ФИЗИОЛОГИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.118.221.2, 612.111.44 Оригинальная статья

АКУСТООПТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА: СРАВНЕНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИ-А И АНТИ-В МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И СТАНДАРТНЫХ ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК

В.А. Дубровский *— ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, заведующий кафедрой медбиофизики им. проф. В.Д. Зернова, кандидат физико-математических наук;* ***М.Ф. Медведева*** *— ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, лаборант кафедры медбиофизики им. проф. В.Д. Зернова.*

ACOUSTO-OPTICAL METHOD OF BLOOD TYPING: THE COMPARISON OF APPLICATION OF ANTI-A AND ANTI-B MONOCLONAL ANTIBODIES WITH STANDARD HEMAGGLUTINATING SERA

V.A. Doubrovski *— Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Head of Department of Medical Biophysics n.a. Prof. V. D. Zernov, Candidate of Physical and Mathematical Science;* ***M.F. Medvedeva*** *— Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Department of Medical Biophysics n.a. Prof. V. D. Zernov, Laboratory Assistant.*

Дата поступления — 17.11.2016 г. Дата принятия в печать — 20.02.2017 г.

Дубровский В.А., Медведева М.Ф. **Акустооптический метод определения группы крови человека: сравнение применения анти-А и анти-В моноклональных антител и стандартных гемагглютинирующих сывороток. Саратовский научно-медицинский журнал 2017; 13 (1): 22–28.**

Цель: экспериментальное сравнение разрешающей способности акустооптического метода типирования крови при использовании в качестве реагентов моноклональных антител и стандартных гемагглютинирующих сывороток. *Материал и методы.* Исследуется влияние концентрации реагентов (моноклональных антител и стандартных гемагглютинирующих сывороток), тестируемой крови, а также длительности ультразвукового действия на биообъект на разрешающую способность метода. Особенность работы: применение ранее предложенной авторами цифровой обработки фотоизображений с их попиксельным анализом. *Результаты.* Определены оптимальные экспериментальные условия, при которых разрешающая способность акустооптического метода максимальна, что создает предпосылки для надежного типирования крови. *Заключение.* Исследование продолжает разработку акустооптического метода определения групповой принадлежности крови.

Ключевые слова: определение группы крови, эритроцит, моноклональные антитела, агглютинация, седиментация, поглощение света, цифровая визуализация, RGB-разложение.

Doubrovski VA, Medvedeva MF. **Acousto-optical method of blood typing: the comparison of application of anti-A and anti-B monoclonal antibodies with standard hemagglutinating sera. Saratov Journal of Medical Scientific Research 2017; 13 (1): 22–28.**

The aim of the article is a comparison of resolution of the acousto-optical method for blood typing for two types of reagents: monoclonal antibodies and standard hemagglutinating sera. *Materials and Methods:* The influence of the concentrations of reagents (monoclonal antibodies and standard hemagglutinating sera), of blood sample, which is to be tested, as well as of the duration of the ultrasonic action on the biological object upon the resolution of acousto-optical method were investigated. The peculiarity of this work is the application of digital photo images processing by pixel analysis previously proposed by the authors. *Results:* The optimal experimental conditions to obtain maximum of the resolution of the acousto-optical method were found, it creates the prerequisites for a reliable blood typing. *Conclusions:* The present paper is a further step in the development of acousto-optical method for determining human blood groups.

Key words: blood typing, erythrocytes, monoclonal antibodies, RBC agglutination, sedimentation, light absorption, digital imaging, RGB decomposition.

Введение. Автоматизация определения группы крови человека по системе АВ0 является актуальной задачей в связи широкой распространенностью этого лабораторного исследования. На рынке в настоящее время представлено множество наименований приборов-автоматов и полуавтоматов для типирования крови [1]. Одновременно с этим активно ведутся исследования, направленные на усовершенствование имеющихся и разработку новых принципов конструирования подобных устройств [2–10]. Одной из основных задач подобных исследований является повы-

Ответственный автор — Дубровский Валерий Александрович
Тел.: +7 (927) 625-20-22
E-mail: doubrovski43@yandex.ru

шение «разрешающей способности» (разрешения) разрабатываемого метода определения группы крови.

Обычно под разрешающей способностью (R) понимают отношение измеряемого сигнала P_+, соответствующего положительной реакции агглютинации (эритроцитарные агглютинаты образуются), к уровню сигнала P для отрицательной реакции агглютинации (формирование агглютинатов отсутствует): $R=P_+/P_-$ Очевидно, что увеличение разрешающей способности повышает надежность определения группы крови. Следует отметить, что ошибка устройства в определении группы крови образца должна исключаться абсолютно, однако в некоторых случаях прибор может не определить группу крови анализируемой пробы.

Одной из первых публикаций, посвященных акустооптическому методу регистрации агглютинации эритроцитов, стала работа А. Н. Алипова и др. [11]. Метод может быть применен для различных иммунологических исследований, в том числе для определения группы крови человека. Он основан на сочетании действия ультразвука (УЗ) на реакционную смесь «кровь-сыворотка-физиологический раствор» с оптическим ее зондированием. Детально механизм взаимодействия смеси «кровь-сыворотка» с ультразвуком рассмотрен в статьях В. А. Дубровского, К. Н. Дворецкого и др. [12, 13]. Ультразвуковое воздействие приводит к ускорению реакции агглютинации и к укрупнению агглютинатов. Регистрация таких агглютинатов осуществлена в работах Ю. А. Ганиловой, В. А. Дубровского и др. методом проточной цитометрии [14, 15], в работах В. А. Дубровского, А. А. Долмашкина и др. с использованием явления седиментации [16, 17], а в статье В. А. Дубровского, С. О. Торбина и др. на основе цифровой микроскопии [18].

