

**ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**



На правах рукописи

Розенбаум Юлия Андреевна

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

2.2.12 – Приборы, системы и изделия медицинского назначения

Томск – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования "Национальный исследовательский Томский политехнический университет"

Научный руководитель:

Аристов Александр Александрович

кандидат технических наук, доцент, Томский политехнический университет, доцент

Официальные оппоненты:

Демкин Владимир Петрович

доктора физико-математических наук, профессор, профессор кафедры общей и экспериментальной физики Национального исследовательского Томского государственного университета

Завадовский Константин Валерьевич

доктор медицинских наук, заведующий отделом лучевой диагностики Научно-исследовательского института кардиологии - филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита состоится 22 декабря 2025 г. в 15 часов 00 мин на заседании диссертационного совета ДС.ТПУ.14 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования "Национальный исследовательский Томский политехнический университет" по адресу: 634050, г. Томск, ул. Ленина, 2а, строение 4, аудитория 245.



С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке Томского политехнического университета и на сайте dis.tpu.ru при помощи QR-кода.

Автореферат разослан "___" 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета ДС.ТПУ.14
к.ф.-м.н.

А.И. Козельская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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.

Определение групповой принадлежности крови (типирование крови) используется в клинической практике перед переливанием крови, в гинекологии при ведении беременности, до и во время хирургических вмешательств. В лабораториях для типирования крови наиболее часто используются методы: определение группы крови с использованием солевого раствора моноклональных антител (цоликлонов) и метод агглютинации в геле. 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, снизить вероятность ошибки результата анализа, уменьшить расход реактивов и биоматериала. Тема диссертационной работы соответствует приоритетному направлению развития науки, технологий и техники в Российской Федерации - превентивная и персонализированная медицина, обеспечение здорового долголетия.

Целью диссертационной работы является разработка метода автоматического выявления агглютинации эритроцитов человека с

моноклональными антителами в микрообъёме и технических средств для его реализации.

В связи с поставленной целью должны быть решены 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.

Объект исследования: венозная кровь, стабилизированная ЭДТА.

Предмет исследования: инструментальный метод оценки наличия реакции гемагглютинации в образцах крови.

Достоверность полученных результатов диссертационной работы подтверждается сравнением результатов, полученных разработанными методами, с результатами, полученными известными методами выявления агглютинации эритроцитов с моноклональными антителами.

Научная новизна

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 рассчитаны параметры кюветы и капельного образца, позволяющие отделить агглютинаты от реакционной среды в процессе вибрационных воздействий на капельный образец, на основе которой реализована компьютерная биотехническая система для автоматического обнаружения иммунных комплексов.

Практическая ценность работы. Результаты диссертационной работы могут быть использованы для построения автоматизированной системы обнаружения иммунных комплексов, позволяющей минимизировать влияние субъективного фактора при выдаче результата анализа. Предложенная биотехническая система может быть использована для определения группы крови человека по системе АВ0, резус-фактор и других антигенов. Разработанный метод может быть интегрирован в состав автоматического анализатора или портативного прибора для определения группы крови человека, а также оценки совместимости донора и реципиента.

Реализация и внедрение результатов работы. Результаты работы используются: использованы при выполнении НИР «УМНИК», макет устройства прошёл апробацию в отделении клинической лабораторной диагностики НИИ онкологии Томского НИМЦ, внедрены в учебный процесс отделения электронной инженерии ТПУ при подготовке бакалавров и магистрантов по направлению «Биотехнические системы и технологии». Акты внедрения приложены к диссертационной работе.

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 объеме 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 WoS и Scopus, 13 публикации в материалах докладов международных и всероссийских конференций, в их числе проиндексированных в международных базах данных WoS и Scopus – 3.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав, заключения, списка литературы из 110 наименований. Работа содержит 137 страниц основного текста, включая 89 рисунков и 2 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, охарактеризована степень ее разработанности, представлена новизна исследовательской работы, ее теоретическая и практическая значимость, сформулированы цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту.

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. В современных лабораториях для определения группы крови в основном используется выявление агглютинации эритроцитов с использованием солевого раствора моноклональных антител (целиклонов). Рассмотрен принцип выявления реакции агглютинации эритроцитов с использованием целиклонов и оценка результатов, которая основана на визуальном анализе образца. Наличие хлопьев, мелких крупинок свидетельствует о

положительной пробе (рисунок 1а). Если среда гомогенная, значит, проба отрицательная и антиген отсутствует в мембране эритроцитов исследуемого образца (рисунок 1б). Метод выявления иммунных комплексов с использованием цоликлонов является распространённым анализом в лабораториях, но на данный момент не существует автоматических анализаторов на его основе. Таким образом, на основе проведённого обзора показано, что целесообразен поиск метода для автоматического выявления иммунных комплексов с использованием моноклональных антител.

