50 (положительные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм, объём пробы 16 мкл

Из диаграмм видно, что капельные образцы с содержанием крови и цоликлона в соотношениях 1 к 1 и 1 к 2 не подходят для исследований, поскольку выходное напряжение достаточно низкое в следствии того, что, вероятность нахождения агглютинатов в центральной части очень высокая. Это может быть связано с недостаточным количеством моноклональных антител в образце для связывания эритроцитов в иммунные комплексы. При увеличении соотношении цоликлона к крови наблюдается увеличение светопропускание капельных образцов, что подтверждается данными диаграммы. Исходя из полученных данных в созданных нами условиях эксперимента, соотношения крови к цоликлону 1 к 3 и 1 к 4 приводят к высоким значениям светопропускания в исследуемых образцах. Соотношение крови к цоликлону 1 к 5 и более не подходит, так как при таком соотношении в случае разбавления крови с низким гематокритом (менее 30) возможны ложноположительные результаты в отрицательных пробах.

Разрабатываемая методика для определения реакции агглютинации в капельном образце построена на сравнении светопропускания проб, содержащих реакцию агглютинации с пробой, в которой отсутствуют иммунные комплексы,

поэтому светопропускание капли отрицательных проб является очень важным параметром. Были проведены исследования задачей которых было установить возможный диапазон значений сигнала для отрицательных проб. Эксперименты были выполнены с образцами крови, имеющими разное значение гематокрита от 18 до 50.

В серии дальнейших экспериментов использовались капельные образцы объёмом 16 мкл и 20 мкл, соотношение крови к цоликлону 1 к 3, 1 к 4, 1 к 5, не содержащие реакцию агглютинации (отрицательные пробы). Для исследований были взяты образцы крови с разными значениями гематокрита от 18 до 50. По значению гематокрита крови условно разбиваем на 3 группы: с низким значением гематокрита – 18 – 30, средним значением гематокрита – 30 – 40, с высоким значением гематокрита – 40 – 50.

Исходя из полученных результатов, представленных на диаграммах на рисунках 2.53 – 2.56 в исследуемых пробах объёмом 16 мкл, 20 мкл, соотношением крови и цоликлона 1 к 3 или 1 к 4, со значением гематокрита от 30 до 40 напряжение с ФЭП находится в диапазоне значений от 0,6 до 1 В. Данные значения статистически значимо отличаются от значений напряжения с ФЭП в образцах, содержащих иммунные комплексы (положительные пробы). Это позволяет сделать вывод, что величина напряжения с ФЭП отрицательной пробы не будет превышать значения 1 В при уровне гематокрита выше 30.

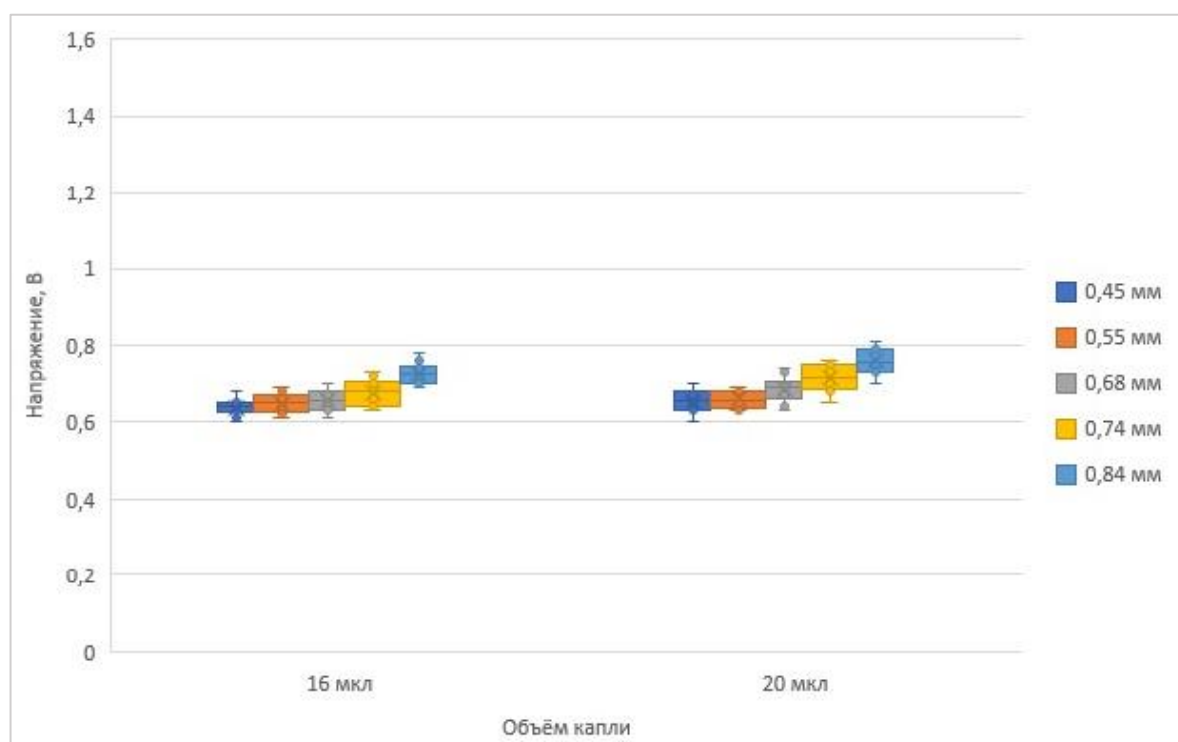


Рисунок 2.53 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП при значении гематокрита 40 – 50 и соотношением цельной крови к цоликлону 1 к 3 (отрицательные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

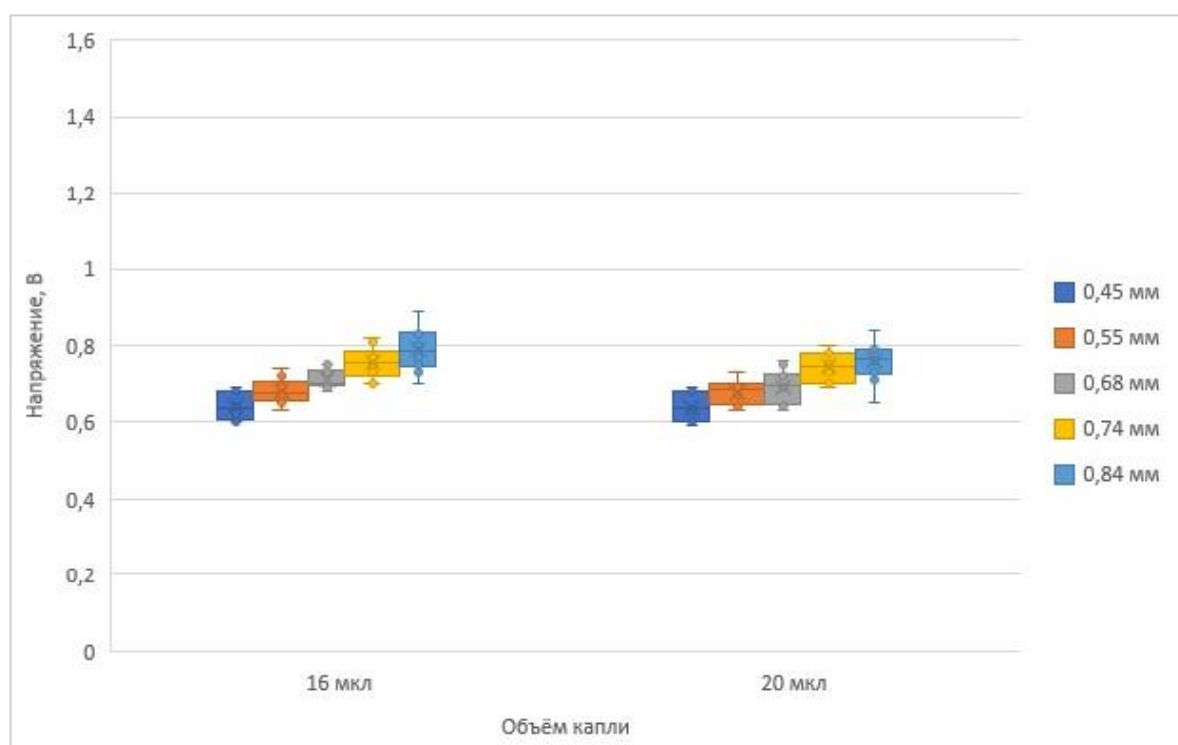


Рисунок 2.54 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 40 – 50 и соотношением цельной крови к цоликлону 1 к 4 (отрицательные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

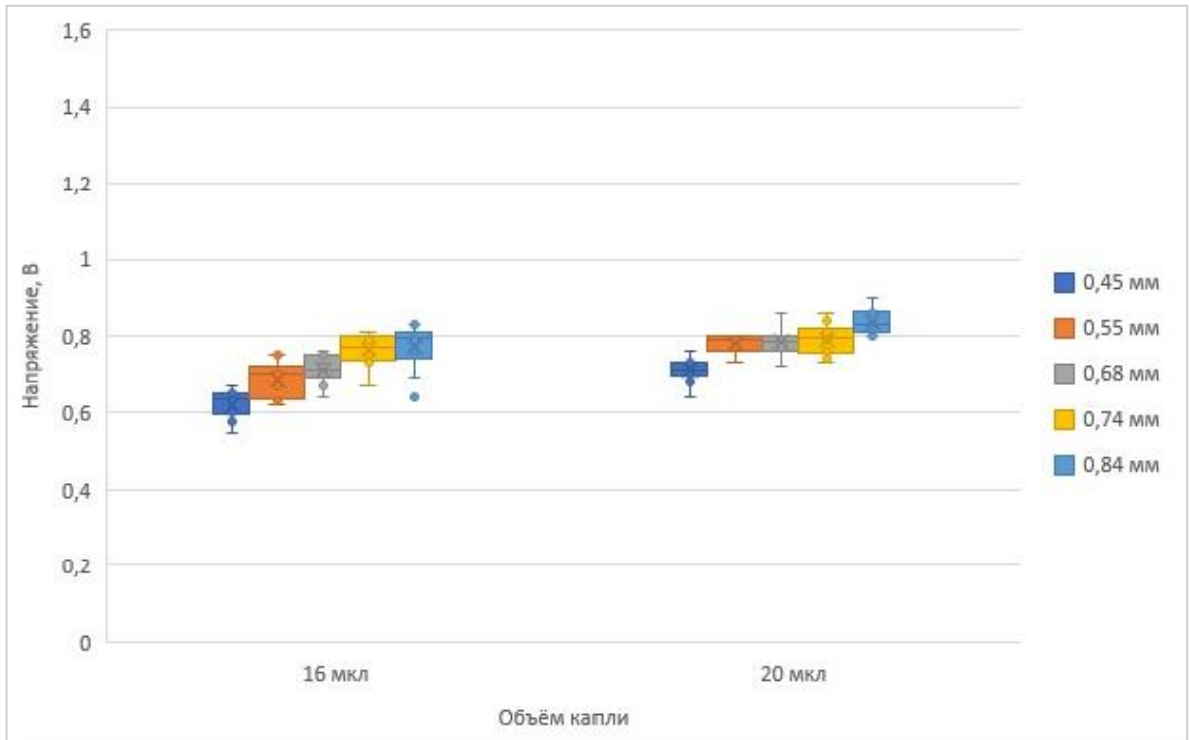


Рисунок 2.55 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 30 – 40 и соотношением цельной крови к цоликлону 1 к 3 (отрицательные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

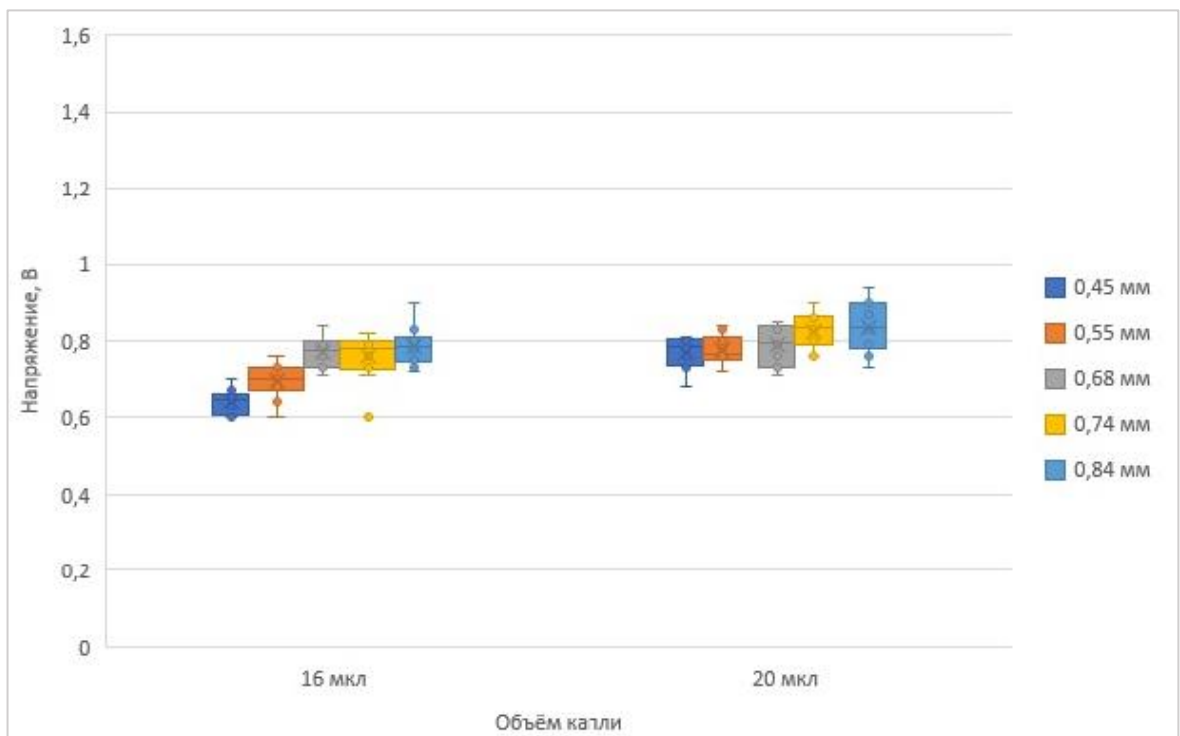


Рисунок 2.56 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 30 – 40 и соотношением цельной крови к цоликлону 1 к 4 (отрицательные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

Эксперименты с использованием крови с низким уровнем гематокрита (18 – 22) дали более высокие значения напряжения с ФЭП из-за меньшего содержания эритроцитарной массы в крови. Согласно данным диаграмм, представленных на рисунках 2.57 – 2.59, уровень напряжения с ФЭП достигает 1,3 В при соотношении крови к цоликлону 1 к 3 и 1 к 4 в пробах объёмом 16 и 20 мкл с низким уровнем гематокрита.

Разбавление крови с низкими значениями гематокрита в соотношении 1 к 5 (рисунок 2.60) привело к значениям напряжения с ФЭП от 1,3 до 2,5 В.

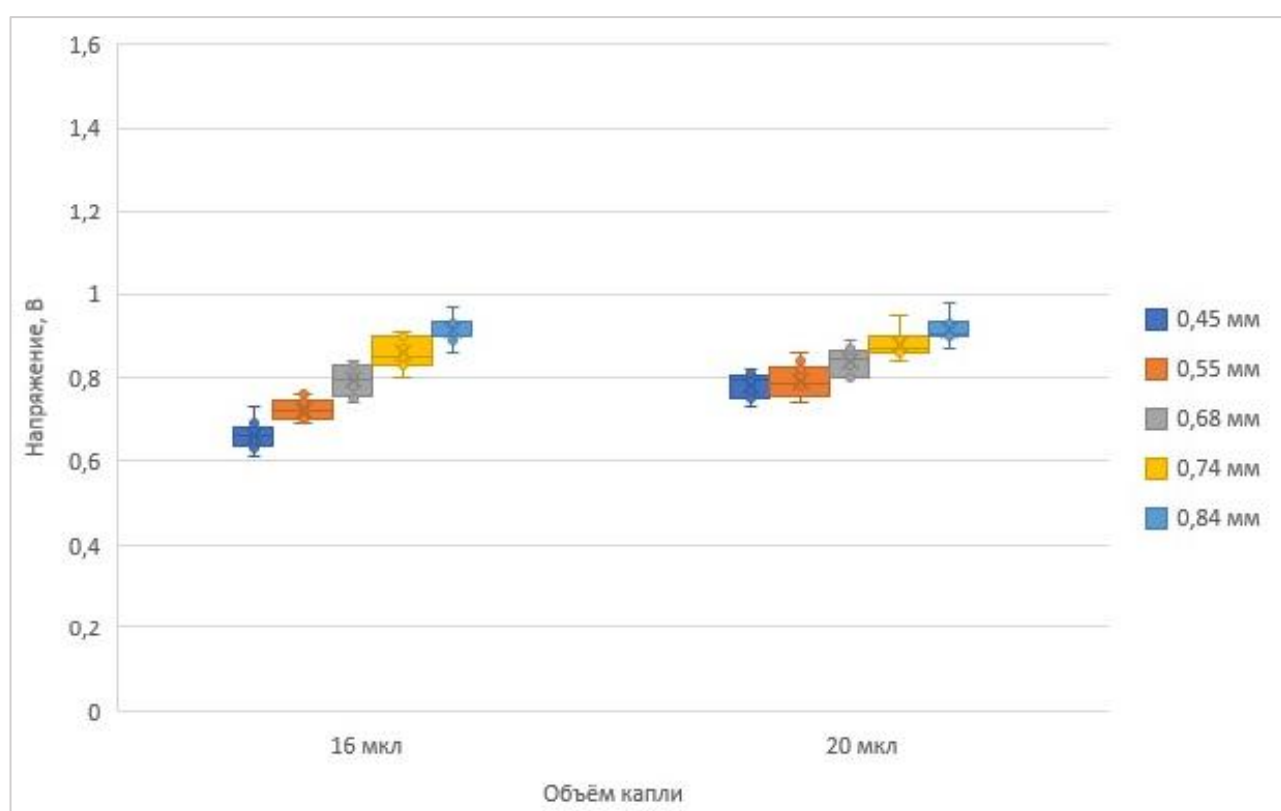


Рисунок 2.57 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 30 – 40 и соотношением цельной крови к цоликлону 1 к 5 (отрицательные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