В настоящее время в практику клинических лабораторий медицинских стационаров и центров крови вместо ранее использовавшихся стандартных гемагглютинирующих сывороток (СГАС), изготавливаемых из плазмы крови доноров, внедряются растворы моноклональных антител (МКА). Некоторые производители растворов МКА указаны в табл. 1. Использование МКА радикально изменило точность и стоимость типирования крови, а также сделало данную процедуру независимой от наличия реагентов, получаемых из крови доноров [19]. Многие производители медицинских препаратов и реагентов для клинических лабораторий по всему миру выпустили на рынок растворы моноклональных антител для типирования крови по системе АВ0 (см. табл. 1).

Таблица 1

Компании-изготовители препаратов моноклональных антител для типирования крови

Торговое название препарата	Фирма	Страна
BIOSCOT ® Blood Typing Monoclonal Reagents	Merck Millipore, Merck KGaA	Германия, США
ERYCLONE ®	TULIP DIAGNOSTICS (P) Ltd	Индия
Blood Group Antigen A — Concentrated ALBAclone ®	Antagene Inc. Alba Bioscience Inc.	США
ЭРИТРОТЕСТ™ — Цоликлоны	Гематолог Hematolog Ltd	Российская Федерация

Особенности применения СГАС в рамках акустооптического метода типирования крови рассматривались в работах В. А. Дубровского, М. Ф. Медведевой, С. О. Торбина [20, 21]. Можно предположить, что применение МКА для типирования крови акустооптическим методом потребует нахождения специфических по отношению к СГАС оптимальных условий, при которых разрешающая способность акустооптического метода определения группы крови максимальна.

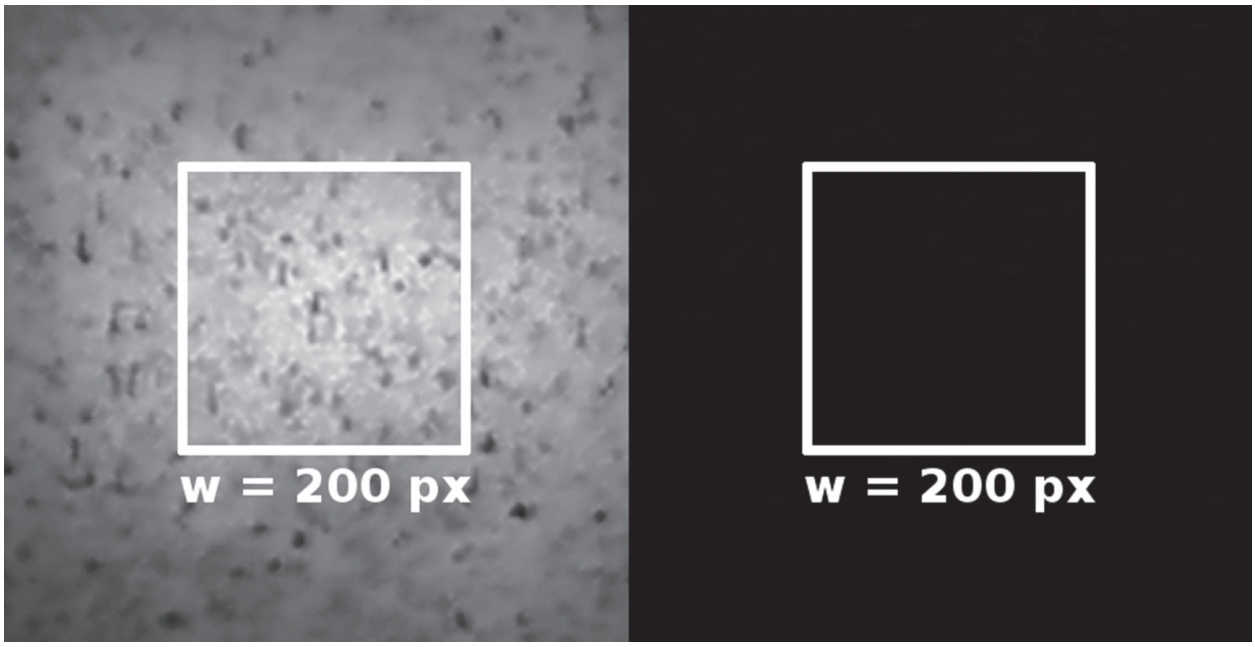
Цель: выявление особенностей применения растворов моноклональных антител для типирования крови в рамках акустооптического метода и сравнение полученных результатов с результатами ранее проведенных исследований, но с использованием стандартных гемагглютинирующих сывороток.

Материал и методы. Объект исследования: донорская кровь III (B) группы, стандартные гемагглютинирующие сыворотки II (A) и III (B), а также растворы анти-A и анти-B моноклональных антител (ЭРИТРОТЕСТ™ Цоликлоны). Донорская кровь подвергалась центрифугированию (3000 об/мин, 8 мин) и разделению на фракции: плазма и эритроцитарная масса. Далее приготавливались трехкомпонентные смеси, состоящие 1) из исследуемых эритроцитов, 2) стандартной сыворотки или раствора моноклональных антител, 3) физиологического раствора.