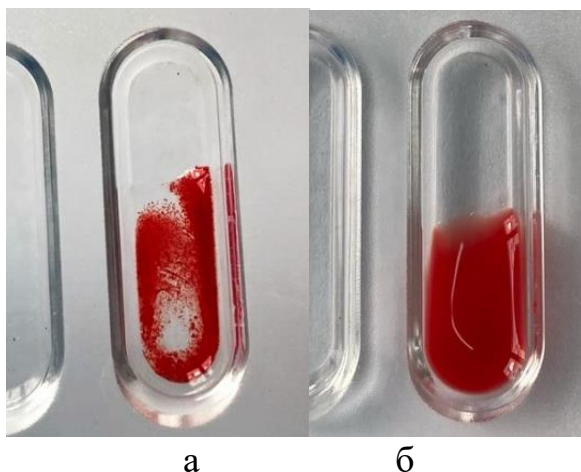


Рисунок 1 – Фотография пробы крови с моноклональными антителами: а – положительная проба (есть иммунологическая реакция), б – отрицательная проба (иммунологическая реакция отсутствует в анализе)

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. При смешивании крови и цоликлона может произойти иммунологическая реакция, образуются агглютинаты (иммунные комплексы), если в пробе находятся комплементарные антиген и антитело. В процессе образования агглютинатов происходит изменение дисперсности среды, что делает образец более гетерогенным (рисунок 1-а). Если же иммунные комплексы не образуются, то проба остается мутной, непрозрачной. При фотометрии такого образца светопропускание будет минимальным. Разная дисперсность среды в отрицательных и положительных пробах на реакцию агглютинации, даёт возможность использовать фотометрический метод, для обнаружения агглютинатов в исследуемых пробах. Различие в дисперсности среды, при одинаковой объемной доле дисперсной фазы, будет давать разную интенсивность проходящего через образец света для отрицательной и положительной пробы. Однако данный принцип выявления иммунных комплексов не используется в проборах из-за значительных колебаний регистрируемого оптического сигнала в результате перемещения образовавшихся комплексов в

реакционной среде, что не позволяет определить чёткие критерии для автоматического выявления агглютинатов.

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.

Как показано экспериментально, в процессе агглютинации после отделения агглютинатов от прозрачной среды, на поверхности кюветы будет образовываться слой из иммунных комплексов, а над ними формируется прозрачная среда, которая может выполнять роль фокусирующей линзы (рисунок 2).

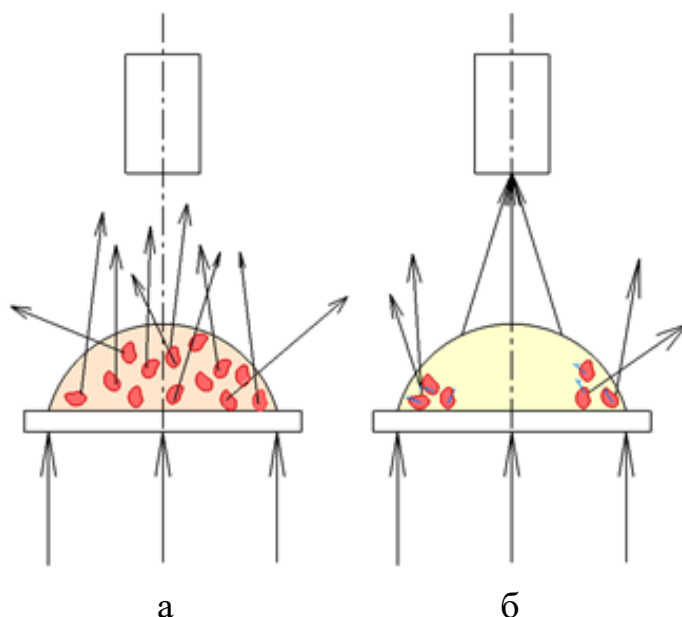


Рисунок 2 – Схематичное изображение прохождения светового потока через образец (кровь + цоликлон) в виде лежащей капли: а – отсутствие иммунологической реакции; б - наличие реакции агглютинации

В результате этого световой поток, прошедший через капельный образец, будет фокусироваться на фотоприёмнике, расположенном в фокусе капли-линзы. В результате уменьшаются колебания оптического сигнала из-за перемещения агглютинатов в образце, что даёт преимущество фотометрии капельного образца по сравнению с плоской кюветой.

Для усиления процесса образования агглютинатов на капельный образец дополнительно должно оказываться вибрационное воздействие. Вибрация капель в разрабатываемом нами устройстве осуществляется путем возвратно-поступательного перемещения в горизонтальной плоскости платформы, на которой размещается кювета с образцами крови.

Критерием оценки степени изменения оптических характеристик капельных образцов в ходе исследования, будет служить введенная нами величина $U_{\max}$, это максимальное значение напряжения с фотоэлектрического преобразователя (ФЭП), зарегистрированное после 90 с исследования в образце.

На рисунке 3 представлены примеры графиков, отражающих изменение светопропускания для образцов с наличием и отсутствием агглютинации, полученные в процессе вибрации капельных проб.