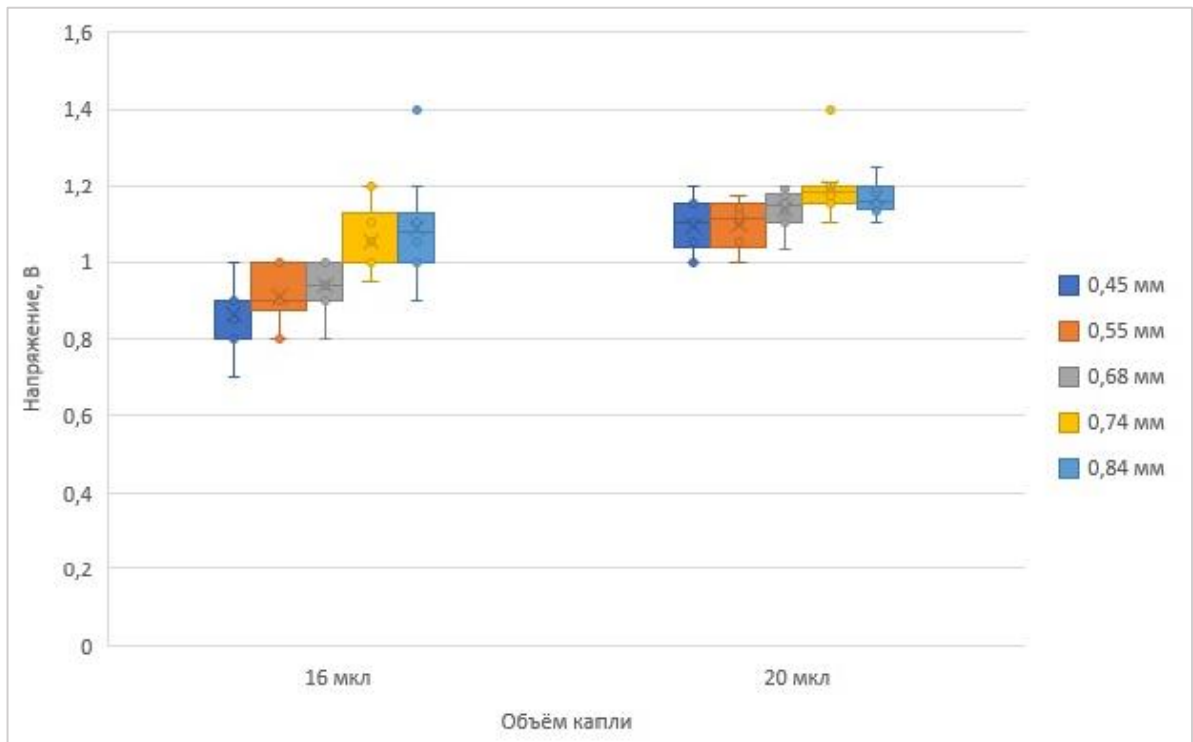


Рисунок 2.58 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 18 – 30 и соотношением цельной крови к цоликклону 1 к 3 (отрицательные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

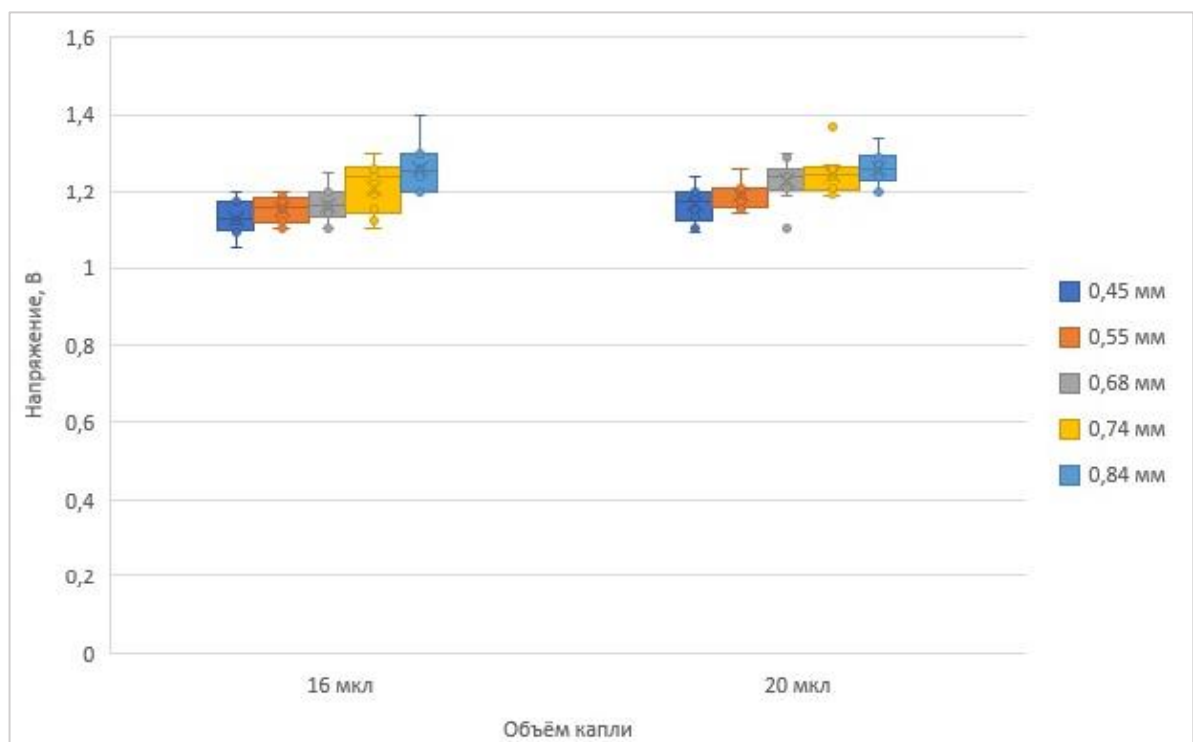


Рисунок 2.59 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 18 – 30 и соотношением цельной крови к цоликклону 1 к 4 (отрицательные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

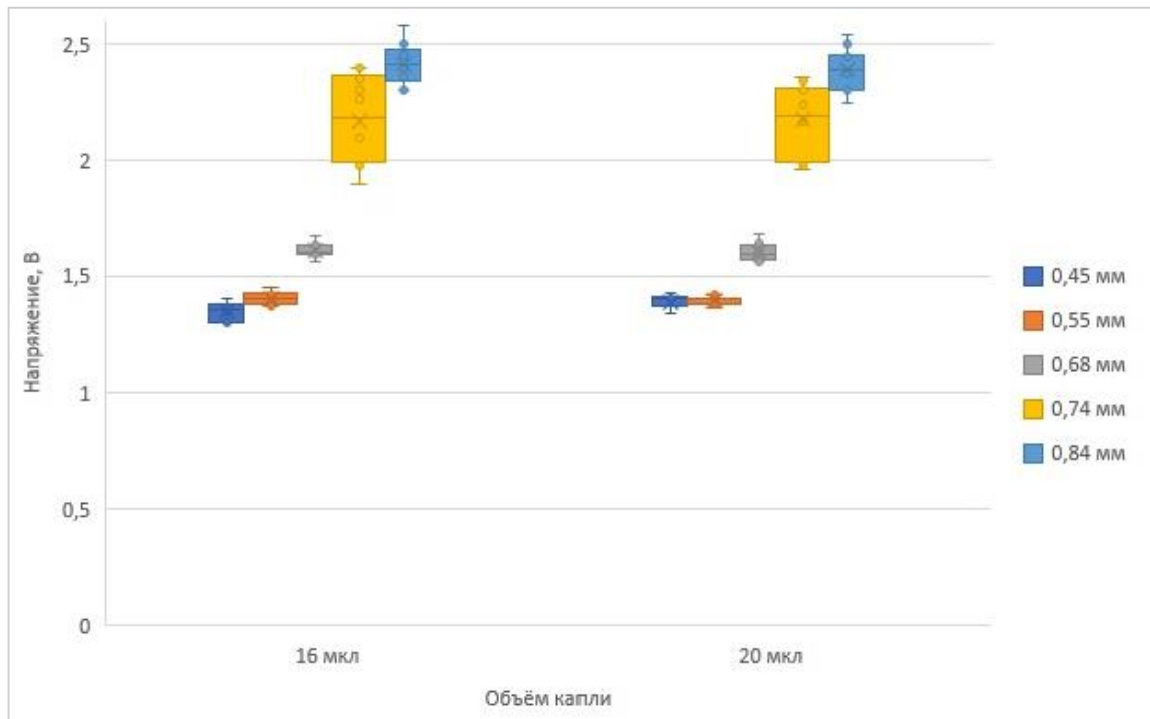


Рисунок 2.60 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 18 – 30 и соотношением цельной крови к цоликлону 1 к 5 (отрицательные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

Исходя из полученных данных, для исключения ошибки определения наличия агглютинации в пробах использование соотношения крови к цоликлону 1 к 5 не рекомендуется. В связи с вышеуказанными данными для определения наличия иммунных комплексов в пробах крови было принято считать анализ отрицательным при величине напряжения с ФЭП не выше 1,5 В, положительным – не ниже 4 В. Испытания показали, что кювета должна иметь высоту выступа основания 0,6 – 0,8 мм, диаметр основания кюветы 4,76 – 5 мм для объёма капельного образца 16 – 20 мкл.

2.6.3 Оценка влияния величины гематокрита образца и параметров кюветы на результаты исследования

Для подтверждения выдвинутых требований к капельному образцу (соотношение крови к цоликлону 1:3, 1:4, объём образца 16 мкл, 20 мкл) с целью обнаружения иммунологической реакции была проведена серия опытов с кюветами с одинаковыми диаметром основания 4,75 мм и диаметром выступа 3 мм,

но с разными значениями высоты выступа (0,45 мм, 0,55 мм, 0,68 мм, 0,74 мм, 0,84 мм). Исследования проводили с образцами крови с разными значениями гематокрита от 18 до 50. Использовали солевые растворы моноклональных антител (цоликлон А, цоликлон В, цоликлон D) [11, 23].

На рисунке 2.61 представлена диаграмма максимального значения напряжения с фотоэлектрического преобразователя (ФЭП) при разном объёме и значением гематокрита от 18 до 30. Исходя из данных диаграмм максимального значения напряжения с фотоэлектрического преобразователя (рисунки 2.61 и 2.62) для образцов крови с низким значением гематокрита подходят кюветы с высотой выступа от 0,45 до 0,84 мм.

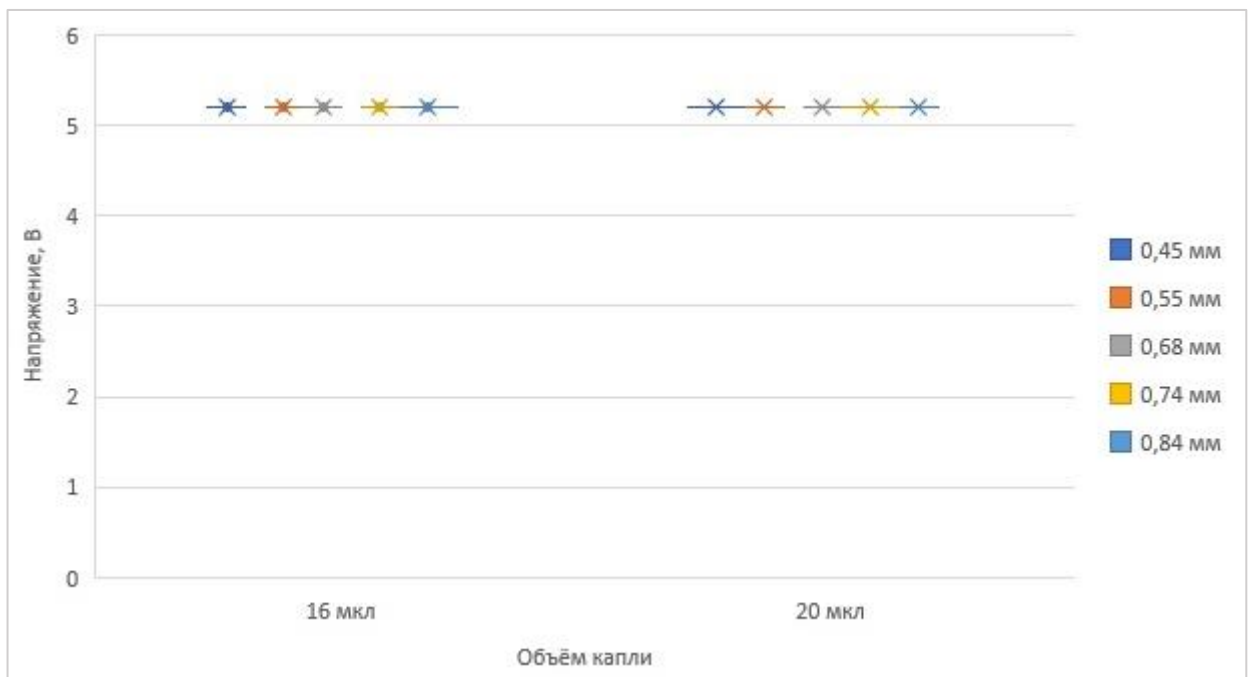


Рисунок 2.61 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 18 – 30 и соотношением цельной крови к цоликлону 1 к 3 (положительные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

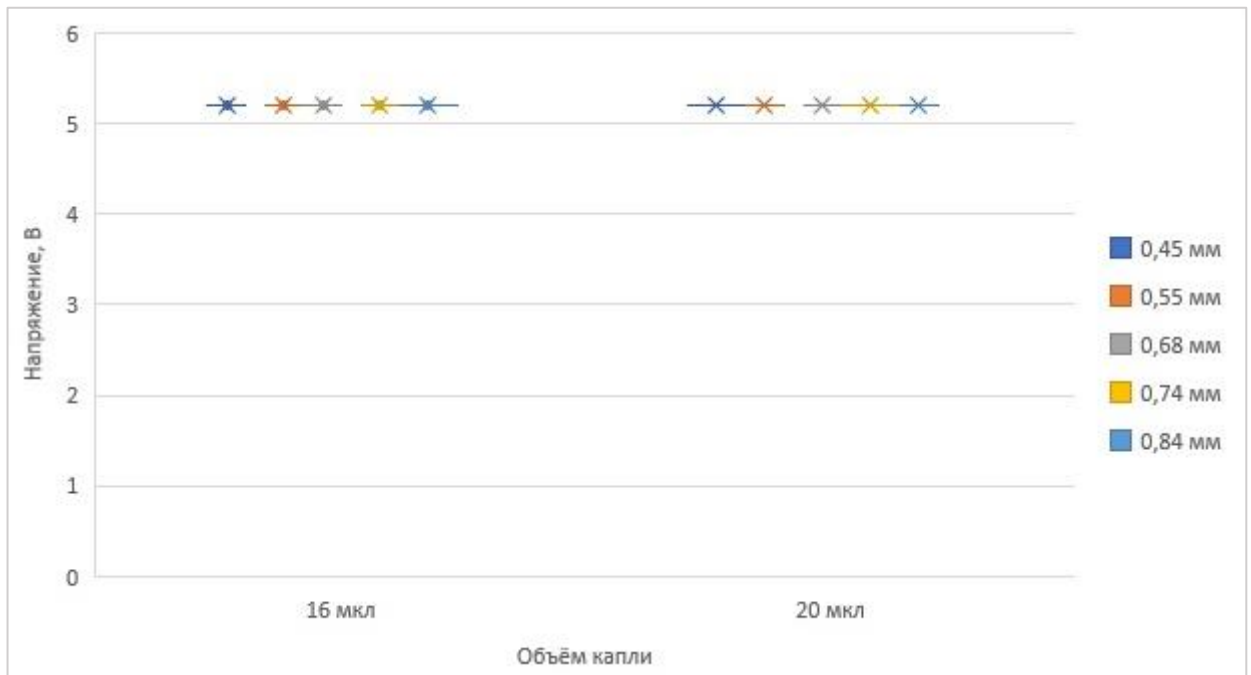


Рисунок 2.62 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 18 – 30 и соотношением цельной крови к цоликлону 1 к 4 (положительные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

Для исследуемых образцов крови с высоким и средним уровнем гематокрита (рисунки 2.63 – 2.66) при объёме капельного образца 16 – 20 мкл, соотношении крови к цоликлону 1 к 3 или 1 к 4, подходит высота выступа кюветы от 0,6 до 0,84 мм. В кюветах с высотой выступа 0,84 мм в части экспериментов в центральной части капельного образца остаются иммунные комплексы в виде небольших точек. Поэтому кюветы с выступом больше 0,84 мм брать не целесообразно, так как в центральной части образца могут остаться иммунные комплексы и это может привести к ложноотрицательному результату анализа, а это недопустимо для определения группы крови.

На рисунке 2.67 представлены данные, полученные в серии опытов для определения диаметра выступа кюветы. В ходе эксперимента оценивалась разница значений напряжений с ФЭП между пробами капельных образцов с наличием и отсутствием агглютинации в них. Для экспериментов был взят объём капельного образца 16 мкл, соотношение крови к цоликлону 1 к 3, диаметр выступа от 2 до 3,5 мм, высота выступа 0,84 мм, диаметр основания кюветы 5 мм.

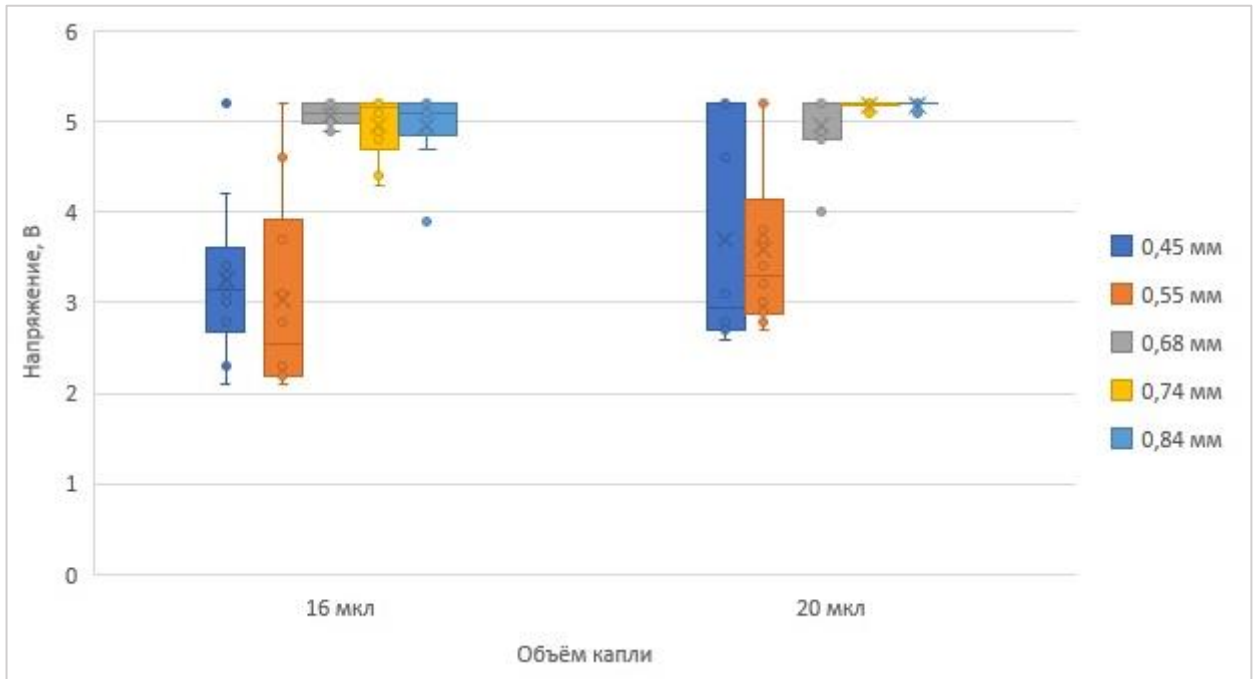


Рисунок 2.63 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 40 – 50 и соотношением цельной крови к додекану 1 к 3 (положительные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