Для получения положительной реакции агглютинации эритроцитов использовалась стандартная сыворотка II (A) или раствор анти-B моноклональных антител, а для получения отрицательной реакции применялись: сыворотка III (B) и раствор анти-A моноклональных антител. В каждой серии экспериментов использовался один определенный образец крови. Всего проведено три серии экспериментов с наблюдением положительной и отрицательной реакций агглютинации. В каждой серии экспериментов варьировался один из трех параметров: концентрация сыворотки $C_{СГАС}$ или раствора моноклональных антител $C_{МКА}$, концентрация эритроцитов $C_{эритр}$, время УЗ-воздействия $t_{уз}$; при этом два других параметра оставались фиксированными.

Для первой серии экспериментов по нахождению оптимальных значений объемной концентрации стандартной сыворотки или раствора моноклональных антител во всех пробах объемная доля эритроцитарной массы оставалась неизменной и составляла 1,7% от общего объема пробы. Это значение выбрано на основе результатов, опубликованных в работе В. А. Дубровского, М. Ф. Медведевой [20]. Объемная концентрация СГАС и раствора МКА варьировалась в пределах 2÷85 (%). Отношение объемов «эритроцитарная масса: СГАС» и «эритроцитарная масса: раствор МКА» варьировалось от 1:1,25 до 1:50. Время УЗ-воздействия $t_{уз}$ варьировалось, а время инкубации образца составляло $t_{инк}$=1,5 мин.

Для второй серии экспериментов по нахождению оптимальных значений объемной концентрации эритроцитов $C_{эритр}$ объемные концентрации $C_{СГАС}$ и $C_{МКА}$ оставались неизменными для всей серии опытов и составляли 17%. Это значение выбрано в качестве оптимального по результатам работы В. А. Дубровского, М. Ф. Медведевой [20]. Отношение «эритроцитарная масса: стандартная сыворотка» и «эритроцитарная масса: раствор моноклональных антител» варьировалось от 1:8 до 1:45. Таким образом, объемная доля эритроцитарной массы варьировалась в пределах 0,4÷2,0%. Время УЗ-воздействия составляло 1,5 мин, время инкубации 1,5 мин.



а *б*

Рис. 1. Типичные фотографии засветки кюветы с исследуемой трёхкомпонентной смесью в зеленом канале RGB для: *(а)* положительной; *(б)* отрицательной реакций агглютинации эритроцитов. Показаны результаты взаимодействия образца крови III (B) группы с сыворотками II (A) и III (B) групп крови соответственно, объемная концентрация эритроцитов 1,25%. Прямоугольником выделены зоны статистической обработки экспериментальных результатов (w=200 пикселей)

Для третьей серии экспериментов по нахождению оптимального времени ультразвукового облучения биообъекта во всех пробах использовалось одно и то же разведение, выбранное по результатам, опубликованным в работе В.А. Дубровского, М.Ф. Медведевой [20]. В этом разведении соотношение объемов исследуемой эритроцитарной массы к сыворотке / раствору МКА составляло 1:15, при этом объемная концентрация эритроцитарной массы составляла 1,1%, а объемная доля стандартной агглютинирующей сыворотки 17%. В этих экспериментах время ультразвукового воздействия варьировалось от 10 с до 3 мин. Время инкубации всегда составляло 1,5 мин.

Сразу после приготовления смеси каждая проба подвергалась воздействию стоячей ультразвуковой волны. Кювета с исследуемой смесью располагалась на пьезопреобразователе, волна ориентировалась в вертикальном направлении. Объем кюветы составлял 3000 мкл, толщина зазора 5 мм. Для возбуждения пьезокерамического преобразователя использовался генератор Г3-112/1 с усилителем, а его выходное напряжение контролировалось осциллографом С1–79. Генератор настраивался резонансно по отношению к преобразователю v=2,25 МГц, а его выходное напряжение, подаваемое на пьезокерамику, не превышало 15 В, что обеспечивало ультразвуковое действие на эритроциты без их гемолиза.

Стоячая УЗ-волна приводит к группировке эритроцитов и их иммунных комплексов в области узлов [20], сближает эритроциты, увеличивает вероятность их взаимодействия и, как результат, ускоряет агглютинацию клеток в случае положительной реакции. Это в свою очередь увеличивает размеры образованных агглютинатов, а следовательно, ускоряет процесс их седиментации. Как результат, среда оптически довольно быстро просветлялась.

При отрицательной реакции агглютинации эритроциты также группируются в узлах стоячей УЗ-волны, однако в этом случае формируются «неспецифические» агрегаты, которые рассыпаются на отдельные (свободные) эритроциты при выключении ультразвука. Скорость оседания свободных эритроцитов значительно ниже, чем у агглютинатов, поэтому при отрицательной реакции эритроциты и мелкие их агрегаты оседали медленнее, среда длительное время оставалась мутной. Достигнутое различие в оптической плотности образцов с положительной и отрицательной реакциями агглютинации использовалось для определения группы крови.

Кювета зондировалась коллимированным излучением светодиода LXHL-G1S. Максимум спектра излучения светодиода приходится на длину волны λ=540 нм и, таким образом, соответствует спектру поглощения гемоглобина в зеленой области. Режим питания светодиода типа LXHL-G1S: напряжение 3 В, сила тока 0,3 А. Луч, прошедший исследуемый раствор, поступал на полихромную веб-камеру Logitech Quick Cam Orbit Sphere, подключенную к ПК. После инкубации образца кювета фотографировалась с помощью веб-камеры в формате JPG. Типичные фотографии засветки кюветы для положительной и отрицательной реакций агглютинации эритроцитов в зеленом канале RGB представлены на рис. 1.