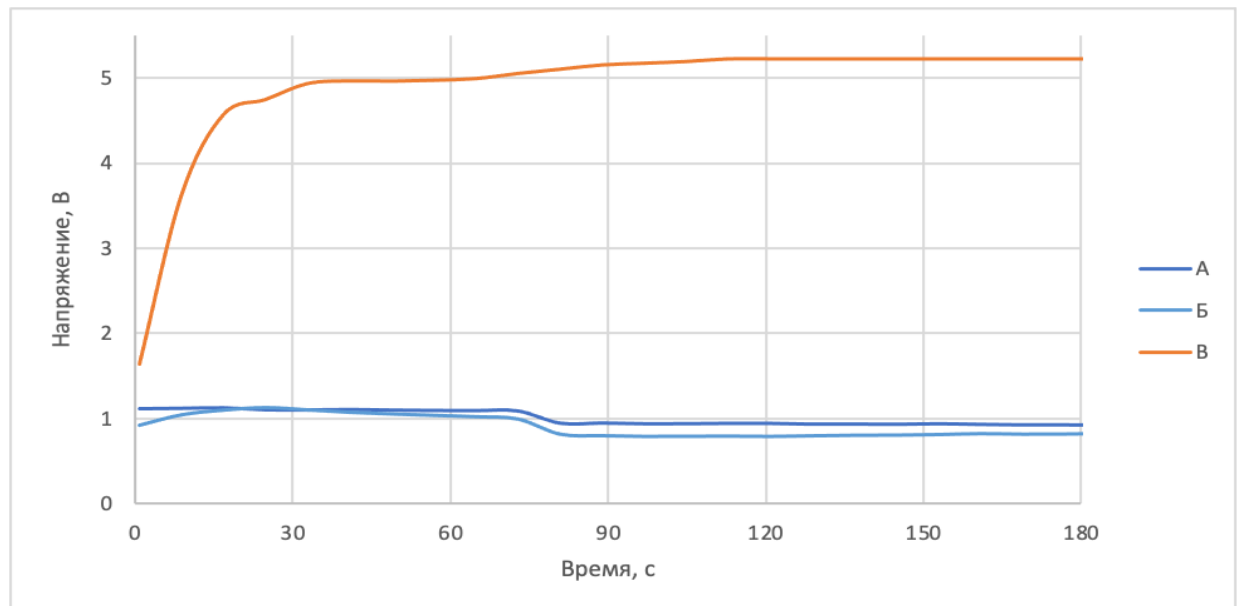


Рисунок 3 – Пример графиков зависимости напряжения с ФЭП от времени:
 А – при отсутствии агглютинатов в пробе (кровь и моноклональные антитела);
 Б – контрольный образец, агглютинация отсутствует (кровь и физиологический раствор); В – при наличии агглютинации в образце

Для автоматического определения наличия или отсутствия иммунных комплексов необходимо сравнение напряжения с ФЭП контрольного образца, где отсутствует иммунологическая реакция (кровь с добавлением физиологического раствора) с исследуемыми образцами. Поэтому введена величина b , которая показывает отношение напряжений с ФЭП исследуемой пробы и контрольной.

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

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.

Было исследовано более 200 образцов крови с разным гематокритом и группой крови. Получены фотометрические кривые для исследованных проб при положительной и отрицательной агглютинации. Кривые имеют разную скорость нарастания напряжения и возможны флуктуации светового потока, поэтому делать вывод о наличии агглютинации в пробе в начале исследования невозможно. Было решено находить b через 90 секунд иммунологической реакции.

В исследованиях по определению наиболее подходящих параметров измерительной системы: размер и форма кюветы, объем образца, соотношение компонентов, характер вибрации, параметр b был определяющим при оценке результатов экспериментов. Получение большей разницы в значениях светопропускания контрольного и опытного образцов позволяет повысить

вероятность точного выявления агглютинатов, даже при слабой агглютинации и наличии артефактов в виде флуктуации светового потока.

Выбор формы кюветы для анализа. В ходе исследований 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. 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). Были рассмотрены три вида кювет, представленных на рисунке 4.

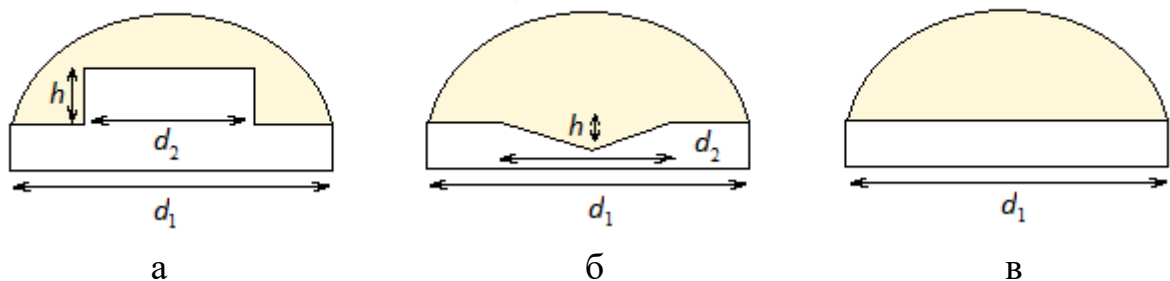


Рисунок 4 – Схематичное изображение кювет с капельным образцом: а – кювета с выступом; б – кювета с углублением, в – плоская кювета (h – высота выступа или углубления, d_1 – диаметра кюветы, d_2 – диаметр выступа)