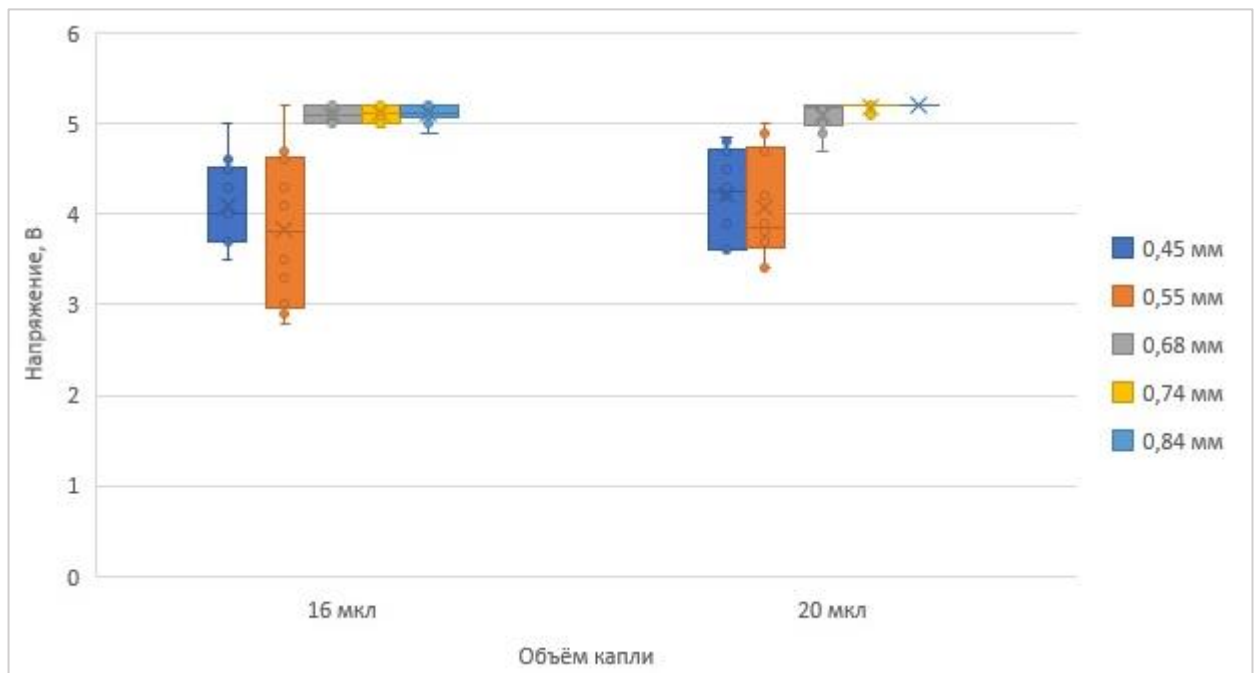


Рисунок 2.64 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 40 – 50 и соотношением цельной крови к додекану 1 к 4 (положительные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

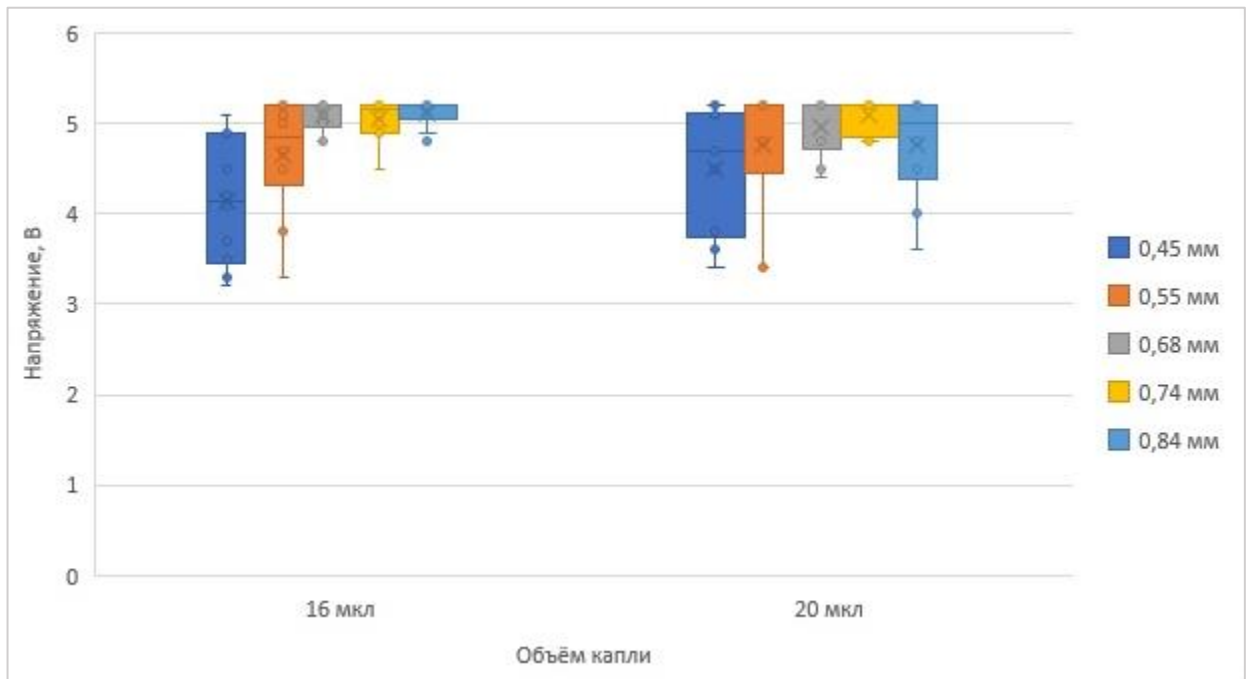


Рисунок 2.65 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 30 – 40 и соотношением цельной крови к цоликлону 1 к 3 (положительные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

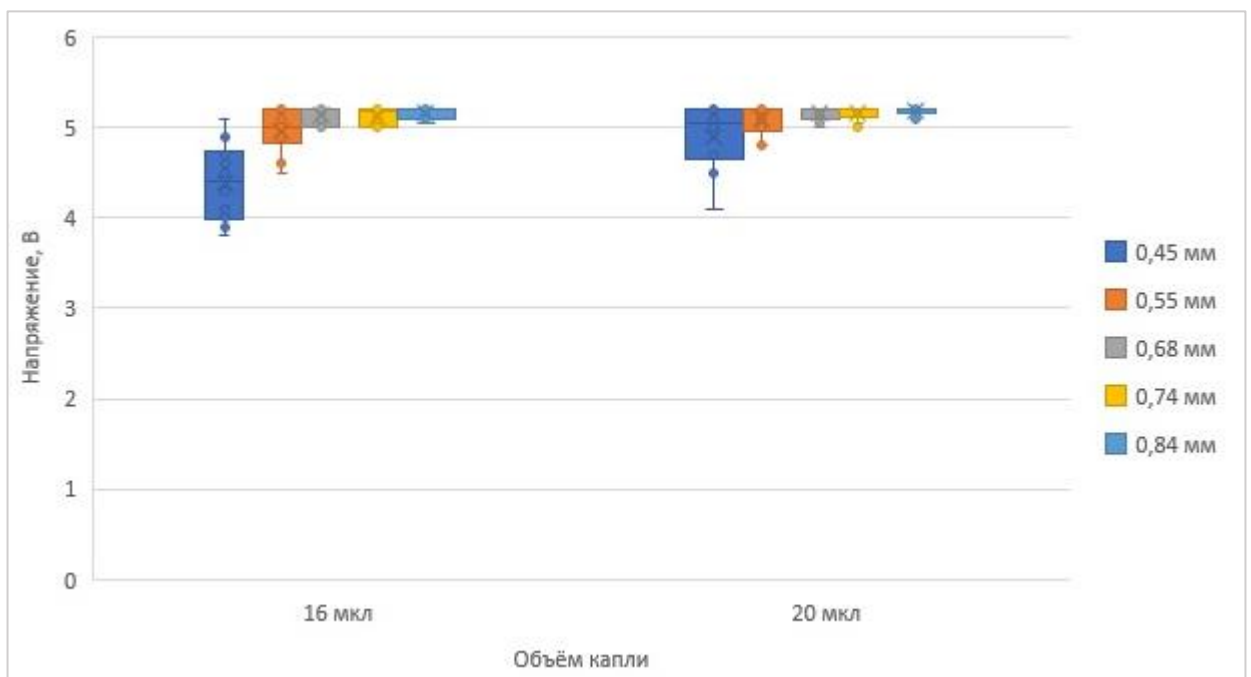


Рисунок 2.66 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 30 – 40 и соотношением цельной крови к цоликлону 1 к 4 (положительные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм

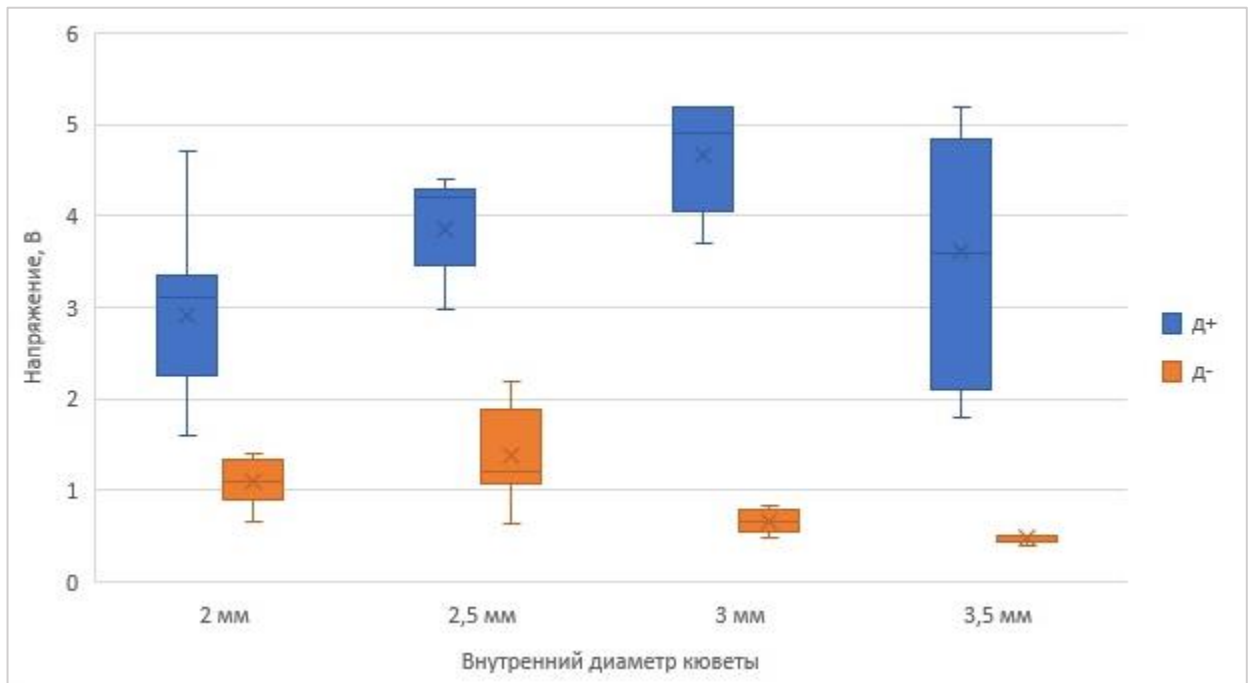


Рисунок 2.67 – Диаграмма максимального значения напряжения с ФЭП для крови со значением гематокрита 30 – 50 и соотношением цельной крови к цоликлону 1 к 3 (положительные и отрицательные пробы). Высота выступа кювет 0,45 – 0,84 мм, диаметр выступа основания кюветы 2 – 3,5 мм. Объем пробы 16 мкл, цоликлон D

Из анализа экспериментальных данных следует, что кюветы диаметром выступа 2 мм не подходят из-за низкого светопропускания сквозь него. Опыты с кюветой диаметром выступа 3,5 мм показали большой разброс значений напряжения с ФЭП из-за скопления агглютинатов в центральной части капельного образца. Это связано с неспособностью вмещать агглютинаты за пределами выступа кюветы в объеме фигуры, которая образуется между стенкой выступа и поверхностью капельного образца (рисунок 2.25).

Согласно полученным данным наиболее подходящей кюветой для проведения анализа группы крови является кювета с диаметром выступа 2,5 – 3 мм, высотой выступа 0,6 – 0,8 мм, диаметром основания кюветы 4,75 – 5 мм. Кюветы с указанными размерами способствуют распределению иммунных комплексов на периферию капельного образца без нахождения агглютинатов в центре.

Выводы

Рассмотренные в главе механические колебания частотой 10 – 80 Гц влияют на увеличение скорости образования иммунных комплексов, а также на объединения иммунных комплексов. Применение режима вибрации, состоящего из двух этапов, уменьшает количество агглютинатов в осевой части капельного образца, повышая этим светопропускание исследуемой пробы. Первый этап – вибрация с частотой 5 – 10 Гц и амплитудой 0,7 – 1 мм в течение 30 – 40 сек способствует перемешиванию образца и увеличению скорости образования агглютинатов. Второй этап – вибрация с частотой 30 – 55 Гц, амплитудой 0,15 – 0,2 мм способствует локализации агглютинатов на периферии капельного образца и уменьшению вероятности нахождения агглютинатов в центре кюветы. Совместное использование кюветы специальной формы и механических колебаний способствуют локализации иммунных комплексов на периферии капельного образца.

Кюветы, имеющие высоту выступа 0,45 – 0,55 мм, не обеспечивают распределение агглютинатов за пределами выступа в исследуемых пробах с высоким гематокритом крови. Кюветы с высотой выступа от 0,6 до 0,8 мм способствуют высокому значению светопропусканию пробы объёмом 16 – 20 мкл при соотношении крови к цоликлону 1:3 и 1:4 при положительной реакции. Для всех встречающихся значений гематокрита кюветы с высотой выступа от 0,6 до 0,84 мм, диаметром выступа 2,5 – 3 мм, диаметром основания кюветы 4,75 – 5 мм способствуют лучшему распределению агглютинатов на периферию капельного образца, что позволяет обнаружить иммунологические комплексы оптическим методом.

Напряжение с ФЭП от 0,6 до 1,3 В соответствуют светопропусканию образцов не содержащих агглютинаты при гематокрите образцов от 18 до 50. При достижении напряжения с ФЭП 4,5 – 5,2 В, в процессе исследования можно считать, что в пробе содержатся иммунологические комплексы. Соответственно если отношение напряжения с фотометрического канала исследуемого образца и

напряжения с канала контрольного образца находится в пределах от 3 и более, то проба считается положительной (содержит иммунологические комплексы). При значении отношения напряжения близким к 1 (отличающиеся от контроля не более чем на 20%) пробы будут считаться отрицательными (не содержит агглютинаты). Если отношение напряжения с фотометрического канала исследуемого образца и напряжения с канала контрольного образца находится в пределах от 1 до 3, то следует повторно провести анализ.

Глава 3. Макет устройства для автоматизированной оценки специфической агглютинации.

Результаты, полученные в ходе проведения экспериментальных исследований, позволили определить требования к макету устройства для автоматического определения группы крови человека. Разработана структурная схема устройства и схемотехнические решения для реализации аппаратной части макета. Собран макет, разработана и описана методика проведения анализа, возможные ошибки, возникающие при её исполнении.

1.1 Структура и принцип работы устройства

По результатам предварительных испытаний оптико-вибрационного метода исследования для оценки процесса гемагглютинации, описанных в Главе 2, были выдвинуты основные технические требования к устройству для его реализации и разработана структурная схема устройства, которое может быть использовано для проведения испытаний в клинических условиях.

В соответствии с техническими требованиями макет должен содержать:

1. Электромеханическую часть – вибрационную платформу с возможностью осуществлять режимы вибрации в диапазоне частот от 10 до 80 Гц и амплитудой от 0,15 до 2 мм. Режимы вибрации должны устанавливаться программным путем.

При конструировании электромеханической части также необходимо учесть, что на подвижной части платформы должна фиксироваться кювета с исследуемыми образцами, при этом во время проведения фотометрических измерений должно происходить точное позиционирование исследуемых капельных проб относительно оптических измерительных каналов.

2. Многоканальную систему оптико-электронных преобразователей для измерения светопропускания не менее 5 исследуемых образцов: 1 – проба с цоликлоном А, 2 – проба с цоликлоном В, 3 – проба с цоликлоном АВ, 4 – проба с цоликлоном D, 5 – контрольная проба (кровь с физиологическим раствором).

3. Аналоговую электронную часть для первоначальной обработки сигналов с фотоприемников и управления источниками излучения.
4. Блок цифровой обработки сигналов и управления.
5. Систему согласования и передачи сигналов на компьютер.
6. Источник питания устройства.

Блоки должны быть размещены в едином корпусе. Корпус должен обеспечивать защиту блока первичного преобразователя (фотометрическая измерительная часть) от внешней фоновой засветки.

Устройство должно иметь небольшие габариты, выдавать итоговый результат (группа крови и резус-фактор исследуемого образца) на встроенном в прибор экране (для портативного варианта устройства) или на мониторе компьютера, иметь возможность подключения к компьютеру для передачи данных и обновления ПО. При разработке устройства первый вариант макета был разработан на базе блока цифрового управления и анализа сигналов USB6009 (National Instrument). Схема реализованного устройства представлена на рисунке 3.1. Основные габариты устройства определяются камерой первичного преобразователя для размещения и фотометрии образцов. Поэтому большое внимание было уделено разработке конструкции данного блока.

Камера состоит из вибрационной платформы, на которой размещаются кюветы и системы вертикально расположенных источников и приемников излучения, размещенных соосно с анализируемым образцам. Источники под исследуемыми капельными образцами (встроены в подвижную платформу для размещения кювет), приемники закреплены неподвижно над вибрационной платформой. Причем конструкция преобразователя позволяет юстировать приемники излучения для позиционирования их в области фокусного пятна капельных образцов.