В зеленом G (green) альфа-канале для каждого изображения рассчитывалось значение интегральной (суммарной) яркости изображения S по заданной квадратной области статистической обработки изображения шириной w (рис. 1). Значение S находилось путем сложения значений яркости всех пикселей, попавших в область статистической обработки w, яркость которых превышала или была равна заранее заданному пороговому значению яркости пикселя $B_{пор}$. Значение $B_{пор}$ оставалось фиксированным для всех экспериментов в пределах одной серии. Пиксели с яркостью меньше пороговой при суммировании отбрасывались. Подробнее этот подход изложен в работе В.А. Дубровского, М.Ф. Медведевой [22]. Для того чтобы можно было оценивать значения

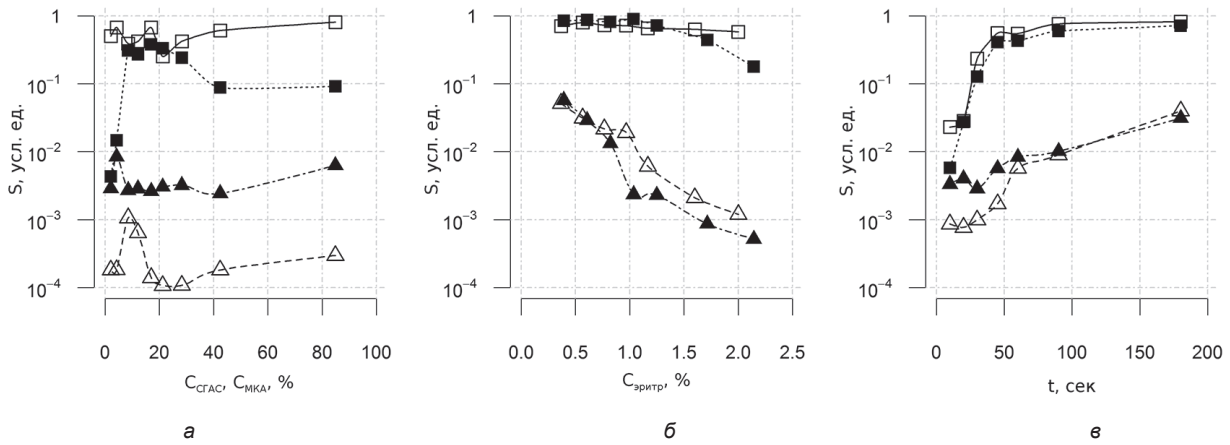


Рис. 2. Зависимость нормированной интегральной яркости для положительной S+ и отрицательной S- реакций агглютинации: а — от объемной доли стандартной сыворотки или раствора моноклональных антител; б — от объемной доли исследуемой эритроцитарной массы; в — от времени воздействия УЗ для найденного оптимального разведения реагентов: ■ — ■ — ■ — S+, стандартная сыворотка; ▲ — ▲ — ▲ — S-, стандартная сыворотка; □ — □ — □ — S+, моноклональные антитела; Δ — Δ — Δ — S-, моноклональные антитела

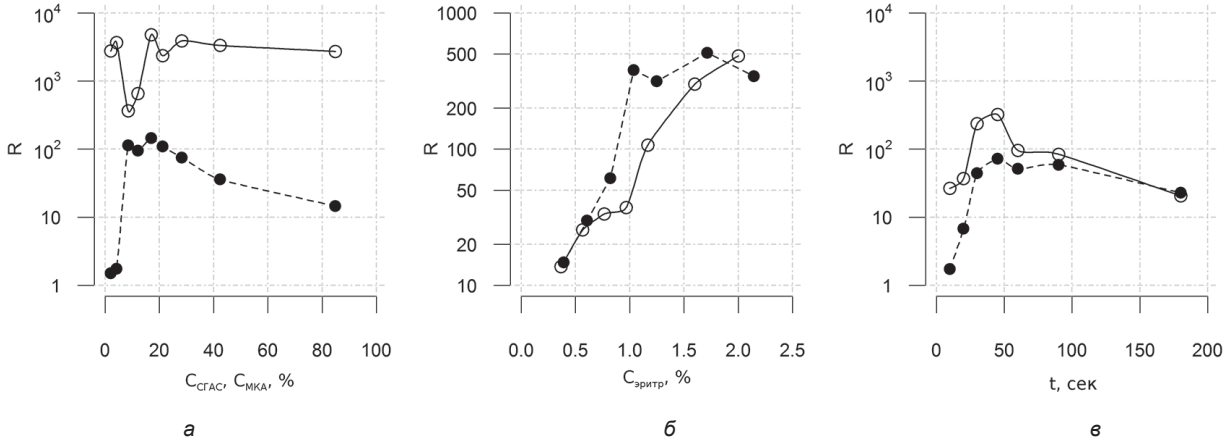


Рис. 3. Зависимость разрешения R: а — от объемной доли стандартной сыворотки или раствора моноклональных антител; б — от объемной доли исследуемой эритроцитарной массы; в — от времени воздействия УЗ для найденного оптимального разведения реагентов: ● — ● — ● — стандартная сыворотка; ○ — ○ — ○ — моноклональные антитела

интегральной яркости для фотоизображений с разным пространственным разрешением, интегральная яркость по области *w* делилась на величину максимально возможной интегральной яркости S_{max} по данной области. Эта величина находилась по формуле $S_{max}=w*w*B_{max}$, где *w* — ширина области статистической обработки, B_{max}=255 (максимальное значение яркости пикселя). Нормированная интегральная яркость *S* являлась мерой, которая отображала процессы, происходящие в биообъекте, при положительной или отрицательной реакции агглютинации для разных условий экспериментов.