Из проведенных опытов по распределению иммунных комплексов по объёму капли выявили, что лучшее светопропускание капельного образца при наличии в пробе агглютинации достигается в кювете, имеющей выступ h от 0,6 до 0,84 мм, при диаметре основания кюветы (d_1) от 4,75 до 5 мм, диаметре выступа кюветы (d_2) 3 мм (рисунок 4а). В дальнейших исследованиях для работы была выбрана кювета с выступом, так как она способствует локализации иммунных комплексов на периферии капельного образца при применении механических колебаний (рисунок 5). Поэтому светопропускание центральной части кюветы увеличивается, что даёт возможность использовать фотометрический метод для анализа.

При образовании агглютинатов в кюветах с углублением, часть агглютинатов скапливается в области углубления и световой поток проходит через края капельного образца, свободного от агглютинатов. Но, как показали эксперименты, изменение величины светопропускания при агглютинации в образце в такой кювете намного ниже, чем для кюветы с выступом. Это снижает риск получения неверного результата анализа. В плоских кюветах, которые нами применялись изначально, вероятность локализации иммунных комплексов по поверхности кюветы в случае вибрации носила более случайный характер и не

способствовала очистке среды в области просвечивания от агглютинатов, поэтому от них отказались.

В исследовании рассматривались кюветы с разными диаметрами основания. Показано что при диаметре основания капли более 5 мм образец теряет сферическую форму поверхности и его фокусирующие свойства снижаются. Также увеличение диаметра увеличивает объем образца и требует больше реактивов и крови.

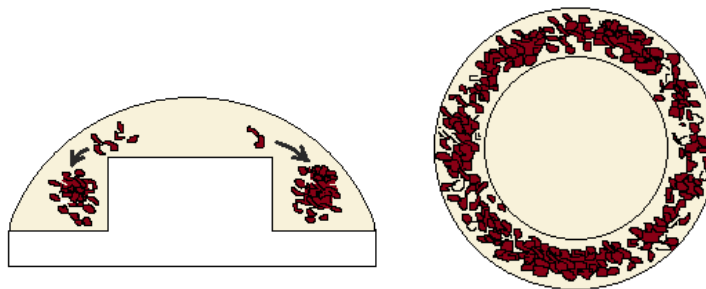


Рисунок 5 – Схематическое изображение процесса распределения агглютинатов в кювете с выступом в положительной пробе

При малых диаметрах капли, а соответственно и малых объемах образца резко возрастает ошибка при дозировании. К примеру, при выбранном диаметре кюветы 5 мм итоговый объем крови, который был определен для анализа, составляет всего 4 мкл. Также возрастают требования к точности позиционирования кюветы и соосности оптической системы.

Выбор режима вибрации капельного образца. Важным условием, обеспечивающим повышение точности выявления агглютинации в пробе, является подбор режима вибрации проб. Вибрация способствует перемешиванию реагентов в образце, объединению мелких агглютинатов в крупные и локализации иммунных комплексов в одном месте кюветы (желательно на периферии), чтобы была зона просветления в осевой части капли. Исследования проводились с частотой вибрации от 10 до 80 Гц. Наилучшие результаты получены при комбинированной вибрации, которая включает в себя 2 этапа. Первый этап – вибрация с частотой 5 – 10 Гц и амплитудой 0,7 – 1 мм в течение 30 – 40 с способствует перемешиванию образца и увеличению скорости образования агглютинатов. Второй этап – вибрация с частотой 30 – 50 Гц, амплитудой 0,15 – 0,2 мм способствует локализации агглютинатов на периферии капельного образца и уменьшению вероятности нахождения агглютинатов в центре кюветы (рисунок 6).

Представленная кинограмма капельных образцов (рисунок 6) показывает, что вибрация способствует перемещению агглютинатов за пределы выступа кюветы и локализации иммунных комплексов на периферии капельного образца.

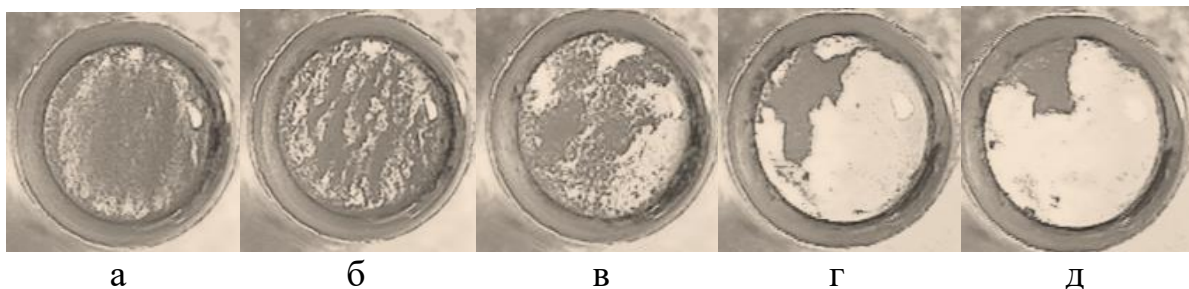


Рисунок 6 – Фотографии (кинограмма) капельных образцов, отражающие динамику образования и смещения агглютинатов в процессе вибрации: а – после механических колебаний частотой 10 Гц в течении 30 секунд. б, в, г, д – при механических колебаниях частотой 55 Гц в течении 60 секунд