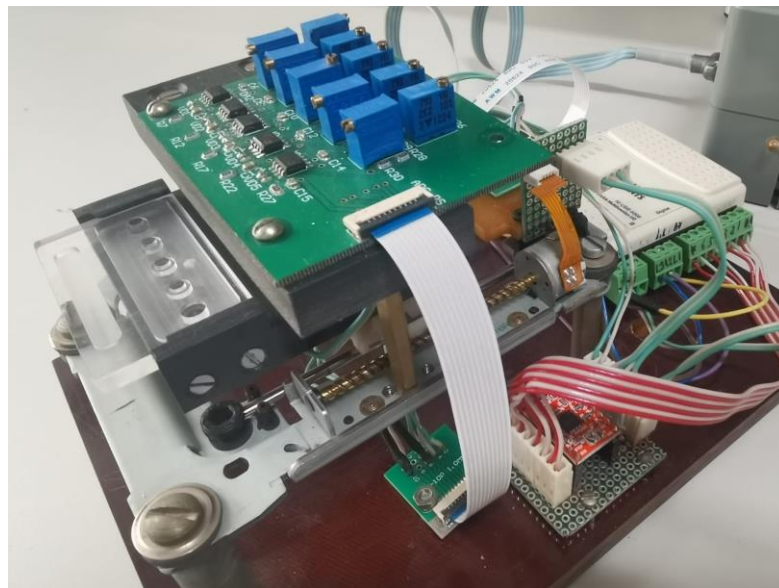
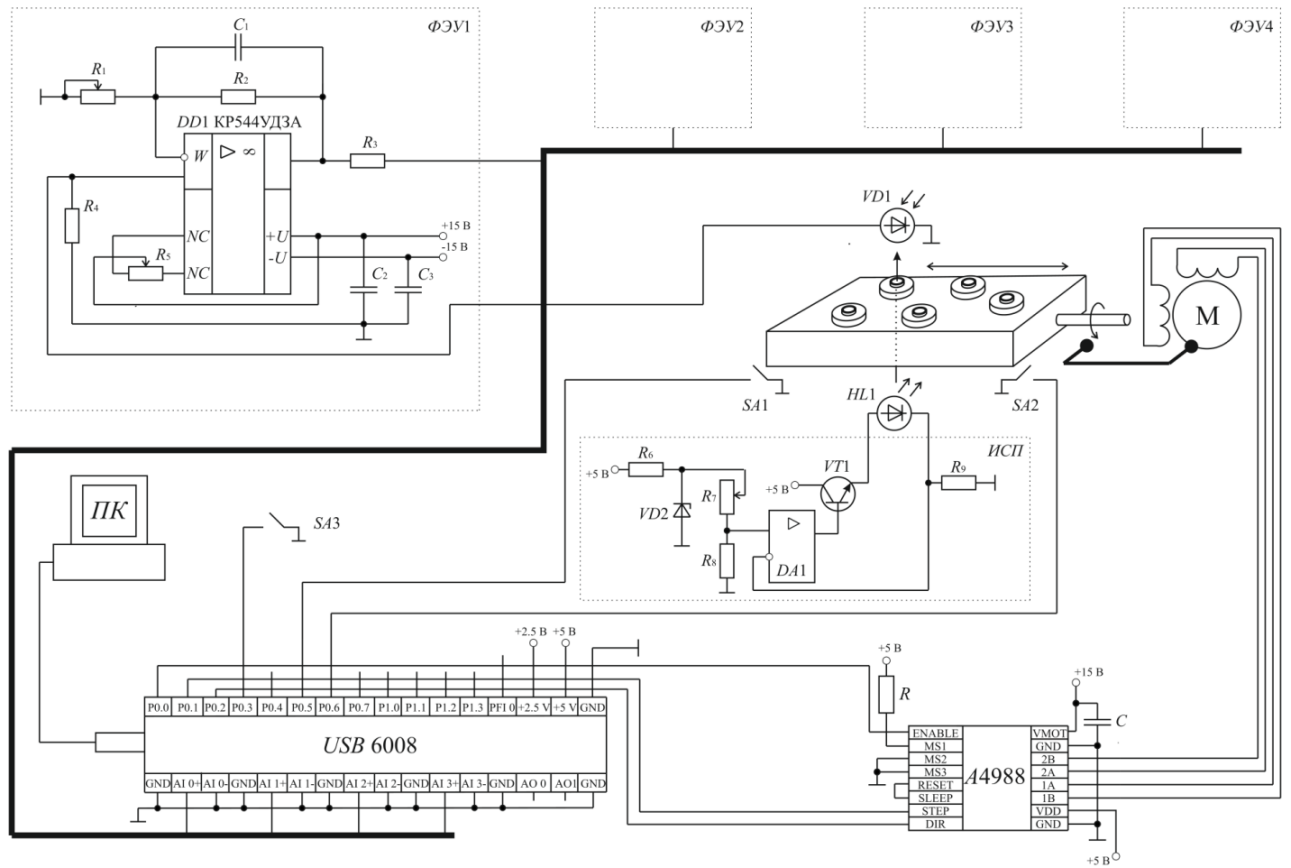


Рисунок 3.1 – Схема и фото собранного макета устройства для определения агглютинации в капельном образце

Система перемещения платформы не только создает обратнопоступательные её движения при вибрации, но и выдвигает платформу на достаточное расстояние из блока первичного преобразователя для удобства загрузки и выгрузки кювет с пробами. Данная электромеханическая система

построена на базе привода каретки CDROM и приводится в движение шаговым двигателем, управляемым через блок USB6009 (или микроконтроллером STM 32 – в последующих вариантах реализации устройства) через драйвер шагового двигателя A4988.

Аналоговая часть включает усилители сигналов с фотодиодов оптических каналов и блок стабилизации токов источников излучения.

На этапе моделирования макета с целью более простой отладки алгоритма работы устройства и анализа сигналов в качестве блока цифрового управления и анализа сигналов взято устройство ввода вывода цифровых и аналоговых сигналов USB6009 (National Instrument). Данное устройство на этапе отладки устройства позволяет легко реализовать систему управления макетом, считывания сигналов с фотоприемных устройств и передачи сигнала в компьютер для его обработки. Как указано выше, портативный вариант устройства, после отработки алгоритма работы, будет реализован на базе микроконтроллера STM32.

В макете устройства для определения группы крови не требуется термостатирование измерительной камеры, так как реакция агглютинации хорошо проходит и при комнатных температурах. И согласно методическим требованиям к данному анализу, не требуется термостабилизация образцов. Также за время проведения измерений (менее 2 мин) капля не успевает испариться, поэтому нет необходимости в системе поддержания повышенной влажности, которая бы за счет создания атмосферы насыщенного пара в измерительной камере уменьшила бы испарение капельных проб.

В данной установке используются кювета для размещения капель, изготовленная из листового полиметилметакрилата (органическое стекло) путем фрезерования. Также ранее нами были использованы кюветы из стеклотекстолита с прозрачными вкладышами для размещения капельных проб (рисунок 3.6).

Устройство работает следующим образом. При первом нажатии кнопки SA3, расположенной на корпусе прибора, за счет вращения шагового двигателя происходит выезд кюветы из измерительного блока устройства наружу до замыкания ключа SA1. Производится нанесение на кюветы с помощью пипеточных

дозаторов соответствующих цоликлонов и анализируемой крови. В измерительные кюветы наносятся Цоликлон А, Цоликлон В, Цоликлон АВ и цоликлон D. В пятую кювету помещается образец крови, разбавленный физиологическим раствором, в том же соотношении что и образцы с цоликлонами, служащий контролем. В данном образце не будет происходить агглютинация и относительно него будет производиться оценка изменений оптических свойств других образцов и делаться вывод о наличии или отсутствии агглютинации в пробах.

После следующего нажатия кнопки SA3 происходит перемещение платформы с кюветами внутрь корпуса до замыкания ключа SA2, по которому производится нулевой отчёт для выставления кювет соосно оптическим каналам.

После того, как кюветы с образцами попадут в область, где происходят оптические измерения, согласно программе, шаговый двигатель путем периодического вращения влево-вправо на заданное число шагов вызывает вибрацию платформы, на которой расположены кюветы с каплями.

В системе использован шаговый биполярный двигатель с несколькими обмотками, в котором ток, последовательно активируя обмотки статора, вызывает дискретные угловые перемещения (шаги) ротора. Управляется шаговый двигатель с помощью драйвера A4988. Размер шага задаётся комбинациями переключателей на входах MS1, MS2, MS3. Разрешается работа сигналом с цифрового выхода блока АЦП USB-6008, который в свою очередь подчиняется алгоритму, заложенному в программе на компьютере. Каждый импульс на входе STEP соответствует одному микрошагу двигателя, направление вращения, которого зависит от сигнала на выходе DIR.

Колебания платформы с кюветами обеспечивают размешивание образцов с кровью, а также способствуют формированию более крупных эритроцитарных агрегатов и соответственно лучшему просветлению среды в случае агглютинации.

В процессе измерения кювету снизу перпендикулярно основанию капли освещают световым потоком диаметром 3 – 3,5 мм от источников излучения. В качестве источников излучения использованы светодиоды АЛ107 (спектр излучения – ближний ИК диапазон). Фотоприёмниками являются фотодиоды ФД256

(чувствительны в ближнем ИК диапазоне). Работа в инфракрасном диапазоне в данном оптическом канале позволяет избавиться от внешних засветок проб, которые могут исказить реальное просветление пробы. Источники оптического излучения подключены к источнику стабильного тока, а приемники оптического излучения через соответствующие усилители фототока, подключены к аналоговым входам устройства USB-6008. Усиление получаемого сигнала с фотодиодов производится с помощью фотоэлектрических усилителей (ФЭУ), собранных на базе дифференциального операционного усилителя. Фотометрирование образцов происходит в момент пауз между вибрациями.

Управление системой, считывание информационных сигналов с оптических измерительных каналов устройства и связь с персональным компьютером осуществляется через многофункциональное устройство ввода-вывода аналогово-цифровой преобразователь USB-6008 (National Instruments). На его аналоговые входы подаются сигналы с выхода фотоэлектрических усилителей, усиливающих сигналы с оптических приемников. Через цифровые выходы идёт управление драйвером шагового двигателя. Связь с персональным компьютером осуществляется через шину передачи данных по протоколу USB. Программа для анализа полученных данных, управления режимом работы шагового двигателя создана в среде разработки LabVIEW. В ней получаем кривые, которые отражают информацию об оптических свойствах пробы и их изменении в результате протекания каких-либо процессов в пробе. С помощью специальных алгоритмов возможно определение возникновения или отсутствия агглютинации по уровню получаемого сигнала [36, 98].

1.2 Программа для выявления группы крови человека оптико-вибрационным методом

Разработанное устройство управляется через персональный компьютер с помощью программы, написанной в среде LabVIEW [24].

В программе можно настроить необходимые параметры для работы вибрационной платформы, с помощью которой происходят колебания кюветы: задать частоту, амплитуду, скоростью перемещения. Выбрать необходимые временные диапазоны для различных режимов вибрации. Интерфейс программы позволяет в динамике наблюдать изменение напряжения с ФЭП по каждому каналу. Эти данные представлены в виде графиков зависимости напряжения от времени (рисунок 3.5). По окончании цикла работы программы, полученные данные о фотометрии образцов записываются в файл и могут быть в дальнейшем проанализированы.

Обнаружение иммунных комплексов лежит в основе определения группы крови, поэтому в программу было заложено автоматическое определение группы крови по графикам зависимости напряжения, получаемого с фотоэлектрического преобразователя, от времени. Общий интерфейс приложения представлен на рисунке 3.2 [13, 24].

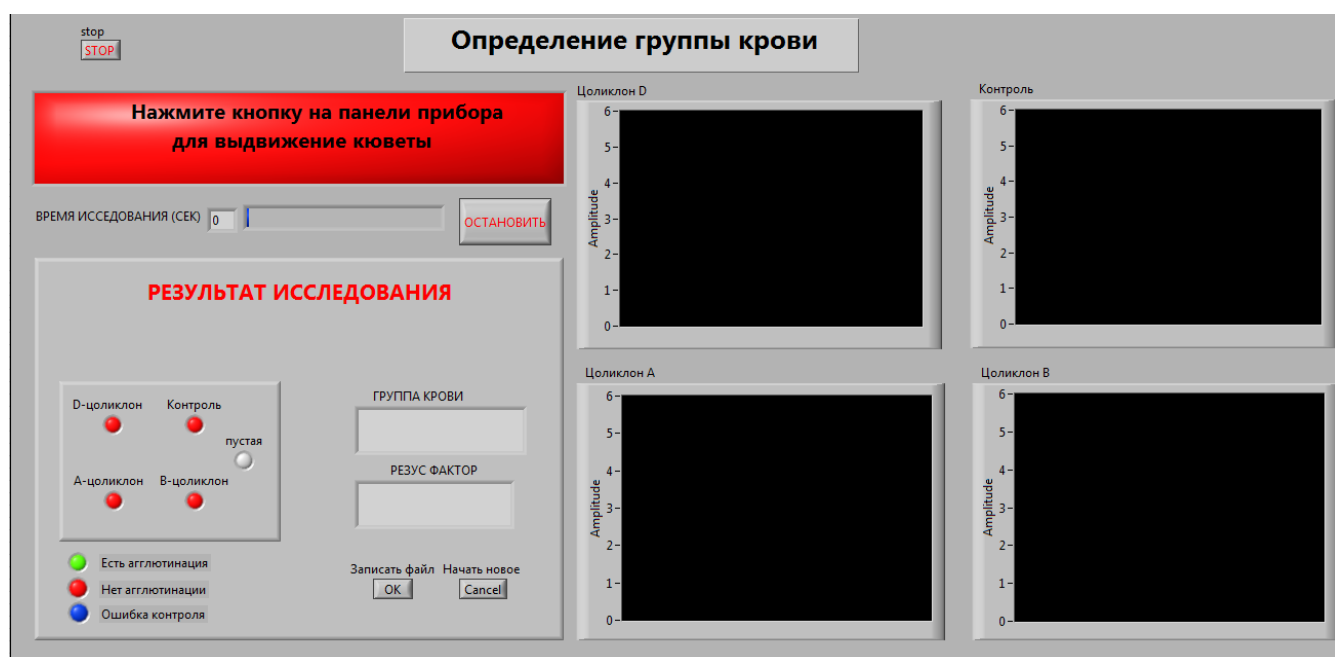


Рисунок 3.2 – Общий интерфейс приложения

1.3 Алгоритм выявления агглютинации в исследуемом образце для автоматического определения группы крови

Основной задачей при разработке алгоритма анализа информации, полученной при фотометрии капель, является определение по фотометрическим кривым факта наличия или отсутствия агглютинации в образце.

Алгоритм работы программы по обнаружению наличия (отсутствия) агглютинации в пробах описан ниже.

Для автоматического определения группы крови программе необходимо по зафиксированным данным зависимости напряжения от времени найти максимальное значение напряжения с ФЭП спустя 90 секунд исследования для всех проб. Далее представлен порядок действий для автоматического определения наличия реакции агглютинации в анализируемой пробе [5, 8, 21, 23].

- 1) По полученным данным изменения напряжения от времени через 90 секунд от начала исследования происходит выбор минимального значения напряжения с ФЭП для контрольного образца. Данному уровню напряжения должны соответствовать исследуемые образцы, в которых не происходит агглютинации.
- 2) Для каждого из 4-х измерительных каналов, по данным зависимости напряжения от времени находится максимальное значение напряжения, зафиксированное с ФЭП анализируемого образца после 90 секунд от начала исследования.
- 3) Программа высчитывает отношение, выбранных максимальных значений напряжения анализируемого образца, к значению напряжения контрольного образца.
- 4) Если отношение напряжений лежит в пределах от 3 и более, то считается что в анализируемом образце содержатся иммунологические комплексы, проба считается положительной для взятого реактива (цоликлона).

- 5) Если отношение напряжений лежит около 1 ± 0.2 , то в анализируемом образце не содержатся иммунологические комплексы, проба считается отрицательной для взятого реактива (цоликлона).
- 6) Если отношение напряжений не лежит выше трех или не равно $1 \pm 0,2$, скорее всего иммунные комплексы недостаточно хорошо распределены по кювете (нет просветления в центре) и тест следует повторить, а также визуально, при смене проб, проконтролировать наличие или отсутствие агглютинации в образцах.

Кривая зависимости напряжения от времени при отсутствии агглютинации, будет неизменной или уменьшится со временем. На рисунке 3.3 приведён график, который построен по данным, полученным с помощью программы. По графику видно, что в исследуемом образце после размешивания спустя 90 с механических воздействий на пробу отсутствует агглютинация, так как напряжение не увеличивается [33, 95, 98].

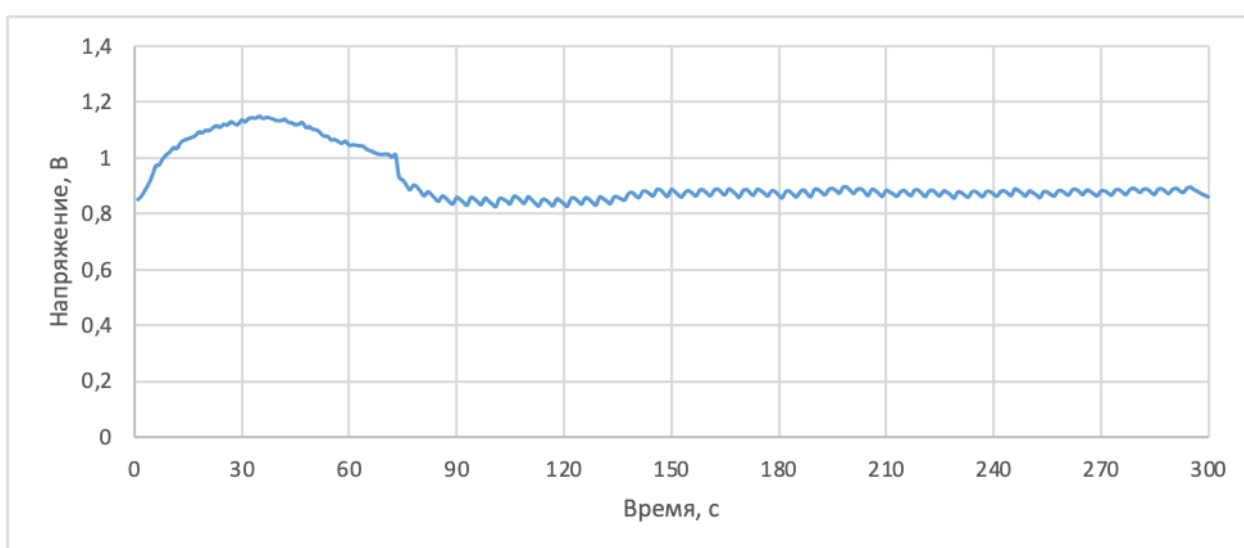


Рисунок 3.3 – Пример графика зависимости напряжения от времени при отсутствии агглютинации

В случае наличия агглютинации в течении 20 – 40 сек (или раньше) происходит значительное просветление капли. Величина выходного напряжения в 2-3 раза превышает величину напряжения с канала контрольного образца. Кривая зависимости напряжения от времени при наличии агглютинации, будет увеличиваться. На рисунке 3.4 приведён график (кривая), которая получена с

помощью программы к макету анализатора. По графику видно, что происходит просветление пробы и в исследуемом образце присутствует агглютинация.

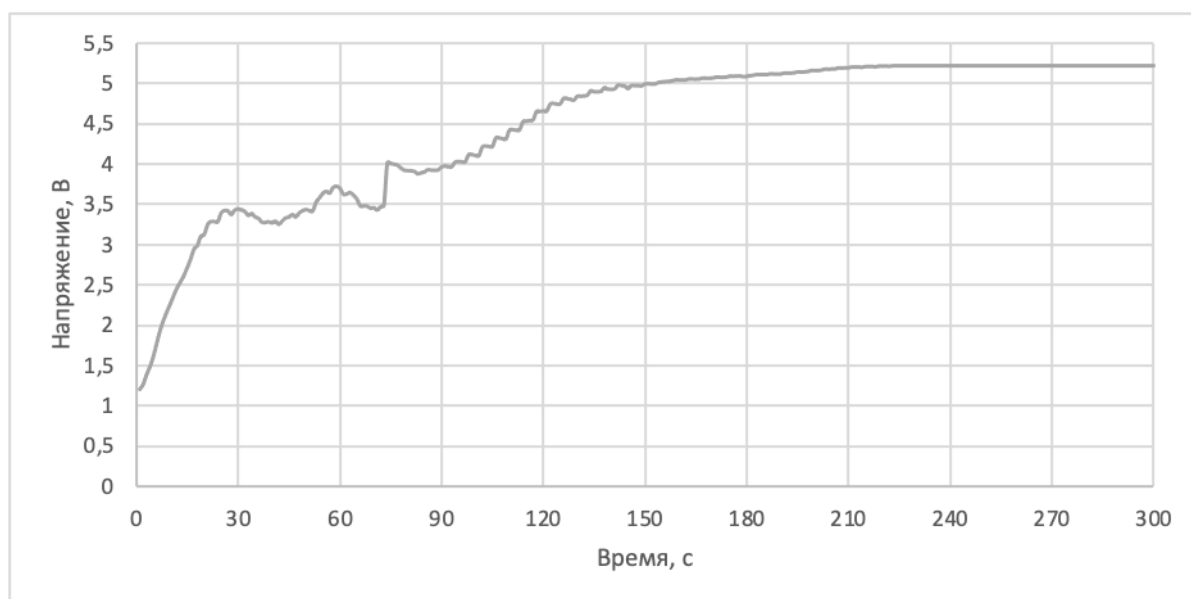


Рисунок 3.4 – Пример графика зависимости напряжения от времени при наличии агглютинации

Таким образом, на основе анализа экспериментальных данных происходит программное обнаружение наличия агглютинации в исследуемом образце (цельная кровь и цоликлон).