По полученным значениям интегральной яркости для положительной S_+ и отрицательной S_- реакций агглютинации рассчитывалось значение разрешающей способности $R=S_+/S_-$ акустооптического метода в данной его реализации. Значение $B_{пор}$ подбиралось для каждой серии экспериментов отдельно таким образом, чтобы значение *R* было максимальным в данной серии экспериментов; оно оставалось одинаковым для всех проб данной серии [22].

Результаты. Результаты первой серии экспериментов по нахождению в исследуемой смеси оптимальной объемной концентрации стандартной агглютинирующей сыворотки или раствора моноклональных антител при постоянстве объемной концентрации эритроцитарной массы показаны на рис. 2*а*. Результаты второй серии экспериментов по нахождению оптимальной объемной концентрации эритроцитарной массы при фиксированных объемных концентрациях СГАС и раствора МКА показаны на рис. 2*б*. Результаты третьей серии экспериментов по определению оптимального времени действия ультразвука на исследуемый биообъект для найденных оптимальных значений объемных концентраций эритроцитарной массы, стандартной сыворотки или раствора моноклональных антител приводятся на рис. 2 в.

На рис. 3 приводятся найденные значения разрешающей способности $R=S_+/S_-$ акустооптического метода в данной его реализации для трех серий экспериментов.

Обсуждение. Введем некоторые обозначения: $S_{+'СГАС}$ и $S_{+'МКА}$ — интегральные яркости для положительных реакций агглютинации с участием реагентов СГАС и МКА соответственно; $S_{-'СГАС}$ и $S_{-МКА}$ — те же параметры для отрицательных реакций. Величины $R_{СГАС}$ и $R_{МКА}$ — разрешение акустооптического метода при

использовании стандартной гемагглютинирующей сыворотки и моноклональных антител соответственно.

Из рис. 2*а* (кривая 1) видно, что для СГАС имеется оптимальное значение концентрации сыворотки $C_{СГАС}$ в пределах 10÷30 (%), при котором интегральная яркость $S_{+,СГАС}$ максимальна. Заметим, что при таких концентрациях максимально и разрешение $R_{СГАС}$ (рис. 3*а*, кривая 1). В то же время при уменьшении концентрации сыворотки ($C_{СГАС}$<10%) величина $S_{+,СГАС}$ снижается. Это объясняется тем, что при сильном разведении сыворотки содержание агглютининов оказывается недостаточным для склеивания (агглютинации) максимально возможного числа эритроцитов, значительная их доля остается в свободном (не агглютинированном) состоянии. Свободные эритроциты и их малые по размерам агглютинаты седиментируют слабо, они находятся в состоянии левитации даже после выключения ультразвука. В результате среда просветляется незначительно, остается мутной, что снижает величину $S_{+,СГАС}$, а следовательно, и разрешение $R_{СГАС}$. При большой концентрации сыворотки в исследуемой взвеси ($C_{СГАС}$>30%) количество агглютининов оказывается слишком большим, а количество эритроцитов не адекватным столь высокой концентрации сыворотки. Поэтому агглютинаты по размерам малы, слабо седиментируют, что также снижает $S_{+,СГАС}$, следовательно, разрешение $R_{СГАС}$. Концентрация $C_{СГАС}$, лежащая в диапазоне 10÷30 (%), по-видимому, является оптимальной для заданного значения $C_{эритр}$, а область концентраций $C_{СГАС}$, в которой $S_{+,СГАС}$ (рис. 2*а*) и $R_{СГАС}$ (рис. 3*а*) имеют максимумы, напоминает известную в иммунологии «зону эквивалентности».

Растворы МКА показывают стабильно высокую агглютинационную способность, в том числе и в тех областях концентраций $C_{МКА}$ (рис. 2*а*, кривая 3 и рис. 3*а*, кривая 2), где для агглютинирующей сыворотки $S_{+,СГАС}$ (рис. 2*а*, кривая 1), а следовательно, и $R_{СГАС}$ (рис. 3*а*, кривая 1) снижались. Рис. 3*а* показывает, что значения интегральной яркости $S_{+,МКА}$ для раствора моноклональных антител в диапазоне концентраций $C_{МКА}$~10÷30 (%) оказались сопоставимыми с соответствующими значениями $S_{+,СГАС}$, полученными с применением стандартной сыворотки. При иных концентрациях $C_{МКА}$ величина $S_{+,МКА}$, а следовательно, и $R_{МКА}$ значительно превышают те же параметры для стандартной агглютинирующей сыворотки. Это можно объяснить тем, что в силу высокой иммунной активности МКА агглютинины (в 2,5 раза больше, чем стандартные сыворотки, согласно инструкции производителя) склеивают заданное количество эритроцитов во взвеси и формируют крупные агглютинаты практически при любой из рассмотренных концентраций моноклональных антител. Поэтому для растворов МКА трудно выделить какой-то оптимальный диапазон концентраций $C_{МКА}$. Из рис. 3*а* (кривая 2) видно, что разрешение метода $R_{МКА}$ почти во всех случаях оказалось на порядок большим, чем для стандартных сывороток. В то же время заметим, что при сопоставимых значениях $S_{+,СГАС}$ и $S_{+,МКА}$ в диапазоне объемных концентраций $C_{СГАС}$ или $C_{МКА}$, равных 10÷30 (%) (рис. 2*а*, кривые 1 и 3), существенное отличие в значениях $R_{СГАС}$ и $R_{МКА}$ (рис. 3*а*, кривые 1 и 2) объясняется тем, что для растворов моноклональных антител значения $S_{-,МКА}$ в экспериментах оказалось несколько ниже, чем соответствующие значения $S_{-,СГАС}$ для сывороток.