Выбор соотношения крови и цоликлона, объёма капельного образца.

Важным фактором для работы является объём и соотношения реагентов в исследуемой пробе. Важный параметр крови, который характеризует долю эритроцитов в общем объёме крови – это гематокрит. Поэтому в исследованиях учитывался гематокрит экспериментальных 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. Была проведена оценка получения стабильного результата измерения при различных параметрах кювет для проб с различным значением гематокрита от 18 до 50.

В исследованиях были использованы 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). Далее будут представлены данные экспериментов с образцами крови и солевыми растворами моноклональных антител содержащие иммунные комплексы (положительные пробы) в виде диаграмм.

Исходя из данных графика на рисунке 7, для кювет, имеющих высоту выступа 0,45 – 0,55 мм, напряжение с ФЭП для положительных образцов имеет большой разброс и не достигает высоких значений. Это говорит о том, что образующиеся агглютинаты, особенно при высоком гематокрите, остаются в центральной части капельного образца и уменьшают светопропускание пробы.

При увеличении объёма капельного образца, его устойчивость к растеканию снижается. Образцы объёмами более 20 мкл при выбранном диаметре основания капли при вибрационном воздействии часто растекаются. Капельный образец объёмом 12 мкл менее подвержен растеканию, но 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 мкл и 20 мкл.

Из диаграмм на рисунке 8 можно сделать вывод, что капельные образцы с содержанием крови и цоликлона в соотношениях 1 к 1 и 1 к 2 не подходят для исследований, поскольку 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.

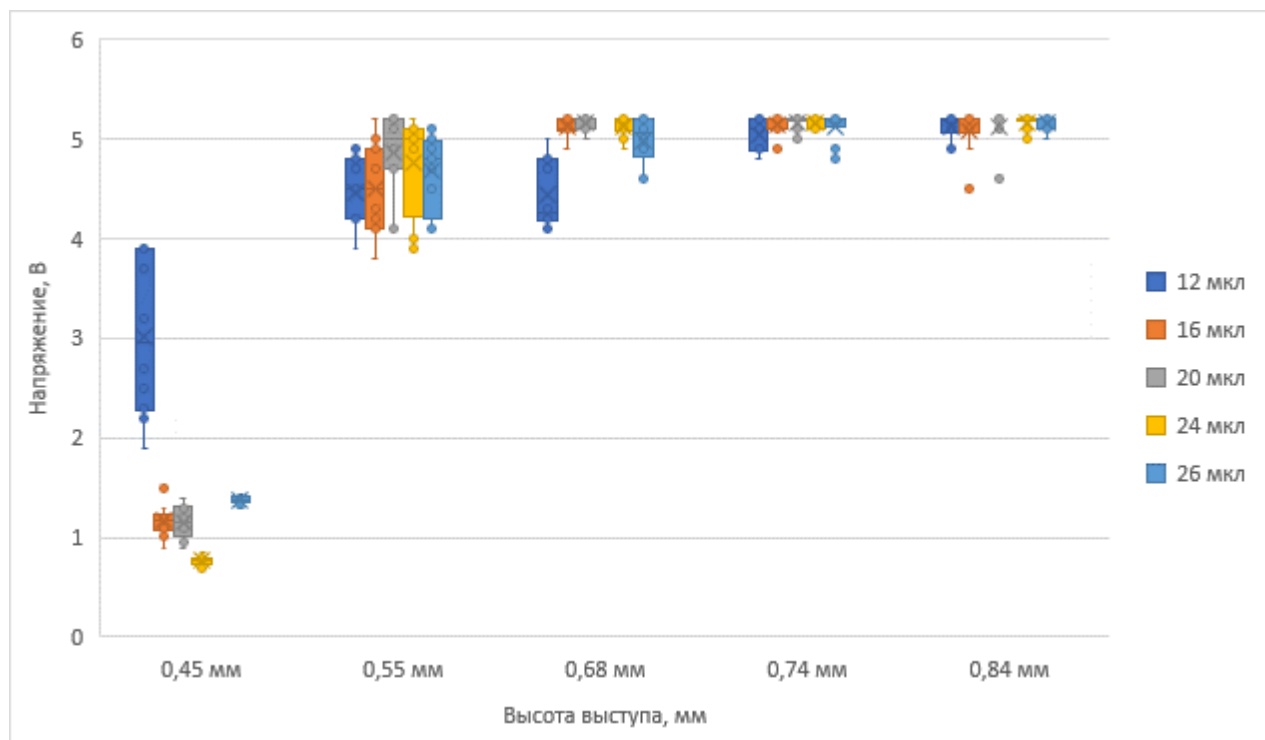


Рисунок 7 – Диаграмма максимального значения напряжения b с (ФЭП) для разных объёмов капельных образцов крови и цоликлонов и разной высотой выступа кювет. (соотношение цельной крови к цоликлону 1:3; гематокрит 40 – 50; цоликлон В (положительные пробы))