Для автоматического определения группы крови по системе АВО в программу заложен алгоритм, применяемый при анализе групп крови, который по наличию или отсутствию агглютинации крови с соответствующим цоликлоном выдает результат: группу анализируемой крови и резус-фактор [13, 27, 98].

Алгоритм определения группы крови:

- 1) отсутствие агглютинации в кюветах с цоликлонами А и В – I группа крови;
- 2) наличие агглютинации в кювете с цоликлоном А, отсутствие агглютинации в кювете с цоликлоном В – II группа крови;
- 3) наличие агглютинации в кювете с цоликлоном В, отсутствие агглютинации в кювете с цоликлоном А – III группа крови;
- 4) наличие агглютинации в кюветах с цоликлонами А и В – IV группа крови.

Для определения резус фактора в программу необходимо заложить следующие действия:

- 1) отсутствие агглютинации в кювете с цоликлоном D – отрицательный результат;
- 2) наличие агглютинации в кювете с цоликлоном D – положительный результат.

1.4 Правила проведения исследований по типированию крови с использованием разработанного макета устройства

Для разработки новой методики типирования цельной крови использовали принцип агглютинации антигенов мембраны эритроцитов с антителами – цоликлонами.

Экспериментальные исследования проводились в лаборатории НИИ Онкологии. Все экспериментальные данные были получены с помощью макета разработанного фотометрического прибора.

Забор крови осуществлялся из вены доноров-добровольцев утром натощак в медицинском кабинете. Кровь набиралась в вакутейнеры с ЭДТА. Временной интервал между забором и экспериментом составлял не более 2 – 5 часов, что соответствует достоверности результата (24 часа).

В измерительную кювету автоматической пипеткой-дозатором вносится цельная кровь и агглютинирующий реагент (цоликлон) в определённом объёме и соотношении. После чего, по нажатию кнопки на приборе кювета помещается в измерительную камеру и запускается программа съёма данных о фотометрических изменениях свойств исследуемого образца.

Проведение анализа осуществлялось по следующей схеме:

- 1) в кюветы для анализа (1, 2, 3, 4) внести с помощью пипетки 12 мкл соответственно цоликлоны: цоликлонанти-А; цоликлонанти-В; цоликлон анти-АВ; цоликлон Анти-D-Супер;
- 2) внести в кювету 5 с помощью пипетки вносили 12 мкл физиологического раствора (отрицательный контроль качества);

- 3) в кюветы для анализа и контроль (1, 2, 3, 4, 5) внести с помощью пипетки 4 мкл анализируемого образца, предварительно перемешав контейнер с анализируемым образцом, для равномерного распределения эритроцитов;
- 4) после нанесения реагентов и крови на поверхности кювет должны быть сформированы устойчивые лежащие капли, основание которых полностью растекается по периметру кюветы (не допускается растекание капли за границу периметра кюветы и наличие в ней пузырьков воздуха);
- 5) разместить кювету с образцами на вибрационной платформе устройства;
- 6) включить вибрационную платформу и проводить анализ в течение 2 минут;
- 7) после сканирования всех кювет результат измерений отображается на экране монитора.

Пример определения группы крови с использованием макета устройства и написанной программы представлены на рисунках 3.5 и 3.6 [13, 23, 35].

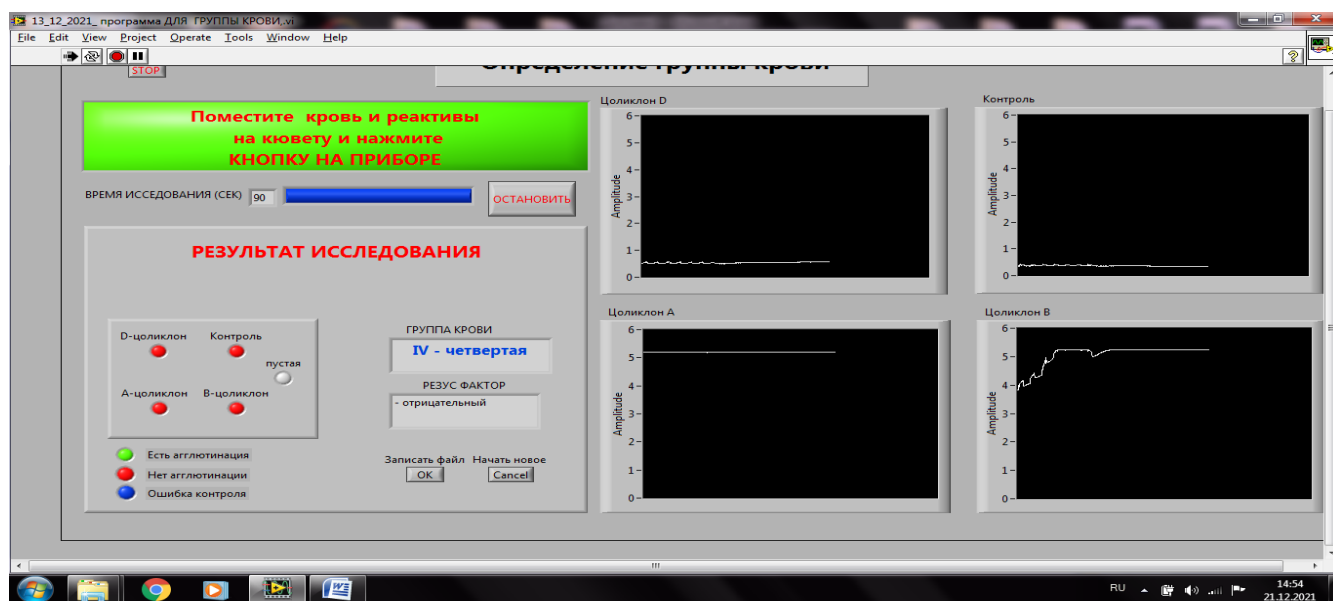


Рисунок 3.5 – Результат определения группы крови – АВ (IV) Rh - (отр)



Рисунок 3.6 – Результат определения группы крови в кюветах– АВ (IV) Rh - (отр)

Согласно разработанной методике, было проведено 200 определений групп крови. Исследования показали высокую точность и повторяемость результатов. Результаты исследований разрабатываемой методики согласуются с результатами, полученными с использованием стандартной методикой в клинической лаборатории (глава 1.2.1). Примеры фотометрических кривых приведены в приложении Б.

С помощью разработанного устройство проводили исследования для определения группы крови, антигены мембраны которых слабо агглютинируют с антителами (цоликлонами). Даже для таких случаев напряжение с ФЭП канала с исследуемым образцом было больше в 3 раза, чем напряжение от кюветы с контрольной пробой, что считается положительным результатом агглютинации. Для точного подтверждения результата анализа нужно, не вынимая кювету из анализатора, нажать 1 раз на кнопку запуска работы устройства, т.е. повторно провести анализ с теми же исследуемыми каплями.

1.5 Возможные ошибки при проведении анализа

Определение группы крови с помощью реакции агглютинации может сопровождаться ошибками, которые повлекут за собой неверное заключение в результате анализа:

1. низкое качество реагентов – реагенты могут иметь низкие агглютинирующие свойства, что может привести к неверному толкованию результата анализа.

Поэтому следует следить за сроком годности реактивов, внешним видом, условием хранения;

2. технические ошибки – несоблюдение внешних условий проведения реакции;
3. повышение температуры более 25 градусов по Цельсию резко замедляют реакцию агглютинации;
4. неправильное внесение реактивов, соотношения крови и реактива – цоликлона.
5. внесение большего или меньшего объёма капли в кювету могут приводить к неправильному анализу результата. При внесении в кювету образца большего или меньшего объёма капля может растечься и график зависимости напряжения от времени будет сразу резко увеличиваться, из-за слишком прозрачного образца. Прибор фиксирует эту точку резкого просветления. Исследование стоит повторить, проверив выставленный объём на дозаторе, с помощью которого наносится капля (рисунок 3.7);
6. растекание капли в образце;

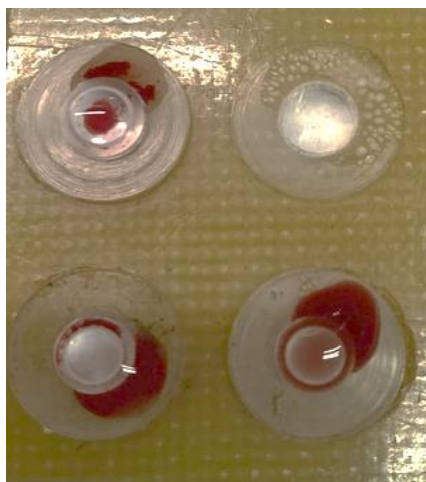


Рисунок 3.7 – Пример исследуемой капли не пригодной для анализа

7. также к ошибочному результату может привести не разведение крови физиологическим раствором для контрольного образца. Контрольная кювета с неразведённым образцом крови будет иметь меньшее светопропускание, что приведет к неправильному результату. Также в случае не добавления физиологического раствора к контрольному образцу, может произойти неспецифическая агрегация эритроцитов. Неспецифическая агрегация

эритроцитов – способность эритроцитов объединяться в монетные столбики, при этом агглютинация эритроцитов не происходит.

Выводы

В главе представлены результаты разработки макета устройства для оценки агглютинации в капельных образцах. Исходя из полученных результатов, проводимых экспериментов, выработаны требования к макету устройства для автоматического определения группы крови человека. Подобрана и описана методика проведения анализа, возможные ошибки её исполнения. Установка должна обеспечивать механические колебания планшета с кюветами определённой амплитуды и частоты; возможность смены режима вибрации; соосное размещение источника излучения, фотоприёмника, и капельного образца; возможность настройки положения фотоприёмника над образцом. Был реализован макет устройства для апробации предложенного метода.

Преимуществами разработанного метода является простота в исполнении, нет сложностей в очистке кювет, на которых располагаются капельные образцы, использование малых объёмов исследуемой жидкости. Возможна реализация многоканальной системы исследования, позволяющей увеличить количество проводимых анализов или реализовать методики, где необходимы сравнительные исследования между несколькими образцами.

Заключение

Основные результаты теоретических и экспериментальных исследований, полученные в ходе выполнения данной диссертационной работы, сводятся к следующему:

1. Разработан и экспериментально проверен новый подход выявления иммунных комплексов, образуемых при специфической реакции агглютинации эритроцитов в солевом растворе моноклональных антител (цоликлонов), на основе которого создан автоматический метод обнаружения агглютинатов в микрообъемах.
2. Предложенный метод обнаружения агглютинатов основан на фотометрии анализируемого образца, содержащего цельную кровь и цоликлон в виде лежащей капли, расположенной на прозрачной кювете специальной формы, ограничивающей основание капли и обеспечивающей ее стабильность. При этом фотометрия образца проводится путем вертикального просвечивания капли в её осевой части.
3. Показано, что в основе высокой чувствительности данного метода к выявлению иммунных комплексов в пробе, лежит увеличение светопропускания капельного образца вследствие уменьшения дисперсности среды в осевой части. При этом усилению агглютинации и очистке центральной области капли от агглютинатов способствует применению горизонтальных механических воздействий (вибраций).
4. Разработана конструкция кюветы, способствующая перераспределению агглютинатов на периферию капельного образца, что увеличивает светопропускание центральной части.
5. Выработаны требования к экспериментальной исследовательской установке, реализующей метод фотометрирования лежащих капельных проб в кювете при применении механических колебаний для оценки процесса гемагглютинации.

6. Разработана методика проведения исследований, определены параметры фотометрической измерительной системы и параметров капельной пробы для данного исследования. Определены параметры вибрационных воздействий для лучшего выявления наличия агглютинации в образце. Первый этап режима вибрации: частота от 5 до 10 Гц, амплитуда 0,7 – 1 мм. Второй этап режима вибрации: частота 30 – 50 Гц, амплитуда 0,15 – 0,2 мм.
7. Оценка наличия или отсутствия иммунных комплексов в исследуемом образце проводится путем сравнения его оптических свойств с контрольным образцом (агглютинация отсутствует). Если отношение напряжений исследуемого к контрольному образцу на выходе фотоэлектрического преобразователя больше 3, проба положительна, если $1 \pm 0,2$, то отрицательна.
8. Экспериментально доказано, что достоверное выявление агглютинатов наблюдается при объёме анализируемого образца 16 – 20 мкл. При этом соотношение крови к цоликлону должно составлять 1:3 или 1:4. Установленные параметры капельного образца позволяют выявлять наличие агглютинации в образцах с различным гематокритом.
9. Определены параметры кюветы, при которых наблюдается наибольшее изменение светопропускания капельной пробы в процессе реакции агглютинации эритроцитов с цоликлонами (высота выступа кюветы 0,6 – 0,85 мм, диаметр основания кюветы 4,75 – 5 мм, диаметр выступа 2,75 – 3 мм)
10. Проведённые испытания созданной биотехнической системы показали высокую чувствительность данного метода и возможность его применения для автоматического определения группы крови человека с использованием цоликлонов. Предложенный метод обеспечивает высокую повторяемость результатов, хорошо согласуется с принятым методом определения группы крови с использованием цоликлонов в планшете. Метод имеет ряд преимуществ: время анализа сокращается до 3 минут, объем используемой крови до 4 – 5 мкл на 1 анализ (1 тип цоликлона), объём 1 вида цоликлона 12 – 15 мкл.

Список литературы

1. Ананьев Л.М. Фотоэлектрический анализатор иммунологических реакций / Л.М. Ананьев, А.А. Аристов, А.Г. Яковлев, Г.С. Евтушенко // Актуальные проблемы электронного приборостроения: Труды III междунар. науч.-техн. конф. – Новосибирск: Изд-во НГТУ. – 1996. – Т. 3. – С. 35-36.
2. Аристов А.А. Автоматизированный индикатор фагоцитоза / А.А. Аристов, А.Г. Яковлев // 2-ая областная науч.-практич. конф. молодежи и студентов “Современные техника и технологии”. Тезисы докладов. – Томск: Изд. ТПУ, 1996. – С. 44-45.
3. Аристов А.А. Биотехническая система экспресс-оценки процесса оседания эритроцитов в микрообъемах: автореф. дис. канд. тех. наук: 05.11.17 Аристов Александр Александрович. – Томск, 2006. – 19 с.
4. Аристов А.А. Выбор формы кюветы для проведения типирования крови фотометрическим методом / А.А. Аристов, Ю.Н. Ворончихина, Ю.А. Розенбаум, Д.С. Серпенев // Биотехнические, медицинские и экологические системы, измерительные устройства и робототехнические комплексы – Биомедсистемы-2023: Сборник трудов XXXVI Всероссийской научно-технической конференции студентов, молодых ученых и специалистов. – Рязань, 2023. – С. 235-238.
5. Аристов А.А. Исследование влияния спектра зондирующего излучения на чувствительность фотометрического метода определения группы крови / А.А. Аристов, В.В. Ли, М.П. Кравецкая и др. // Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии : XV МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С НАУЧНОЙ МОЛОДЕЖНОЙ ШКОЛОЙ ИМ. И.Н. СПИРИДОНОВА ФРЭМЭ'2022, Владимир-Суздаль, 2022. – С. 401-405.
6. Аристов А.А. Капельный микрометод оценки скорости оседания эритроцитов крови / А.А. Аристов // Материалы Всероссийской науч.-практич. конф. “Электронные средства и системы управления”. – Томск: Изд. ИОА СО РАН, 2003. – С. 273-277.

7. Аристов А.А. Определение длины волны оптического излучения для типирования крови фотометрическим методом. / А.А. Аристов, Ю.Н. Ворончихина, Е.И. Гладкова, Ю.А. Розенбаум // Сборник трудов XXXV Всероссийской научно-технической конференции студентов, молодых ученых и специалистов. Биотехнические, медицинские и экологические системы, измерительные устройства и робототехнические комплексы. – Рязань, 2022. – С. 392-394.
8. Аристов А.А. Оптико-вибрационный метод исследования процесса агглютинации эритроцитов / А.А. Аристов, Ю.А. Розенбаум, А.А. Банзанова, Н.А. Фирсова // Труды IEEEXXII Международная конференция молодых специалистов в области электронных приборов и материалов (EDM 2021). Дайджесты. – Новосибирск, 2021. – С. 441-446.
9. Аристов А.А. Прибор для автоматизированного анализа фагоцитарной активности нейтрофилов / А.А. Аристов, Л.М. Ананьев, А.Г. Яковлев // Труды конференции, посвященной 35-летию ЦНИЛ "Медико-биологические аспекты нейрогуморальной регуляции". – Томск: изд. СГМУ, 1997. – С. 341-343.
10. Аристов А.А. Применение метода фотометрирования капельной пробы крови для оценки процесса оседания эритроцитов / А.А. Аристов, Я.С. Пеккер, Г.С. Евтушенко // Известия Томского политехнического университета. – 2006. – Т. 309, № 3. – С. 144-147.
11. Аристов А.А. Разработка автоматизированного метода оценки процесса агглютинации эритроцитов для определения группы крови человека / А.А. Аристов, Ю.А. Розенбаум, Г.С. Евтушенко // Медицинская техника. – 2021. – № 5 (329). – С. 19-23.
12. Аристов А.А. Разработка автоматизированного прибора для определения группы крови. / А.А. Аристов, Д.С. Серпенев, Ю.А. Розенбаум, Ю.Н. Ворончихина // Радиоэлектроника. Проблемы и перспективы развития. Труды Седьмой всероссийской молодежной научной конференции. – Тамбов, 2022. – С. 222-223.

13. Аристов А.А. Разработка макета устройства для определения группы крови / А.А. Аристов, Ю.А. Розенбаум, Д.С. Серпенев и др. // Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии: XV МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С НАУЧНОЙ МОЛОДЕЖНОЙ ШКОЛОЙ ИМ. И.Н. СПИРИДОНОВА ФРЭМЭ'2022, Владимир-Суздаль, 2022. – С. 334-337.
14. Аристов А.А. Расширение функциональных возможностей автоматизированного индикатора фагоцитоза / А.А. Аристов // Труды IV международная научно-техническая конференция “Актуальные проблемы электронного приборостроения АПЭП-98”: Новосибирск, 1998. – Т. 5, “Медицинская электроника”. – С. 35-36.
15. Головкина Л.Л. Молекулярные основы D-отрицательного фенотипа (обзор литературы и описание случаев) / Л.Л. Головкина, А.Г. Стремоухова, Т.Д. Пушкина и др. // Онкогематология. – 2015. – Т. 10, № 3. – С. 64-69.
16. Дубровский В.А. Акустооптический метод регистрации реакции агглютинации эритроцитов – влияние окрашенности сывороток на разрешающую способность метода / В.А. Дубровский, М.Ф. Медведева, С.О. Торбин // Оптика и спектроскопия. – 2016. – Т. 120. – № 1. – С. 68-75.
17. Дубровский В.А. Влияние способов обработки экспериментальных результатов на разрешающую способность акустооптического метода определения группы крови человека / В.А. Дубровский, С.В. Марков // Оптика и спектроскопия. – 2022. – Т. 130. – № 6. – С. 906-917.
18. Дубровский В.А. Применение спектрально фильтрованного зондирующего светового луча и RGB-разложения микрофотографий для проточной регистрации агглютинации эритроцитов, усиленной ультразвуком / В.А. Дубровский, Ю.А. Ганилова, И.В. Забенков // Оптика и спектроскопия. – 2013. – Т. 115. – № 2. – С. 255.
19. Иванцов А.О. Акустические колебания полусферической капли / А.О. Иванцов // Вестник Пермского университета. Серия: Физика. – 2012. – № 3(21). – С. 16-23.