Из рис. 2*б* (кривая 1) видно, что при концентрациях эритроцитов $C_{эритр}$ свыше 1,5% величина $S_{+,СГАС}$ снижается. Это свидетельствует о том, что при чрезмерном количестве эритроцитов во взвеси заданное количество агглютининов недостаточно для формирования крупных эритроцитарных комплексов, значительное количество свободных эритроцитов и малых по размерам агглютинатов оказываются во взвешенном состоянии, среда слабо просветляется, а $S_{+,СГАС}$ уменьшается. В то же время интегральная яркость $S_{+,МКА}$ остается постоянной во всем интервале заданных концентраций эритроцитов, что свидетельствует о высокой иммунной активности моноклональных антител. При отрицательных реакциях (рис. 2*б*, кривые 3, 4) иммунные процессы отсутствуют, поэтому общая тенденция к снижению как $S_{-,СГАС}$, так и $S_{-,МКА}$, по нашему мнению, обусловлена явлением рассеяния света на эритроцитах. С увеличением концентрации эритроцитов изменяется характер светорассеяния, в частности изменяется индикатриса светорассеяния, рассеяние становится многократным, что в целом приводит к снижению S_-. Из рис. 2*б* видно, что вплоть до концентраций $C_{эритр}$≈1,5% поведение интегральных яркостей $S_{-,СГАС}$ и $S_{-,МКА}$ идентично. Это легко понять, потому что при концентрациях $C_{эритр}$≤1,5% светорассеяние можно полагать близким к однократному: расстояние между рассеивающими центрами (эритроцитами), как минимум, превышает размер эритроцита в несколько раз. При этом, как часто делают в теории рассеяния света Ми, эритроцит аппроксимируют эквивалентным шаром с объемом, равным объему эритроцита (диаметр такого шара ~5,6 мкм). Так как кратность светорассеяния при заданной толщине кюветы зависит от концентрации эритроцитов, но практически не зависит от характера раствора антител, то интегральные яркости для сыворотки и моноклональных антител практически совпадают: $S_{-,СГАС}$≈$S_{-,МКА}$. Однако из рис. 2*б* (кривые 2 и 4) видна еще одна закономерность: при $C_{эритр}$≥1,5% кривая 2 для сыворотки идет ниже кривой 4 для моноклональных антител. Это обусловлено тем, что увеличение кратности светорассеяния приводит к увеличению поглощения света средой, содержащей рассеивающие центры. Поэтому увеличение $C_{эритр}$ приводит к снижению коэффициента пропускания света раствором сыворотки, а следовательно, к снижению $S_{-,СГАС}$ по сравнению с $S_{-,МКА}$. Заметим: 1) раствор моноклональных антител более прозрачный по сравнению с раствором сыворотки; 2) влияние окрашенности сыворотки на акустооптический метод регистрации реакции агглютинации рассмотрен в [23].

Зависимость величины разрешения *R* (рис. 3*б*) основана на результатах, представленных на рис. 2*б*. Поэтому в этой серии экспериментов для большинства проб разрешение $R_{СГАС}$ оказалось выше, чем $R_{МКА}$. Легко видеть, что для стандартной сыворотки оптимальными разведениями эритроцитарной массы являются $C_{эритр}$~1÷2 (%), в то время как для раствора моноклональных антител оптимальное значение $C_{эритр}$ составляет от 1,5 (%) и выше. Последнее указывает на то, что для получения стабильной положительной реакции агглютинации представляется возможным существенно уменьшить допустимую концентрацию моноклональных антител. Это согласуется со сведениями, предоставленными производителем.

Из рис. 2*в* видно, что значения интегральной яркости для обоих типов реагентов при положительной реакции (рис. 2*в*, кривые 1 и 3) практически одинаковы. Поэтому различие в разрешении $R_{СГАС}$ и $R_{МКА}$ (рис. 3*в*) можно объяснить отличием $S_{-,СГАС}$ от $S_{-,МКА}$

при длительностях УЗ-действия на взвесь $t_{уз}$≤50 с. Из рис. 3*в* видно, что оптимальные значения времени воздействия ультразвуком лежат в интервале от 30 до 100 с как для стандартной сыворотки, так и для раствора моноклональных антител. Дальнейшее увеличение времени УЗ-действия не приводит к росту разрешения *R*, так как при больших временах $t_{уз}$ эритроциты в узлах стоячей УЗ-волны образуют сравнительно прочные агрегаты даже в случае отсутствия агглютинации. При выключении ультразвука эти агрегаты седиментируют, среда просветляется, величины $S_{-,СГАС}$ и $S_{-,МКА}$ повышаются (рис. 2*в*, кривые 2 и 4) и, как следствие, разрешение *R* для обоих реагентов снижается (рис. 3*в*).

Сводная таблица (табл. 2) демонстрирует оптимальные режимы акустооптического метода регистрации агглютинации эритроцитов для стандартной сыворотки и раствора моноклональных антител.