Из диаграмм на рисунке 8 можно сделать вывод, что капельные образцы с содержанием крови и цоликлона в соотношениях 1 к 1 и 1 к 2 не подходят для исследований, поскольку 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 соотношения цоликлона в крови наблюдается увеличение светопропускания 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 положительных образцах. Соотношение крови к цоликлону 1 к 5 в образцах с низким значением гематокрита (менее 30) значительно увеличивает светопропускание контрольного образца и разница между положительной пробой и контрольной будут не значительными, что может приводить к ложноотрицательным результатам.

Кюветы с высотой выступа от 0,6 до 0,84 мм способствуют высокому значению светопропускания пробы объёмом 16 – 20 мкл при соотношении крови к цоликлону 1:3 и 1:4.

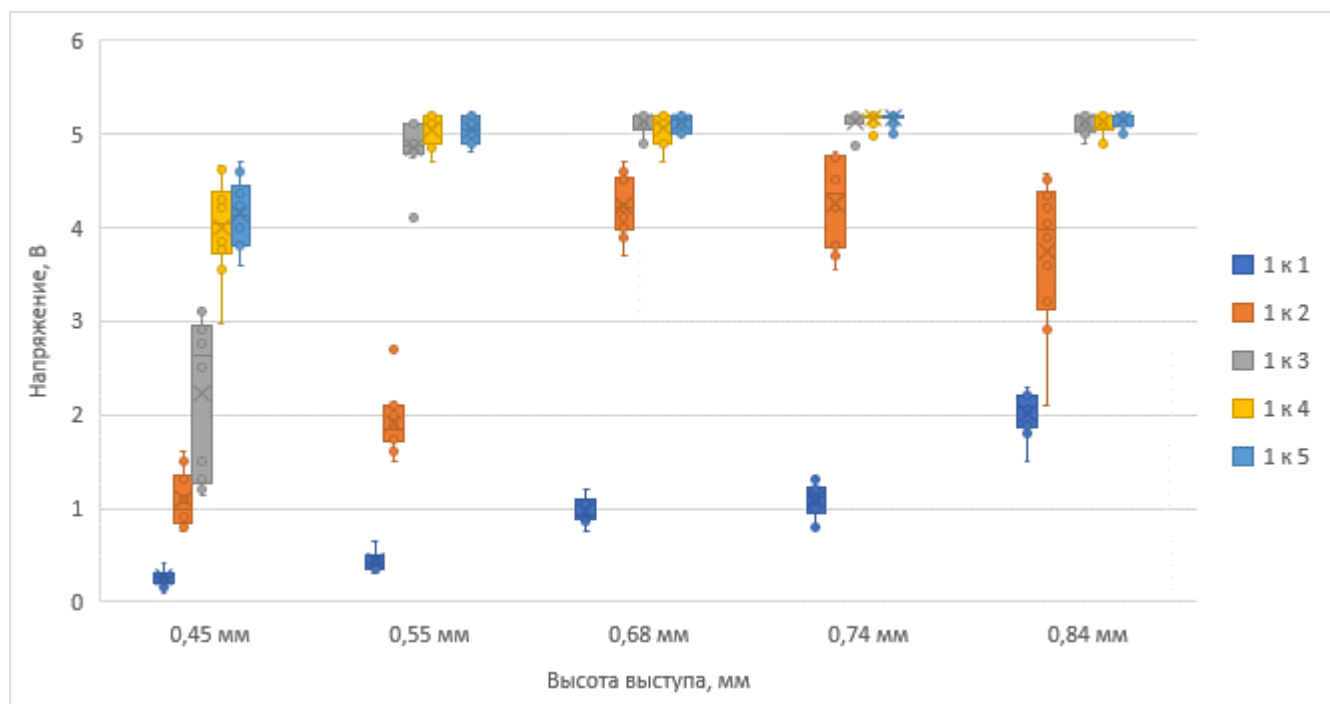


Рисунок 8 – Диаграмма максимального значения напряжения с фотоэлектрического преобразователя (ФЭП) при разном соотношении крови и цоликлонов и разной высотой выступа кювет (объём пробы 16 мкл; гематокрит 40 – 50; цоликлон В (положительные пробы))

Экспериментально показано, что напряжение с ФЭП от 0,6 до 1,3 В соответствует светопропусканию образцов, не содержащих агглютинаты. При достижении напряжения с ФЭП 4,5 – 5,2 В, можно считать, что в пробе содержатся иммунологические комплексы. Соответственно, если отношение напряжения с ФЭП исследуемого образца и напряжения ФЭП контрольного образца (b) находится в пределах от 3 и более, то проба считается положительной (содержит иммунологические комплексы). При значении b близкого к 1 ± 0.2 (отличающиеся от контроля не более чем на 20%) пробы будут считаться отрицательными.