20. Искакова О.А. Применение гелевой технологии для иммуногематологических исследований крови / О.А. Искакова // Наука и здравоохранение. – 2013. – № 1. – С. 47-50.
21. Листратов А.И. Автоматизация процесса определения группы крови / А.И. Листратов, Ю.А. Розенбаум, А.А. Банзанова, Н.А. Фирсова // Сборник тезисов Всероссийской итоговой 80-я студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова. – Томск, 2021. – С. 315-316.
22. Патент № 2475758 С2 Российская Федерация, МПК G01N 33/543. Способ быстрого определения типа крови человека АВ0/Rh/MN и тест-набор для него: № 2010150683/15: заявл. 26.03.2009: опубл. 20.02.2013 / Д. Ван, В. Ян, Ц. Сяо, Б. Ван; заявитель ИНТЕК ПРОДАКТС, ИНК. (СЯМЭНЬ).
23. Розенбаум Ю.А. Оптико-вибрационный метод определения группы крови. Оценка влияния горизонтальных механических колебаний на распределение иммунных комплексов в образце / Ю.А. Розенбаум, А.А. Аристов, И.Н. Мосунов, Г.С. Евтушенко // Медицинская техника. – 2023. – № 6 (342). – С. 14-16.
24. Розенбаум Ю.А. Программное обеспечение для оценки процесса агглютинации эритроцитов / Ю.А. Розенбаум, А.А. Аристов, М.А. Шульгина, К.А. Розенбаум // Новые информационные технологии в исследовании сложных структур: материалы Тринадцатой Международной конференции. – Томск: Национальный исследовательский Томский государственный университет, 2020. – С. 62-63.
25. Савченко В.Г. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых / В.Г. Савченко, Е.Н. Паровичникова, Б.В. Афанасьев и др. // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59. – № 1-S2. – С. 2-29.
26. Умнова М.А. О разновидностях резус-фактора и их распределении среди населения Москвы / М.А. Умнова, Р.М. Уринсон // Вопр. антропол. – 1960. – № 4Б. – С. 71.

27. Физиология человека / Под ред. Г.И. Косицкого. – Изд. 3-е, перераб. и доп. – М.: Медицина, 1985. – 544 с.
28. Agre P. Purification and partial characterization of the M, 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen / P. Agre, A.M. Saboori, A. Asimos, B.L. Smith // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262. – P. 17497-17503.
29. Al-Tamimi M. Validation of paper-based assay for rapid blood typing / M. Al-Tamimi, W. Shen, R. Zeineddine et al. // *Analytical chemistry.* – 2012. – V. 84. – №. 3. – P. 1661-1668.
30. Alter H.J. The hazards of blood transfusion in historical perspective / H.J. Alter, H.G. Klein // *Blood.* – 2008. – V. 112. – №. 7. – P. 2617-2626.
31. Aoki T. A comprehensive review of our current understanding of red blood cell (RBC) glycoproteins / T. Aoki // *Membranes.* – 2017. – V. 7. – №. 4. – P. 56.
32. Argall C.I. Presence of anti-D antibody in the serum of Du patient / C.I. Argall, J.M. Ball, E. Trentelman // *J. Lab. Clin. Med.* – 1953. – V. 41. – P. 895-898.
33. Aristov A.A. An Automated Method for Blood Type Determination by Red Blood Cell Agglutination Assay / A.A. Aristov, Y.A. Rozenbaum, G.S. Evtushenko // *Biomedical Engineering.* – 2022. – V. 55. – №. 5. – P. 328-332.
34. Aristov A.A. Automation of blood sedimentation rate measurement methods / A.A. Aristov, N.V. Shmakova // *Proceedings of the 6th International Scientific and Practical Conference of Students, Post-Graduates and Young Scientists: Modern Techniques and Technology, MTT 2000.* – Tomsk, 2000. – P. 220-221.
35. Aristov A.A. Optical-Vibration Method for Studying the Process of Agglutination of Red Blood Cells / A.A. Aristov, J.A. Rosenbaum, A.A. Banzanova et al. // *International Conference of Young Specialists on Micro/Nanotechnologies and Electron Devices, EDM.* – Aya, Altai Region, 2021. – P. 424-427.
36. Ashiba H. Hemagglutination detection for blood typing based on waveguide-mode sensors / H. Ashiba, M. Fujimaki, K. Awazu et al. // *Sensing and Bio-Sensing Research.* – 2015. – V. 3. – P. 59-64.

37. Ashiba H. Microfluidic chips for forward blood typing performed with a multichannel waveguide-mode sensor / H. Ashiba, M. Fujimaki, K. Awazu et al. // Sensing and bio-sensing research. – 2016. – V. 7. – P. 121-126.
38. Bienek D.R. Accuracy of user-friendly blood typing kits tested under simulated military field conditions / D.R. Bienek, D.G. Charlton // Military Medicine. – 2011. – V. 176. – №. 4. – P. 454-460.
39. Bolcato M. Patient blood management: The best approach to transfusion medicine risk management / M. Bolcato, M. Russo, K. Trentino // Transfusion and apheresis science. – 2020. – V. 59. – №. 4. – P. 102779.
40. Bolton-Maggs P.H.B. Serious Hazards of Transfusion (SHOT) haemovigilance and progress is improving transfusion safety / P.H.B. Bolton-Maggs, H. Cohen // British journal of haematology. – 2013. – V. 163. – №. 3. – P. 303-314.
41. Burton N.M. Modelling the structure of the red cell membrane / N.M. Burton, L.J. Bruce // Biochemistry and cell biology. – 2011. – V. 89. – №. 2. – P. 200-215.
42. Byrnes J.R. Red blood cells in thrombosis / J.R. Byrnes, A.S. Wolberg // Blood. The Journal of the American Society of Hematology. – 2017. – V. 130. – №. 16. – P. 1795-1799.
43. Cartron J.P. Defining the Rh blood group antigens – Biochemistry and molecular genetics / J.P. Cartron // Blood Rev. – 1994. – V. 8. – P. 199–212.
44. Casals-Terré J. Enhanced fully cellulose based forward and reverse blood typing assay / J. Casals-Terré, J. Farré-Lladós, J.A. López et al. // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2020. – V. 108. – №. 2. – P. 439-450.
45. Chang C. Evaluation of Erytra® fully automated analyser for routine use in transfusion laboratory / C. Chang, M. Brown, L. Davies et al. // Transfusion medicine. – 2014. – V. 24. – №. 1. – P. 33-38.
46. Chang Y.J. An automatic lab-on-disc system for blood typing / Y.J. Chang, Y.H. Fan, S.C. Chen et al. // SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation. – 2018. – V. 23. – №. 2. – P. 172-179.

47. Chou S.T. The Rh and RhAG blood group systems / S.T. Chou, C.M. Westhoff // *Immunohematology-Journal of Blood Group Serology and Education*. – 2010. – V. 26. – №. 4. – P. 178.
48. Daniels G. Variants of RhD-current testing and clinical consequences / G. Daniels // *British journal of haematology*. – 2013. – V. 161. – №. 4. – P. 461-470.
49. Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]/ L. Dean // National Center for Biotechnology Information (US). – 2005:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/pdf/Bookshelf_NBK2261.pdf
50. Denomme G.A. Mass-scale red cell genotyping of blood donors / G.A. Denomme, S.T. Johnson, B.C. Pietz // *Transfusion and Apheresis Science*. – 2011. – V. 44. – №. 1. – P. 93-99.
51. Ebrahimi Fana S. Paper based analytical devices for blood grouping: a comprehensive review / Fana S. Ebrahimi, M. Paknejad, M. Aminian // *Biomedical Microdevices*. – 2021. – V. 23. – P. 1-9.
52. Fasano R.M. Red blood cell antigen genotyping for sickle cell disease, thalassemia, and other transfusion complications / R.M. Fasano, S.T. Chou // *Transfusion medicine reviews*. – 2016. – V. 30. – №. 4. – P. 197-201.
53. Fernandes H.P. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation / H.P. Fernandes, C.L. Cesar, M.L. Barjas-Castro // *Revistabrasileira de hematologia e hemoterapia*. – 2011. – V. 33. – P. 297-301.
54. Fürst D. Next-generation sequencing technologies in blood group typing / D. Fürst, C. Tsamadou, C. Neuchel et al. // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. – 2020. – V. 47. – №. 1. – P. 4-13.
55. Gahmberg C.G. Molecular characterization of the human red cell Rho(D) antigen / C.G. Gahmberg // *EMBO J*. – 1983. – V. 2. – P. 223-227.
56. Garritsen H.S.P. Molecular diagnostics in transfusion medicine: in capillary, on a chip, in silico, or in flight? / H.S.P. Garritsen, Fan A. Xiu-Cheng, D. Lenz // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. – 2009. – V. 36. – №. 3. – P. 181-187.

57. Girasole M. Structure and function in native and pathological erythrocytes: a quantitative view from the nanoscale / M. Girasole, S. Dinarelli, G. Boumis // *Micron*. – 2012. – V. 43. – №. 12. – P. 1273-1286.
58. Goodnough L.T. Blood transfusion therapy / L.T. Goodnough, A.K. Panigrahi // *Medical Clinics*. – 2017. – V. 101. – №. 2. – P. 431-447.
59. Harmening D.M. Modern blood banking & transfusion practices / D.M. Harmening. – FA Davis, 2018. – 688 p.
60. Hart S. Red cell transfusion and the immune system / S. Hart, C.M. Cserti-Gazdewich, S. A. McCluskey // *Anaesthesia*. – 2015. – V. 70. – P. 38-e16.
61. Hermand P. Immunochemical characterization of Rhesus proteins with antibodies raised against synthetic peptides / P. Hermand, I. Mouro, M. Huet et al. // *Blood*. – 1993. – V. 82. – P. 669-676.
62. Huet M. Real time observation and automated measurement of red blood cells agglutination inside a passive microfluidic biochip containing embedded reagents / M. Huet, M. Cubizolles, A. Buhot // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2017. – V. 93. – P. 110-117.
63. Hughes R.C. Membrane glycoproteins: a review of structure and function / R.C. Hughes. – Elsevier, 2014. – 376 p.
64. Jarujamrus P. Mechanisms of red blood cells agglutination in antibody-treated paper / P. Jarujamrus, J. Tian, X. Li et al. // *Analyst*. – 2012. – V. 137. – №. 9. – P. 2205-2210.
65. Jayakumar P. Identification and analysis of blood group with digital microscope using image processing / P. Jayakumar, S. Padmanabhan, K. Suthendran et al. // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. – IOP Publishing, 2020. – V. 923. – №. 1. – P. 012013.
66. Karimi S. A passive portable microfluidic blood–plasma separator for simultaneous determination of direct and indirect ABO/Rh blood typing / S. Karimi, P. Mehrdel, J. Farré-Lladós et al. // *Lab on a Chip*. – 2019. – V. 19. – №. 19. – P. 3249-3260.
67. Khan M.S. Paper diagnostic for instantaneous blood typing / M.S. Khan, G. Thouas, W. Shen et al. // *Analytical chemistry*. – 2010. – V. 82. – №. 10. – P. 4158-4164.

68. Langston M.M. Evaluation of the gel system for ABO grouping and D typing / M.M. Langston, J.L. Procter, K.M. Cipolone et al. // *Transfusion*. – 1999. – V. 39. – №. 3. – P. 300-305.
69. Lazarova E. Multicentre evaluation of the new ORTHO VISION® analyser / E. Lazarova, Y. Scott, A. van den Bos et al. // *Transfusion Medicine*. – 2017. – V. 27. – №. 5. – P. 354-361.
70. Li H. Paper microfluidics for point-of-care blood-based analysis and diagnostics / H. Li, A.J. Steckl // *Analytical chemistry*. – 2018. – V. 91. – №. 1. – P. 352-371.
71. Li H.Y. Blood group testing / H.Y. Li, K. Guo // *Frontiers in Medicine*. – 2022. – V. 9. – P. 65.
72. Li S. A phenome-wide association study of ABO blood groups / S. Li, C.M. Schooling // *BMC medicine*. – 2020. – V. 18. – №. 1. – P. 334.
73. Malinin A.V. Determination of blood types using a chirped photonic crystal fiber / A.V. Malinin, A.A. Zanishevskaja, Y.S. Skibina et al. // *Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics VIII*. – International Society for Optics and Photonics, 2011. – V. 7898. – P. 78981A.
74. Malomgré W. Recent and future trends in blood group typing / W. Malomgré, B. Neumeister // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2009. – V. 393. – №. 5. – P. 1443-1451.
75. Mitra R. Blood groups systems / R. Mitra, N. Mishra, G.P. Rath // *Indian journal of anaesthesia*. – 2014. – V. 58. – №. 5. – P. 524-528.
76. Mohandas N. Red cell membrane: past, present, and future / N. Mohandas, P.G. Gallagher // *Blood. The Journal of the American Society of Hematology*. – 2008. – V. 112. – №. 10. – P. 3939-3948.
77. Moncharmont P. ABO and Rh (D) blood typing on the PK 7200 with ready-to-use kits / P. Moncharmont, A. Plantier, V. Chirat et al. // *Immunohematology*. – 2003. – V. 19. – №. 2. – P. 54-56.
78. Moore S. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh(D), (c), (E), and Fya / S. Moore, C.F. Woodrow, D.B.L. McClelland // *Nature*. – 1982. – V.295. – P.529 – 531.


79. Mujahid A. Blood group typing: from classical strategies to the application of synthetic antibodies generated by molecular imprinting / A. Mujahid, F.L. Dickert // *Sensors*. – 2015. – V. 16. – №. 1. – P. 51.
80. Mujahid A. Micro-structured interdigital capacitors with synthetic antibody receptors for ABO blood-group typing / A. Mujahid, S. Aigner, F.L. Dickert // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2017. – V. 242. – P. 378-383.
81. Murphy M.F. Transfusion practice and safety: current status and possibilities for improvement / M.F. Murphy, S.J. Stanworth, M. Yazer // *Vox sanguinis*. – 2011. – V. 100. – №. 1. – P. 46-59.
82. Nam S.W. Hemagglutination assay via optical density characterization in 3d microtrap chips / S.W. Nam, D.G. Jeon, Y.R. Yoon et al. // *Biosensors*. – 2023. – V. 13. – №. 7. – P. 733.
83. Odeh N. An efficient system for automatic blood type determination based on image matching techniques / N. Odeh, A. Toma, F. Mohammed et al. // *Applied Sciences*. – 2021. – V. 11. – №. 11. – P. 5225.
84. Olgac U. Direct numerical simulation of an oscillating droplet in partial contact with a substrate / U. Olgac, D. Izbassarov, M. Muradoglu // *Computers & Fluids*. – 2013. – V. 77. – P. 152-158.
85. Park J. Finger-actuated microfluidic display for smart blood typing / J. Park, J.K. Park // *Analytical Chemistry*. – 2019. – V. 91. – №. 18. – P. 11636-11642.
86. Petazzi P. ABO gene editing for the conversion of blood type A to universal type O in Rhnull donor-derived human-induced pluripotent stem cells / P. Petazzi, L. Miquel-Serra, S. Huertas et al. // *Clinical and Translational Medicine*. – 2022. – V. 12. – №. 10. – P. e1063.
87. Plebani M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine / M. Plebani // *Annals of clinical biochemistry*. – 2010. – V. 47. – №. 2. – P. 101-110.
88. Ragav N.V. Automated blood analysers and their testing principles: a comparative study / N.V. Ragav, P. Sinduja, R. Priyadharshini // *Journal of Pharmaceutical Research International*. – 2021. – V. 33. – №. 63A. – P. 294-301.

89. Raj Bhagat S.M. Automatic detection of human blood group system using deep learning and image processing / S.M. Raj Bhagat, P. Deshmukh, S. Khanvilkar // *Int Res J Eng Technol.* – 2021. – V. 8. – №. 4. – P. 350-4.
90. Rasia R.J. Determination of adhesive specific energy of erythrocyte agglutination by laser retrodiffusion / R.J. Rasia, N. de Isla, L. Altube et al. // *Optics and Lasers in Engineering.* – 2003. – V. 39. – №. 5-6. – P. 599-607.
91. Reid M.E. Red blood cell blood group antigens: structure and function / M.E. Reid, N. Mohandas // *Seminars in hematology.* – WB Saunders, 2004. – V. 41. – №. 2. – P. 93-117.
92. Reid M.E. The blood group antigen factsbook / M.E. Reid, C. Lomas-Francis, M.L. Olsson. – Academic press, 2012. – 758 p.
93. Risinger M. Red cell membrane disorders: structure meets function / M. Risinger, T.A. Kalfa // *Blood.* – 2020. – V. 136. – №. 11. – P. 1250-1261.
94. Rosenfield R.E. Weakly reacting Rh positive (Du) bloods / R.E. Rosenfield, P. Vogel, E.B. Miller et al. // *Blood.* – 1951. – V. 6. – P. 1123-1134.
95. Rozenbaum Y.A. An optical-vibration method for determining blood groups. Assessment of the influence of horizontal mechanical vibrations on the distribution of immune complexes in a sample / Y.A. Rozenbaum, A.A. Aristov, I.N. Mosunov et al. // *Biomedical Engineering.* – 2024. – V. 57. – №. 6. – P. 382-386.
96. Scharberg E.A. Red cell antigen testing / E.A. Scharberg, E. Richter, P. Bugert // *ISBT Science Series.* – 2015. – V. 10. – №. S1. – P. 5-11.
97. Schenkel-Brunner H. Human Blood Groups. Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity. / H. Schenkel-Brunner. – 2-nd. ed. – Wien, NY: Springer-Verlag, 2000. – 637 p.
98. Serpenev D.S. Development of a Blood Typing Device / D.S. Serpenev, J.N. Voronchikhina, J.A. Rosenbaum et al. // *2023 IEEE 24th International Conference of Young Professionals in Electron Devices and Materials (EDM).* – IEEE, 2023. – P. 1290-1293.