Таблица 2

Оптимальные условия регистрации агглютинации эритроцитов с помощью акустооптического метода типирования крови по система АВ0 для стандартных гемагглютинирующих сывороток и растворов моноклональных антител

Параметр	СГАС	МКА
$t_{уз}$	30÷100 с	30÷100 с
$t_{инк}$	90 с	90 с
$C_{эритр}$	1÷2 (%)	>1,5 (%)
$C_{СГАС}$, $C_{МКА}$	10÷40 (%)	2÷85 (%)

Из рис. 2 и рис. 3 можно видеть, что максимальное значение разрешения *R* при оптимальных условиях варьируется в очень широких пределах, от 500 (рис. 3*б*) до 5000 (рис. 3*а*). Это объясняется следующим образом. Для большинства фотоизображений отрицательной реакции агглютинации в области статистической обработки *w* яркость пикселей составляла не более 2–3 единиц яркости (рис. 1*б*). На этом уровне даже небольшие изменения S_- согласно формуле для разрешения $R=S_+/S_-$ приводят к существенным изменениям величины *R*. Для вариаций значений яркости пикселей, а следовательно, интегральной яркости S_- могут служить следующие причины:

– колебания содержания гемоглобина в образцах крови разных доноров;

– колебания концентрации эритроцитов в образцах после центрифугирования исследуемой крови;

– нестабильность мощности ультразвука и времени УЗ-воздействия на образец;

– особенности процесса регистрации фотоизображений; артефакты, возникающие при снятии сигнала с CMOS-матрицы фотоэлементов веб-камеры и при дальнейшей цифровой обработке фотографии, ее сжатии по алгоритму JPG.

В то же время следует отметить, что акустооптический метод в сочетании с цифровой обработкой фотоизображений в режиме их попиксельного анализа создает довольно большой запас в величине разрешающей способности. Это указывает на принципиальную возможность надежного определения групповой принадлежности образца крови.

Заключение. Эксперименты, проведенные в рамках акустооптического метода типирования крови, позволяют сделать следующие выводы:

1. Показано, что акустооптический метод типирования крови в сочетании с цифровой попиксельной обработкой фотоизображений дает значительный запас в величине разрешения в случае применения как стандартных сывороток, так и моноклональных антител, что может обеспечить надежное определение группы крови.

2. Продемонстрирована большая иммунная активность моноклональных антител по сравнению со стандартными изогемагглютинирующими сыворотками. Растворы моноклональных антител показывают в большинстве случаев более высокие значения интегральной яркости фотоизображений для положительной реакции, а следовательно, величин разрешающей способности метода.

3. Показано, что при регистрации реакции агглютинации фотоцифровым образом оптимальные условия для раствора моноклональных антител не всегда совпадают с подобными условиями для стандартной сыворотки.

4. Большая прозрачность растворов моноклональных антител по сравнению со стандартной агглютинирующей сывороткой снижает уровень искажения результатов измерений, вызванного влиянием окрашенности раствора реагента.

5. Использование раствора моноклональных антител в рамках акустооптического метода делает возможным применение более широкого диапазона объемных концентраций компонентов исследуемой смеси. Это позволяет увеличить количество эритроцитарной массы в исследуемой пробе и получить более крупные агглютинаты, более сильную их седиментацию и, следовательно, большую величину разрешения *R*, то есть более высокую надежность типирования крови.

Анализ и сопоставление двух типов реагентов для типирования крови является дальнейшим этапом в разработке акустооптического метода определения групповой принадлежности крови.

Конфликт интересов не заявляется.

Авторский вклад: концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов, написание статьи — В.А. Дубровский, М.Ф. Медведева; получение и обработка данных — М.Ф. Медведева; утверждение рукописи для публикации — В.А. Дубровский.

References (Литература)

1. Doubrovski VA, Dolmashkin AA. Blood group typing based on digital imaging of sedimentation of erythrocytes and their agglutinates. Biomedical Engineering 2012; (2): 24–30. Russian (Дубровский В.А., Долмашкин А.А. Определение группы крови на основе цифровых фотографий седиментации эритроцитов и их агглютинатов, усиленной ультразвуком. Медицинская техника 2012; (2): 24–30)

2. Vyas GN, et al. Simultaneous human ABO and Rh (D) blood typing or antibody screening by flow cytometry: United States Patent 5,776,711 July 7, 1998.

3. Sturgeon P. Automation: its introduction to the field of blood group serology. Immunohematology 2001; 17 (4): 100–105.

4. Kline TR, Runyon MK, Pothiawala M, Ismagilov RF. ABO, D blood yyping and subtyping using plug-based microfluidics. Anal Chem 2008; 80 (16): 6190–6197.

5. Muranyi I, et al. Blood typing apparatus: United States Patent 4533638, US Patent Issued on August 6, 1985.

6. Steven RA. A simplified visible/near-infrared spectrophotometric approach to blood typing for automated transfusion safety: Thesis. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA, 2005.

7. Lambert JB. A miniaturized device for blood typing using a simplified spectrophotometric approach: Thesis. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA, 2006.

8. Moncharmont P, Plantier A, Chirat V, et al. ABO and Rh (D) blood typing on the PK 7200 with ready-to-use kits. Immunohematology 2003; 19 (2): 54–56.

9. Goldfinger D, et al. Portable blood typing apparatus and method: United States Patent 4650662, US Patent Issued on March 17, 1987.

10. Battrell CF, et al. Microfluidic apparatus and methods for performing blood typing and crossmatching: United States Patent, Patent application number: 20100112723. Publication date: 05/06/2010.

11. Alipov AN, Vaninskii VZ, Denisov LB, Donskov SI, Doubrovskii VA, Zavyalov EN, Knyazkov NN. The method for determining the agglutination reaction. Certificate USSR, №1683760 with priority from 04 June 1987. Published in Bul. №38 on 30 Oct 1991 (Алипов А.Н., Ванинский В.З., Денисов Л.Б., Донсков С. И., Дубровский В.А., Завьялов Э.Н., Князьков Н.Н. Способ определения реакции агглютинации: Авторское свидетельство изобретения. №1683760, приоритет от 04.06.1987. Опубл.: Бюл. №38 от 30.10.1991).