На основе анализа кривых, чтобы исключить ложно положительные результаты в случае случайных флуктуаций светового потока, было решено, что при достижении величины b более 3, пробы будут считаться положительными, а при значении величины b близкой к 1 (отличающиеся от контроля не более чем на 20%) пробы будут считаться отрицательными.

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. 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.

Для апробации метода фотометрирования капельных образцов было создано устройство, состоящее из нескольких функциональных блоков (рисунок 9, рисунок 10). Оно включает фотометрические блоки, вибрационную платформу, кнопки управления и блок сопряжения с персональным компьютером для управления устройством и считывания данных.

Фотометрический блок содержит источник излучения со стабилизатором тока, планшет с кюветами для исследования образцов, приёмник излучения и усилитель фототока. Источник излучения генерирует свет, проходящий через образец, а приёмник (фотодиод) регистрирует интенсивность прошедшего сигнала. При наличии агглютинации количество света, достигающего приёмника, изменяется. Напряжение с фотометрических преобразователей через блок сопряжения передаётся в компьютер для анализа. Программа для анализа полученных данных, управления режимом работы шагового двигателя создана в среде разработки LabVIEW. В ней получаем кривую, которая отражает информацию об оптических свойствах пробы и их изменении в результате протекания иммунологической реакции в пробе.

Вибрационная платформа, оснащённая шаговым двигателем и колебательной системой, обеспечивает возвратно-поступательное движение кювет с образцами.

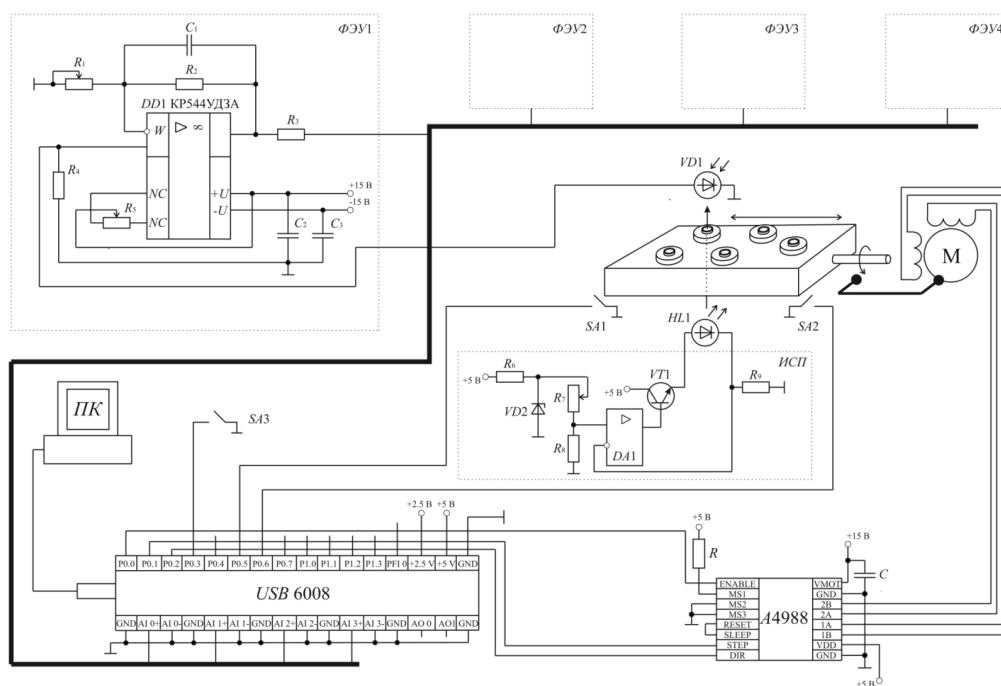


Рисунок 9 – Схема макета устройства для определения агглютинации в капельном образце

С использованием разработанного макета устройства были проведены анализы определения группы крови. Полученные результаты сопоставлялись с

типированием крови на планшете, согласно методике определения группы крови с моноклональными антителами (Приказ №2 МЗ РФ от 05.10.2000). Проведённые исследования продемонстрировали полное соответствие между методиками исследования. На рисунке 10 представлен общий вид макета устройства и фотография кюветы с образцами вначале исследования и после 90 секунд вибрации. Как видно, образцы с наличием агглютинации даже визуально легко различимы.