99. Shaban S.A. Blood Group Classification System Based on Image Processing Techniques / S.A. Shaban, D.L. Elsheweikh // *Intelligent Automation & Soft Computing*. – 2022. – V. 31. – №. 2. – P. 817-834.
100. Shulgina M. Vibration Installation for Research of Erythrocytes Agglutination / M. Shulgina, A. Aristov, Y. Rozenbaum // *Progress in Material Science and Engineering*. – 2021. – P. 209-215.
101. Sklavounos A.A. Digital microfluidic hemagglutination assays for blood typing, donor compatibility testing, and hematocrit analysis / A.A. Sklavounos, J. Lamanna, D. Modi et al. // *Clinical chemistry*. – 2021. – V. 67. – №. 12. – P. 1699-1708.
102. Stussi G. Red blood cells: exchange, transfuse, or deplete / G. Stussi, A. Buser, A. Holbro // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. – 2019. – V. 46. – №. 6. – P. 407-416.
103. Sullivan J.K.C. Blood Group Genotyping / J.K.C. Sullivan, N. Gleadall, W.J. Lane // *Advances in Molecular Pathology*. – 2021. – V. 4. – P. 127-143.
104. Thakral B. Phenotype frequencies of blood group systems (Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, P, Lewis, and Lutheran) in north Indian blood donors / B. Thakral, K. Saluja, R.R. Sharma et al. // *Transfusion and Apheresis Science*. – 2010. – V. 43. – №. 1. – P. 17-22.
105. Then W.L. The detection of blood group phenotypes using paper diagnostics / W.L. Then, M. Li, H. McLiesh et al. // *Vox sanguinis*. – 2015. – V. 108. – №. 2. – P. 186-196.
106. Uno S. Sensitive typing of reverse ABO blood groups with a waveguide-mode sensor / S. Uno, T. Tanaka, H. Ashiba et al. // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2018. – V. 126. – №. 1. – P. 131-137.
107. Wang X. Optimal design of a spectral readout type planar waveguide-mode sensor with a monolithic structure / X. Wang, M. Fujimaki, T. Kato et al. // *Optics Express*. – 2011. – V. 19. – №. 21. – P. 20205-20213.
108. Yamamoto K. Fully-automatic blood-typing chip exploiting bubbles for quick dilution and detection / K. Yamamoto, R. Sakurai, M. Motosuke // *Biomicrofluidics*. – 2020. – V. 14. – №. 2.

109. Yazdanbakhsh K. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management / K. Yazdanbakhsh, R.E. Ware, F. Noizat-Pirenne // Blood. The Journal of the American Society of Hematology. – 2012. – V. 120. – №. 3. – P. 528-537.
110. Yazid N.A.M. Blood Typing and Sensors: A Review. / N.A.M. Yazid, M.Y. Baharuddin, S.N.A. Aminudin et al. // American Journal of Sciences and Engineering Research – 2023. – V. 6. – №.4.

Приложение А Внедрение результатов работы

TOMSK POLYTECHNIC UNIVERSITY

 ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего образования
 «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по образовательной
 деятельности ТПУ

М.А.Соловьев

» 2024 г.

АКТ

внедрения результатов диссертационной работы
 Розенбаум Юлии Андреевны
 в учебный процесс

Комиссия в составе:

Председатель: и.о. заведующего кафедрой-руководитель отделения на правах кафедры
 ОЭИ ИШНКБ, к.т.н., Баранов П.Ф.

Члены комиссии: доцент ОЭИ ИШНКБ, к.т.н. Дикман Е.Ю., доцент ОЭИ ИШНКБ,
 к.т.н. Иванова В.С. составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной
 работы Розенбаум Ю.А. «Разработка биотехнической системы для автоматического
 выявления процесса агглютинации эритроцитов», представленной на соискание ученой
 степени кандидата технических наук по специальности 2.2.12 – приборы системы и
 изделия медицинского назначения, используются в учебном процессе отделения
 Электронной инженерии Инженерной школы неразрушающего контроля и
 безопасности Национального исследовательского Томского политехнического
 университета в методических материалах дисциплины «Технические методы
 диагностических исследований и подведения лечебных воздействий», а также при
 выполнении УИРС и подготовке выпускных квалификационных работ бакалавров и
 магистров направления «Биотехнические системы и технологии».

Председатель комиссии

Баранов П.Ф.

Члены комиссии

Дикман Е.Ю.

Иванова В.С.



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)



УТВЕРЖДАЮ
Проректор ТПУ по науке и
стратегическим проектам
А.С. Гоголев
2024 г.

АКТ

внедрения результатов диссертационной работы

Розенбаум Юлии Андреевны

Настоящим актом подтверждается, что результаты диссертационной работы Розенбаум Ю.А. «Разработка биотехнической системы для автоматического выявления процесса агглютинации эритроцитов», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 2.2.12 – приборы системы и изделия медицинского назначения, были использованы при выполнении проекта «Разработка портативного прибора для автоматического типирования группы крови человека» по программе «УМНИК» Фонда содействия инновациям в 2019 - 2021гг. (договор № 14975ГУ/2019 от 24.12.2019).

Грантополучатель

Розенбаум Ю.А.

Директр ИШНКБ

Баранов П.Ф.

Зав ОАиД
А.С. Гоголев



**НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ -**
филиал Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Томский национальный
исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»
(НИИ онкологии Томского НИМЦ)

Кооперативный пер., д. 5, Томск, 634009
Тел. (3822) 51 10 39 / 51 33 06
Факс (3822) 51 33 06
E-mail: onco@tnimc.ru

ОКПО 15601567, ОГРН 1027000861568
ИНН / КПП 7019011979 / 700043001

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИИ онкологии
Томского НИМЦ
Акад. РАН, д.м.н., проф.



Е.Л. Чойнзонов

АКТ

о внедрении в научную деятельность результатов диссертационной работы
Розенбаум Ю.А. в Научно-исследовательском институте онкологии - филиале
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный
исследовательский медицинский центр Российской академии наук»
(НИИ онкологии Томского НИМЦ)

Настоящий акт составлен представителями НИИ онкологии Томского НИМЦ на основании результатов работ, выполненных совместно с Томским политехническим университетом в рамках Соглашения о научно-техническом сотрудничестве № 34921.

На базе Томского НИИ онкологии в отделении клинической лабораторной диагностики были проведены испытания разработанного в процессе выполнения диссертационной работы Розенбаум Ю.А. метода выявления иммунных комплексов в капельном образце с использованием механических колебаний с целью определения группы крови человека и реализующего его технического устройства. С использованием разработанного макета устройства были проведены анализы определения группы крови. Полученные результаты сопоставлялись с типированием крови на планшете, согласно методике определения группы крови человека с моноклональными антителами (Приказ № 2 МЗ РФ от 05.10.2000). Проведённые исследования продемонстрировали полное соответствие между методиками исследования. Предложенная Розенбаум Ю.А. методика позволяет использовать малый объём крови, стандартизировать проведение исследования по объёму и соотношению реагентов, снизить влияние человеческого фактора при интерпретации

результата анализа. В ходе исследования аналитических свойств данной установки было выявлено, что использование прибора позволяет с большей точностью обнаружить слабую агглютинацию (слабые антигены).

Таким образом, результаты экспериментальных исследований и эксплуатации установки подтверждают клиническую эффективность разработанного метода выявления агглютинации эритроцитов с моноклональными антителами (целиклонами) в исследуемых образцах. В перспективе это позволит обеспечить повышение качества оказания медицинских услуг.

Заведующая клинко-диагностической
лабораторией НИИ онкологии Томского
НИМЦ



Н.П. Ковалёва

Главный врач онкологической клиники
НИИ онкологии Томского НИМЦ



Ю.И. Тюкалов

Приложение Б Примеры фотометрических кривых образцов с наличием или отсутствием реакции агглютинации эритроцитов с моноклональными антителами

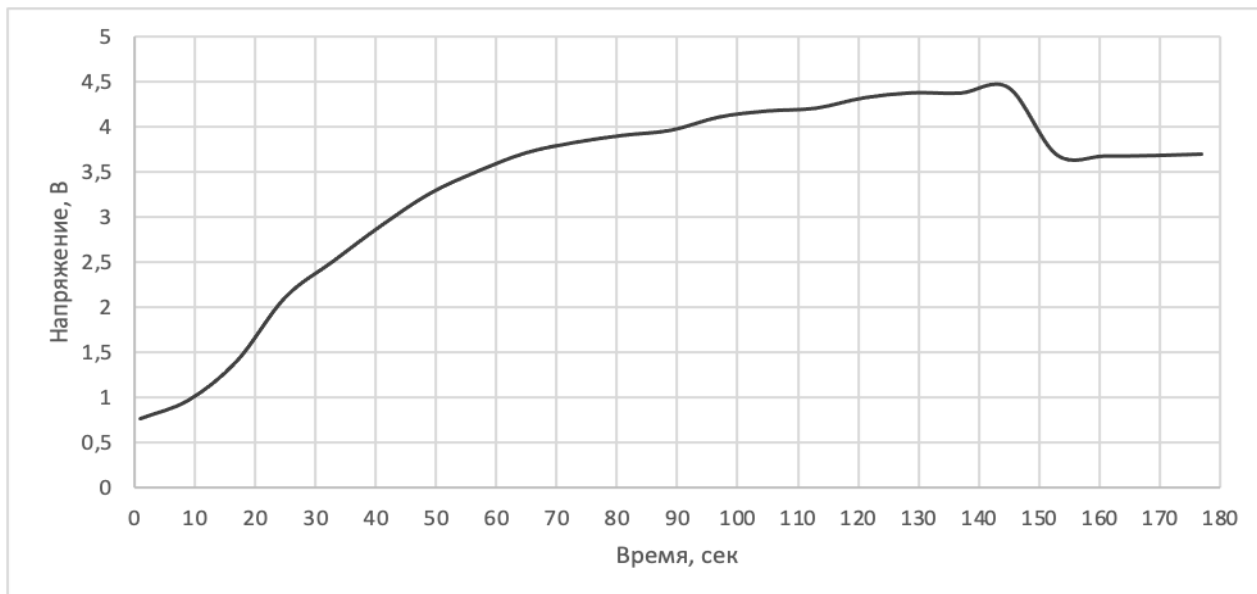


Рисунок Б.1 – График зависимости напряжения от времени в положительной пробе (высота выступа кюветы 0,84 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; объём пробы 16 мкл; гематокрит 39,4; цоликлон А)

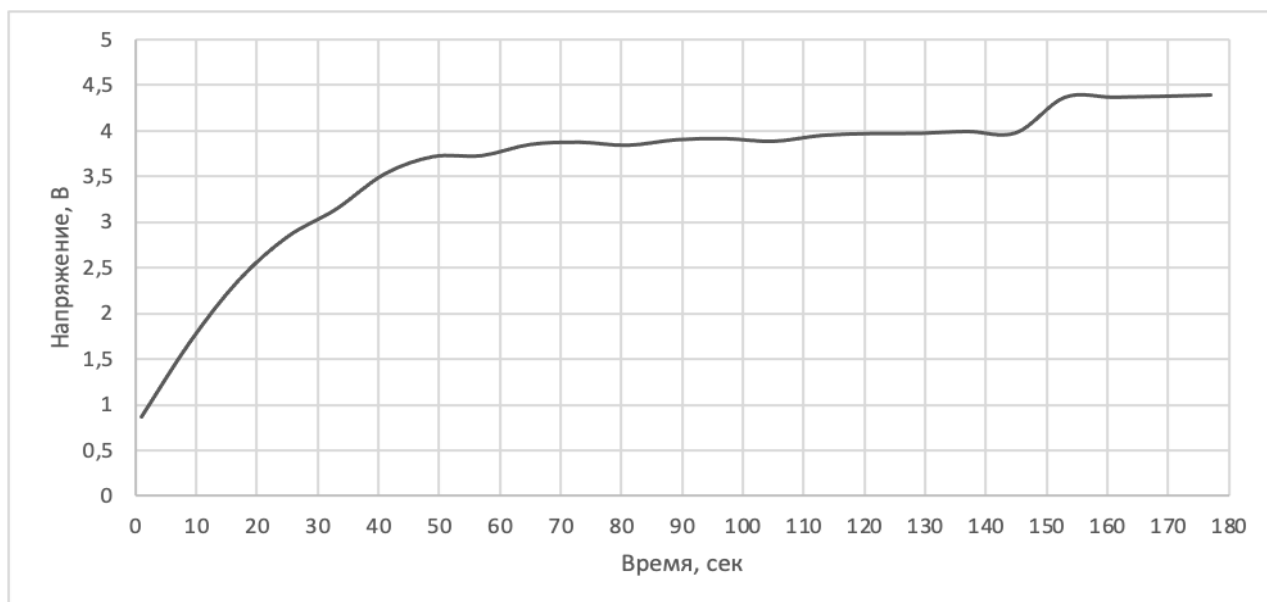


Рисунок Б.2 – График зависимости напряжения от времени в положительной пробе (высота выступа кюветы 0,84 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; объём пробы 20 мкл; гематокрит 43; цоликлон А)

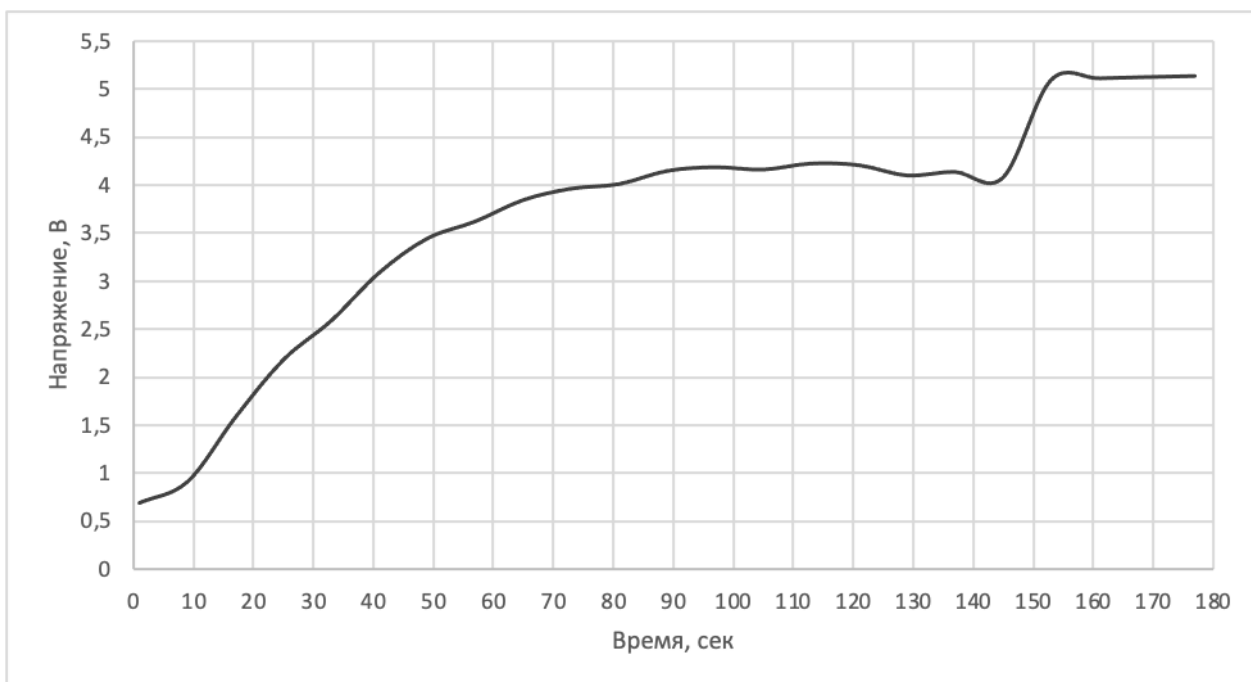


Рисунок Б.3 – График зависимости напряжения от времени в положительной пробе (высота выступа кюветы 0,74 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:4; объём пробы 16 мкл; гематокрит 39,4; цоликлон В)

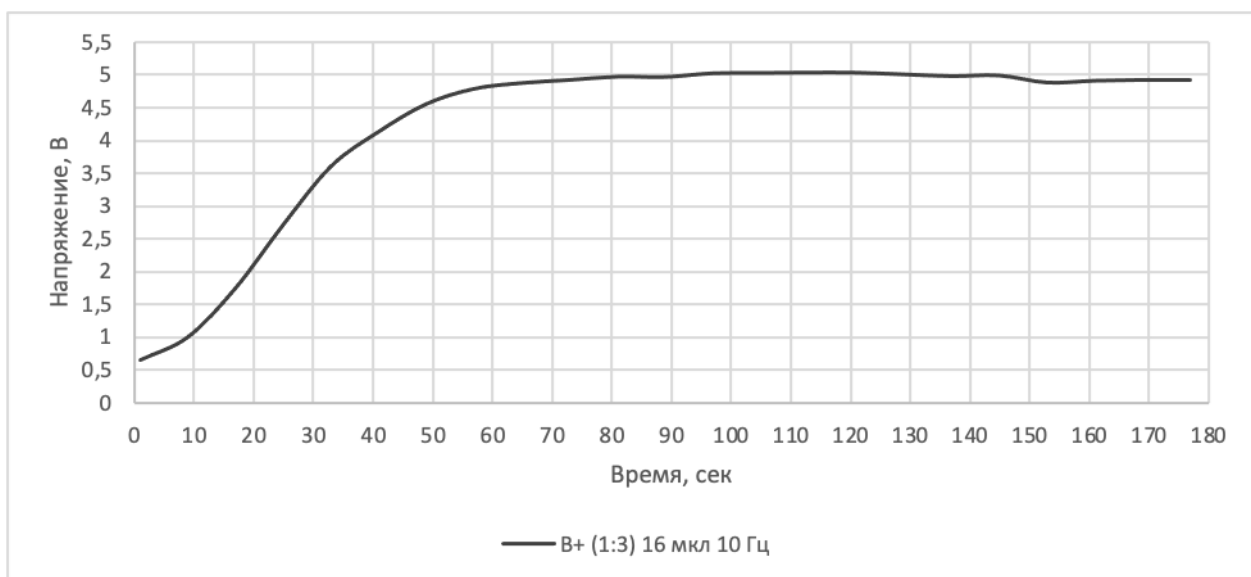


Рисунок Б.4 – График зависимости напряжения от времени в положительной пробе (высота выступа кюветы 0,68 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; объём пробы 16 мкл; гематокрит 46; цоликлон В)

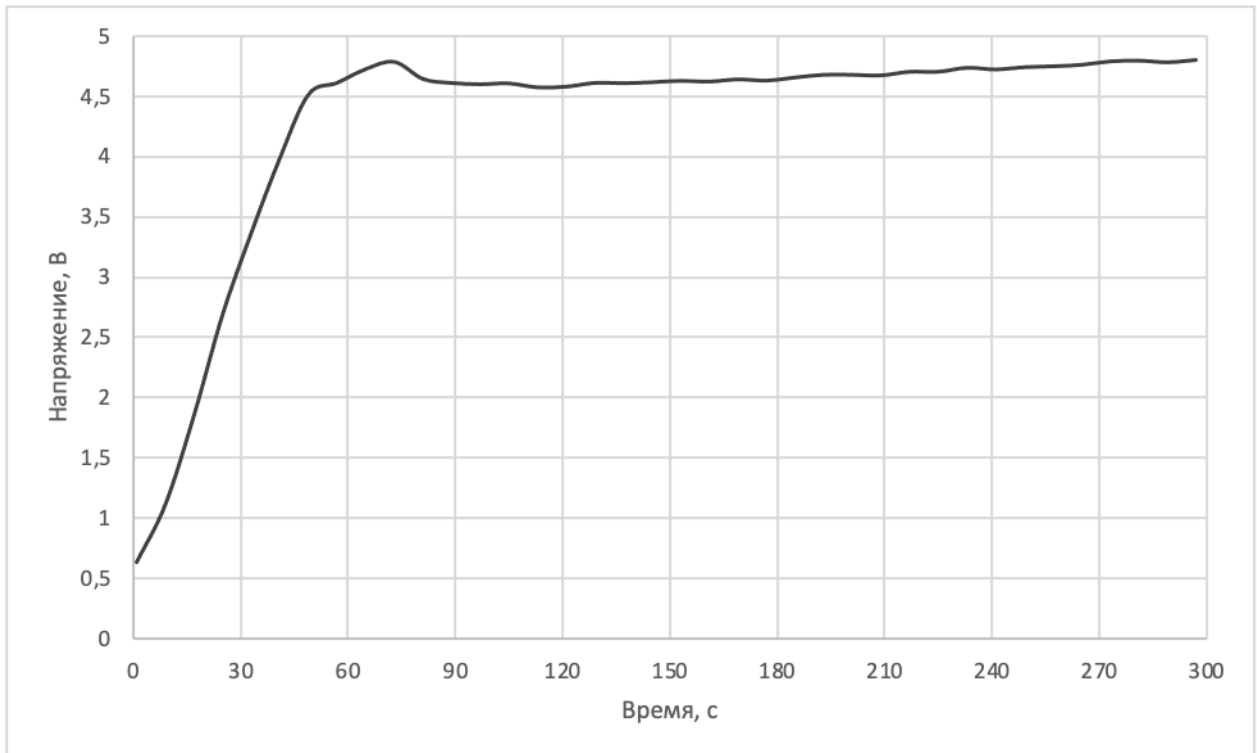


Рисунок Б.5 – График зависимости напряжения от времени в положительной пробе (высота выступа кюветы 0,68 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; объём пробы 16 мкл; гематокрит 46; цоликлон Д)