12. Doubrovski VA, Dvoretski KN. Ultrasonic wave action upon the red blood cell agglutination in vitro. Ultrasound in Medicine & Biology 2000; 26 (4): 655. [Дубровский В.А., Дворецкий К.Н. Воздействие ультразвуковых волн на агглютинацию эритроцитов in vitro].

13. Doubrovski VA, Dvoretskii KN, Balaev AE. Mechanism of erythrocyte aggregation enhancement by ultrasonic field. J Acoustical Physics 2004; 50 (2): 146–155. [Дубровский В.А., Дворецкий К.Н., Балаев А.Э. Исследование механизма усиления агрегации эритроцитов ультразвуковым полем. Акустический журнал 2004; 50 (2): 184–192].

14. Ganilova YuA, Doubrovski VA, Zabenkov IV. R and G color components competition of RGB image decomposition as a criterion to register RBC agglutinates for blood group typing. J Biomed Opt 2014; 19 (3): 036012. [Ганилова Ю.А., Дубровский В.А., Забенков И.В. Конкуренция цветовых R- и G-компонент RGB-разложения изображения микрофотографий как критерий для регистрации агглютинатов эритроцитов при определении групп крови].

15. Doubrovski VA, Ganilova YuA, Zabenkov IV. Application of a spectrally filtered probing light beam and RGB decomposition of microphotographs for flow registration of ultrasonically enhanced agglutination of erythrocytes. Optics and Spectroscopy 2013; 115 (2): 218–227. (Дубровский В.А., Ганилова Ю.А., Забенков И.В. Применение спектрально фильтрованного зондирующего светового луча и RGB-разложения микрофотографий для проточной регистрации агглютинации эритроцитов, усиленной ультразвуком. Оптика и спектроскопия 2013; 115 (2): 255–65).

16. Doubrovski VA, Dolmashkin AA. Human blood group typing based on digital photographs of RBC agglutination process. Optics and Spectroscopy 2010; 109 (2): 263–267. (Дубровский В.А., Долмашкин А.А. Определение групповой принадлежности крови человека на основе цифровых фотографий процесса агглютинации эритроцитов. Оптика и спектроскопия 2010; 109 (2): 1346–50).

17. Doubrovski VA, Dolmashkin AA, Zabenkov IV. Blood group typing based on recording the elastic scattering using the method of digital imaging. Quantum Electronics 2012; 42 (5): 409–16. Russian (Дубровский В.А., Долмашкин А.А., Забенков И.В. Определение группы крови на основе регистрации упругого рассеяния лазерного излучения методом цифровой фотографии Квантовая электроника 2012; 42 (5): 409–16).

18. Doubrovski VA, Zabenkov IV, Torbin SO. Blood group typing in the AB0 system using digital microscopy. Biomedical Engineering 2013; 47 (3): 126–129. (В.А. Дубровский, И.В. Забенков., С. О. Торбин. Определение группы крови человека по системе АВ0 методом цифровой микроскопии. Медицинская техника 2013; 47 (3): 14–17).

19. Marks L. Monoclonal antibodies and the transformation of blood typing. mAbs 2014; 6 (6): 1362–1367.

20. Doubrovski VA, Medvedeva MF. Optimization of conditions for the forward and reverse reactions of RBC agglutination, enhanced by a standing ultrasonic wave. In: Tuchin VV, Simonenko GV, eds. Problems of optical physics and biophotonics (SFM-2013). Saratov: Novy veter, 2013; p. 34–42. Russian (Дубровский В.А., Медведева М.Ф. Оптимизация условий прямой и обратной реакций агглютинации эритроцитов, усиленных стоячей ультразвуковой волной. В сб.: Проблемы оптической физики и биофотоники: SFM-2013: материалы 17 — й Междунар. молодежной науч. школы по оптике, лазерной физике и биофотонике / под ред. Г.В. Симоненко, В.В. Тучина. Саратов: Новый ветер, 2013; с. 34–42).

21. Doubrovski VA, Medvedeva MF, Torbin SO, Dvoretski KN. Visualization of red blood cells grouping in vitro by standing ultrasonic wave. In: Tuchin VV, Simonenko GV, eds. Problems of optical physics and biophotonics (SFM-2014). Saratov: Novy veter, 2014; p. 20–28. Russian (Дубровский В.А., Медведева М.Ф., Торбин С. О., Дворецкий К.Н. Визуализация группировки эритроцитов in vitro стоячей ультразвуковой волной. В сб.: Проблемы оптической физики и биофотоники: SFM-2014: материалы 18-й Междунар. молодежной науч. школы по оптике, лазерной физике и биофотонике / под ред. Г.В. Симоненко, В.В. Тучина. Саратов: Новый ветер, 2014; с. 20–28).

22. Doubrovski VA, Medvedeva MF. Acousto-optical method of blood typing (Part 1). Photometric and statistical methods for image processing. Biomedical Engineering 2016; (1): 10–14. (Дубровский В.А., Медведева М.Ф. Акустооптический метод определения группы крови: фотометрический и статистический способы обработки фотоизображений. Медицинская техника 2016; (1): 7–10).

23. Doubrovski VA, Medvedeva MF, Torbin SO. An acousto-optical method for registration of erythrocytes' agglutination reaction: sera color influence on the resolving power. Optics and Spectroscopy 2016; 120 (1): 58–64. (Дубровский В.А., Медведева М.Ф., Торбин С. О. Акустооптический метод регистрации реакции агглютинации эритроцитов: влияние окрашенности сывороток на разрешающую способность метода. Оптика и спектроскопия 2016; 120 (1): 64–70).