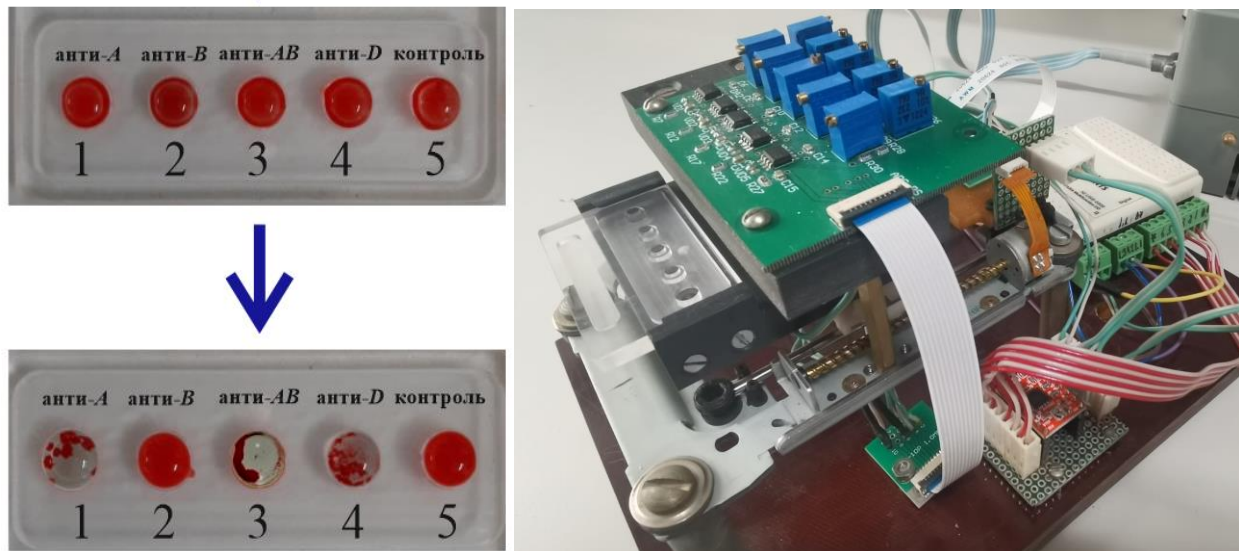


Рисунок 10 – Макет устройства для выявления агглютинации в капельном образце и результат типирования группы крови, выполненный на устройстве

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработан и экспериментально проверен новый подход выявления иммунных комплексов, образуемых при специфической реакции агглютинации эритроцитов в солевом растворе моноклональных антител (целиклонов), на основе которого создан автоматический метод обнаружения агглютинатов в микрообъемах.
2. Предложенный метод обнаружения агглютинатов основан на фотометрии анализируемого образца, содержащего цельную кровь и целиккон 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.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК, индексируемых в базах Scopus

1. Rozenbaum, Y.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, (Scopus).
2. 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, (Scopus).
3. Rozenbaum, Yu.A. H₂S-Mediated Changes in Erythrocyte Volume: Role of Gardos Channels, Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ Cotransport and Anion Exchanger / Yu.G. Birulina, I.V. Petrova, Yu.A. Rozenbaum // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2019. – T. 167. – №. 4. – С. 508-511, (Scopus).

Статьи в других изданиях

4. Rozenbaum, Y. Vibration Installation for Research of Erythrocytes Agglutination / A. Aristov, M. Shulgina, Y. Rozenbaum // Studies in Systems. Decision and Control. – 2021. – V.351. – P. 209-215, (Scopus).
5. Розенбаум, Ю.А. 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.
6. Розенбаум, Ю.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.
7. Розенбаум, Ю.А. Исследование влияния спектра зондирующего излучения на чувствительность фотометрического метода определения группы крови / А.А. Аристов, В.В. Ли, М.П. Кравецкая, Д.А. Агафонова, Ю.Н. Ворончихина, Е.И. Гладкова, Ю.А. Розенбаум // 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.
8. Розенбаум, Ю.А. Определение группы крови фотометрическим методом / А.А. Аристов, Ю.Н. Ворончихина, Ю.А. Розенбаум, Д.С. Серпенев // Новые информационные технологии в исследовании сложных структур: материалы Пятнадцатой международной конференции, п. Катунь. – Томск: Томский государственный университет, 2024. – С. 28-29.

9. Розенбаум, Ю.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.
10. Розенбаум, Ю.А. Оптико-вибрационный метод исследования процесса агглютинации эритроцитов / А.А. Аристов, Ю.А. Розенбаум, А.А. Банзанова, Н.А. Фирсова // Труды IEEEХХII Международная конференция молодых специалистов в области электронных приборов и материалов (EDM 2021). Дайджесты. – Новосибирск, 2021. – С. 441-446.
11. 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.
12. Розенбаум, Ю.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. Розенбаум, Ю.А. Разработка вибрационной платформы для исследования агглютинации эритроцитов / А. А. Аристов, М. А. Шульгина, Ю. А. Розенбаум // Новые информационные технологии в исследовании сложных структур: материалы Тринадцатой Международной конференции. – Томск: Национальный исследовательский Томский государственный университет. – 2020. – С. 64-65.
14. Розенбаум, Ю.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.
15. Rozenbaum, J.A. 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. (Scopus, труды конференции).
16. Rozenbaum, J.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. (Scopus, труды конференции).