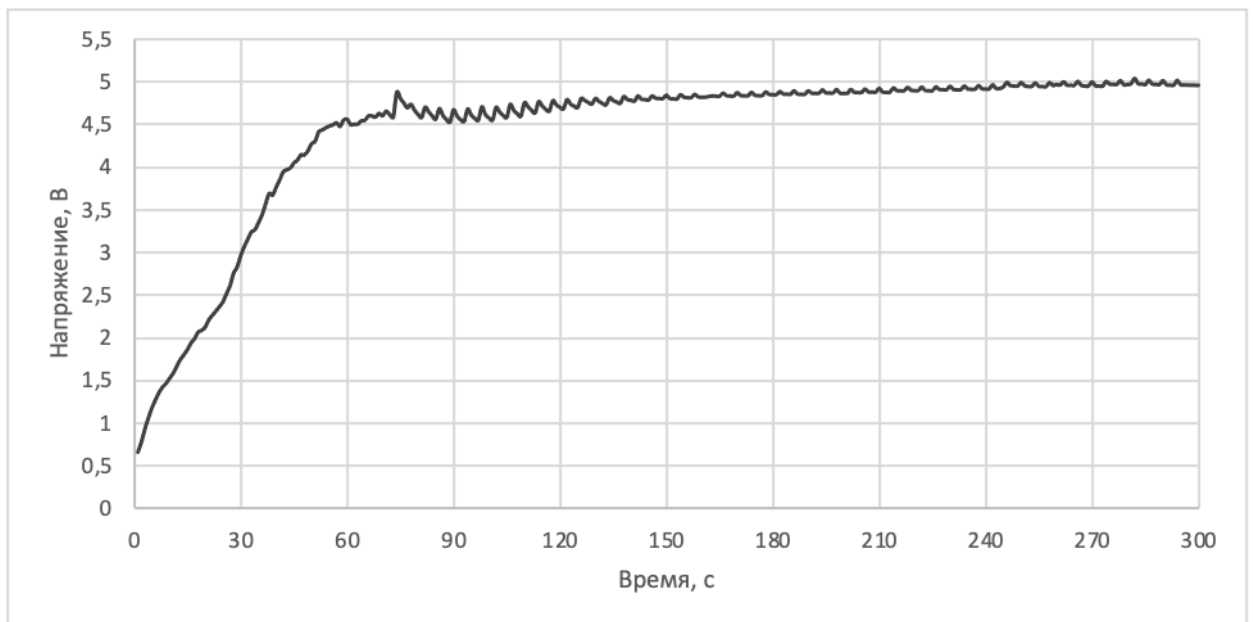


Рисунок Б.6 – График зависимости напряжения от времени в положительной пробе (высота выступа кюветы 0,68 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; объём пробы 16 мкл; гематокрит 33; цоликлон Д)

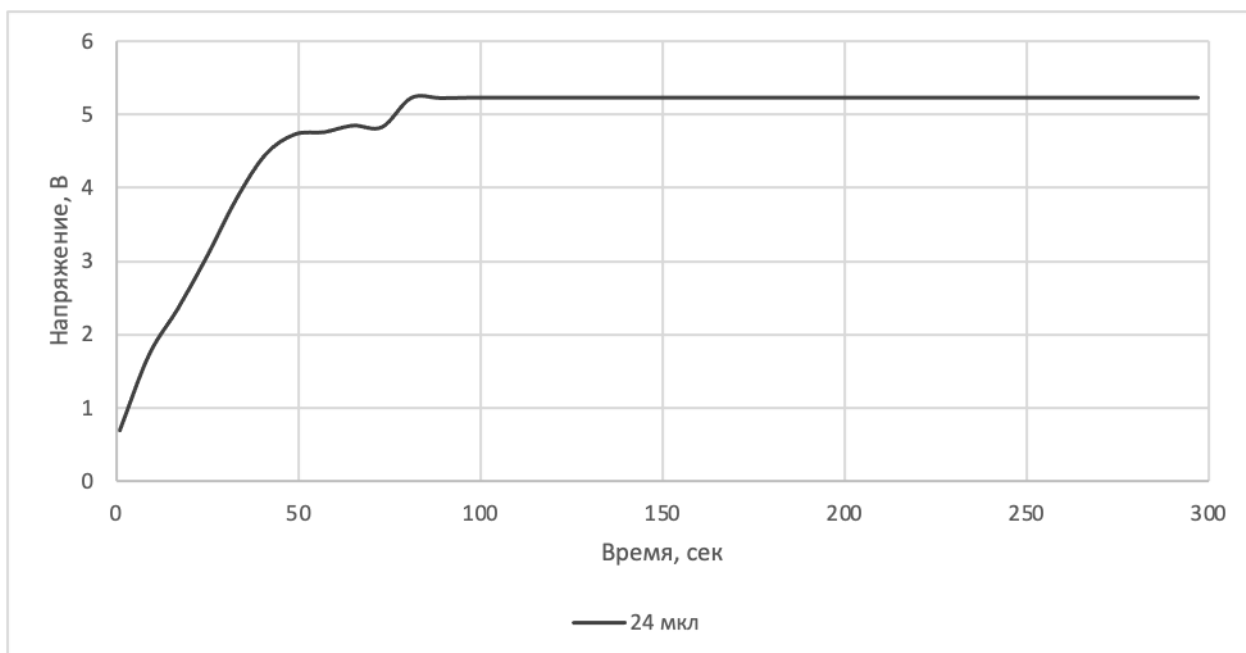


Рисунок Б.7 – График зависимости напряжения от времени в положительной пробе (высота выступа кюветы 0,74 мм, соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; объем пробы 20 мкл; гематокрит 47,3; цоликлон В)

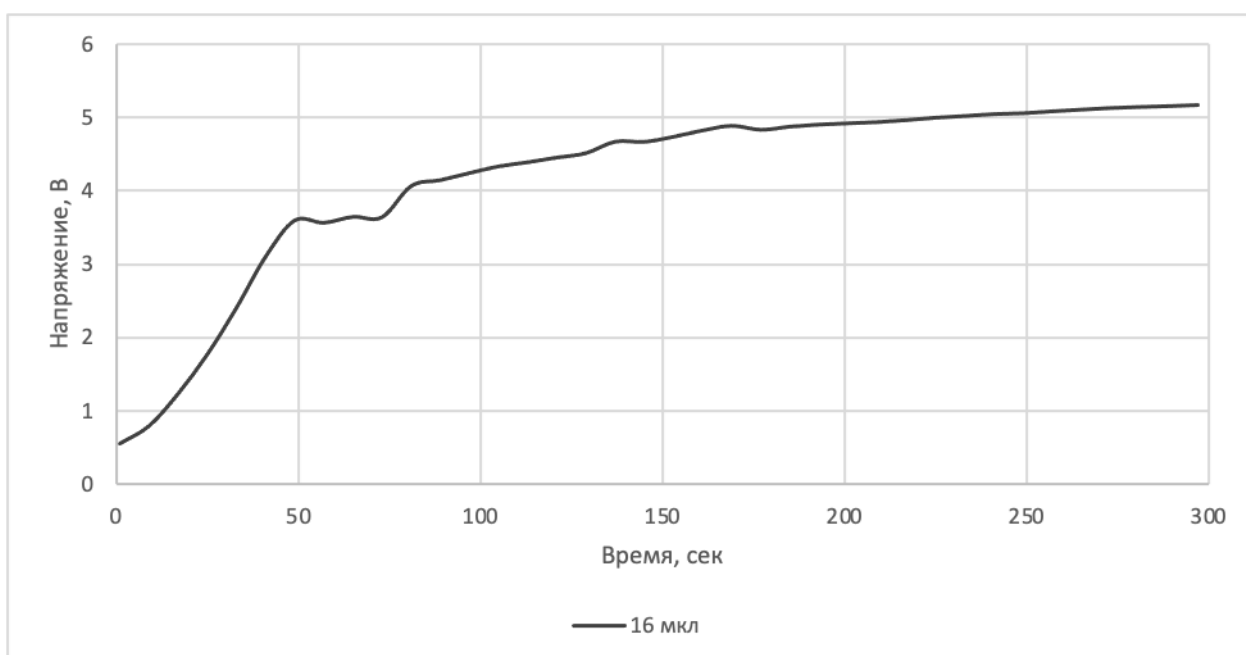


Рисунок Б.8 – График зависимости напряжения от времени в положительной пробе (высота выступа кюветы 0,74 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; объем пробы 16 мкл; гематокрит 47,3; цоликлон В)

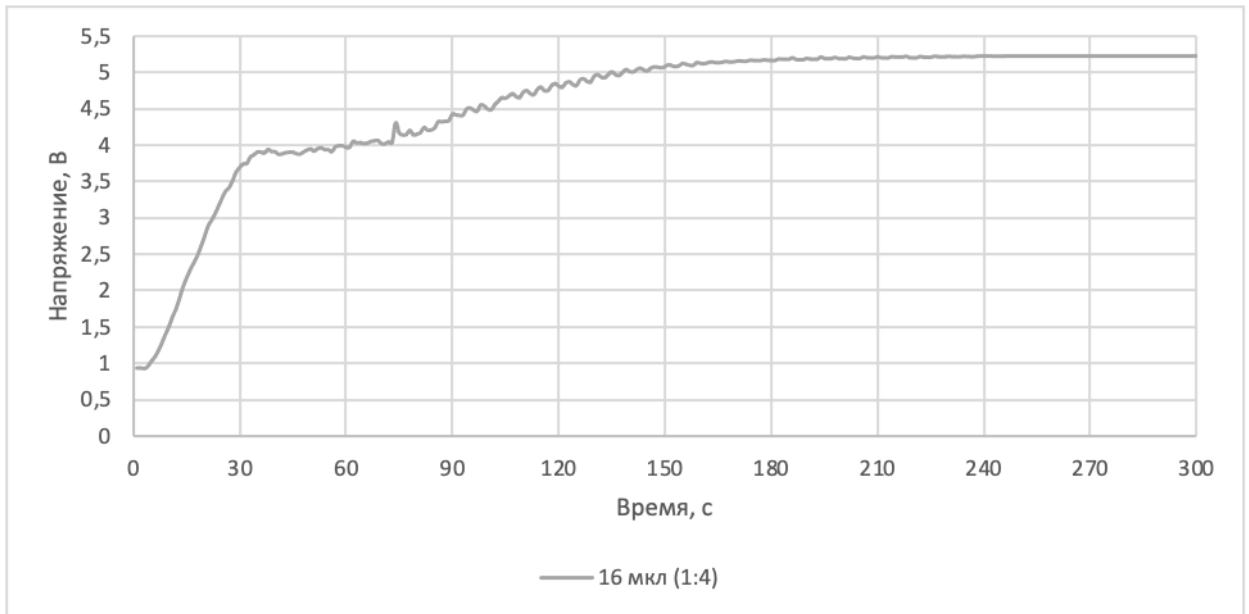


Рисунок Б.9 – График зависимости напряжения от времени в положительной пробе (высота выступа кюветы 0,74 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:4; объем пробы 16 мкл; гематокрит 47,3; цоликлон В)

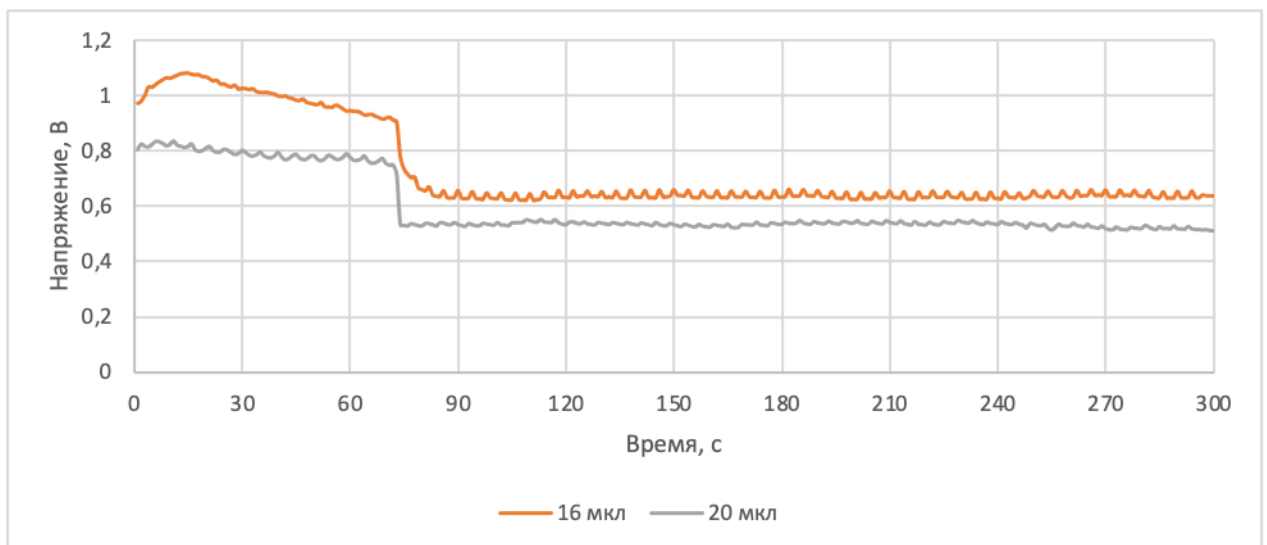


Рисунок Б.10 – График зависимости напряжения от времени в отрицательной пробе (высота выступа кюветы 0,74 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; объем пробы 16 мкл, 20 мкл; гематокрит 23,2; цоликлон В).

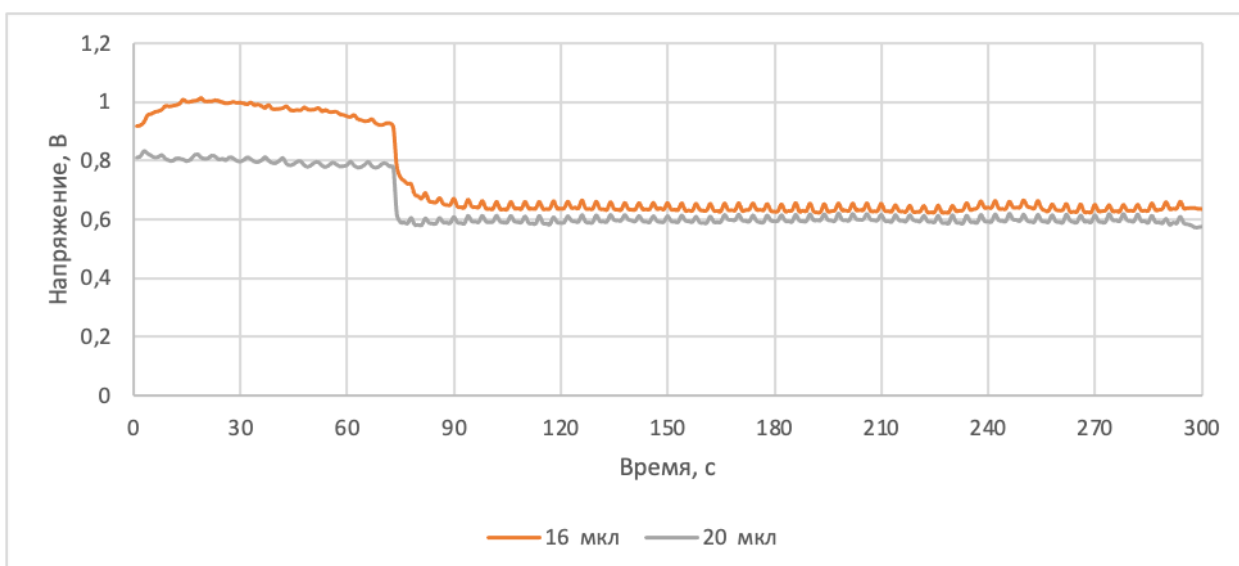


Рисунок Б.11 – График зависимости напряжения от времени в отрицательной пробе (высота выступа кюветы 0,68 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; объём пробы 16 мкл, 20 мкл; гематокрит 23,2; цоликлон В)

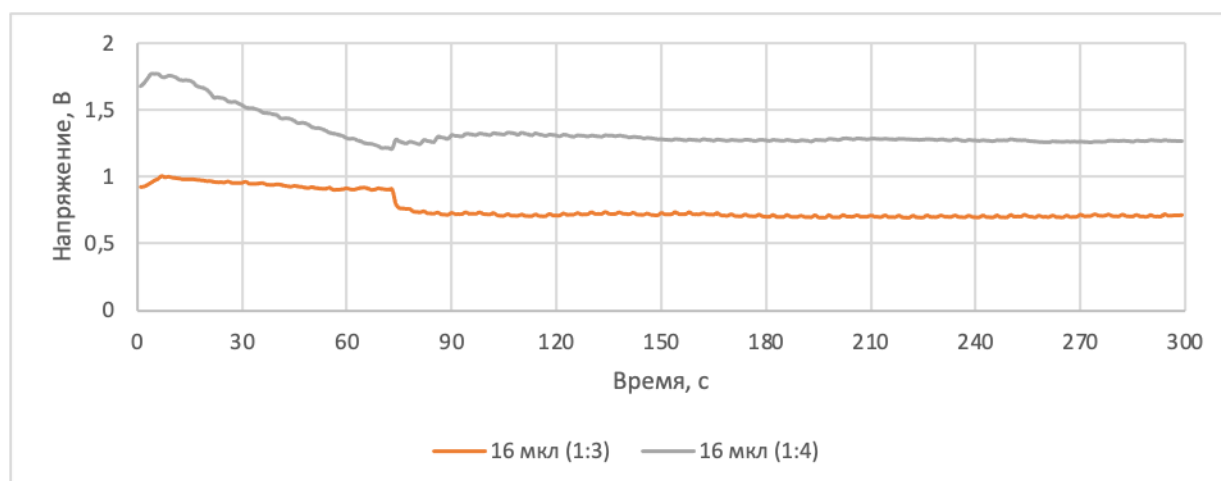


Рисунок Б.12 – График зависимости напряжения от времени в отрицательной пробе (высота выступа кюветы 0,84 мм; соотношение цельной крови к цоликлону 1:3 и 1:4; объём пробы 16 мкл; гематокрит 23,2; цоликлон Д)