

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

На правах рукописи



Марков Сергей Валерьевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ПРИНЦИПОВ
АКУСТООПТИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ КРОВИ
ЧЕЛОВЕКА ПО СИСТЕМЕ АВ0**

1.5.2 – Биофизика

**Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук**

Научный руководитель:
к. ф.-м. н., доцент, Дубровский В. А.

Саратов – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА КРОВИ.....	11
1.1 Эритроцитарные ассоциаты. Группы крови по системе АВ0	11
1.2 Некоторые современные методы и аппаратура для анализа крови	14
1.2.1 Методы типирования крови	16
1.2.2 СОЭ. Методы определения СОЭ	20
1.3 Выводы	21
ГЛАВА 2. АКУСТООПТИЧЕСКИЙ МЕТОД (АОМ) ОПРЕДЕЛЕНИЯ	
ГРУППОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА.....	22
2.1 Основы акустооптического метода типирования крови	22
2.2 Пример экспериментального определения группы крови образца на	
основе АОМ.....	24
2.3 Понятие разрешающей способности АОМ	28
2.4 Выводы	29
ГЛАВА 3. КОЛЛЕКТИВНЫЙ ПОДХОД К ОПИСАНИЮ	
ОДНОВРЕМЕННОГО ДВИЖЕНИЯ АНСАМБЛЯ ЭРИТРОЦИТОВ.....	31
3.1 Экспериментальное исследование седиментации эритроцитов и их	
агрегатов	35
3.2 Экспериментальное исследование седиментации агглютинатов	43
3.3 Теоретические модели седиментации крови	48
3.3.1 Модель коллективной седиментации эритроцитов.....	50
3.3.2 Модель коллективной седиментации агрегатов.....	56
3.4 Механические модели коллективной седиментации крови	72
3.4.1 Механическая модель седиментации эритроцитарного ассоциата	72
3.4.2 Механическая модель седиментации слоя крови.....	86
3.5 Выводы	98
ГЛАВА 4. ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА ОБРАЗЦЫ КРОВИ	100

4.1	Экспериментальное исследование влияния ультразвука на процесс группировки эритроцитов.....	100	
4.2	Теоретическое моделирование процесса группировки эритроцитов в поле УЗ стоячей волны на основе принципа коллективного процесса.....	117	
4.3	Выводы	128	
ГЛАВА 5. ЦИФРОВЫЕ СПОСОБЫ ОБРАБОТКИ			
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ АОМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ			
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА			130
5.1	Фотометрический подход	130	
5.2	Статистические способы анализа.....	132	
5.2.1	Дисперсионный анализ.....	134	
5.2.2	Распределение количества пикселей по яркости	135	
5.2.3	Расчёт суммарной яркости пикселей	137	
5.2.4	Определение средней плотности распределения пикселей по их яркости.....	138	
5.3	Обсуждение результатов: влияние различных цифровых способов обработки на величину разрешающей способности АОМ	140	
5.4	Выводы	144	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ			146
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....			149
ПРИЛОЖЕНИЕ.....			159

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Определение групповой принадлежности крови человека по системе *ABO* является одним из наиболее часто проводимых иммунологических тестов [1, 2]. Естественно, столь высокая частота проведения такого рода тестов требует создания специальной аппаратуры, автоматических анализаторов для инструментального определения группы крови [3 – 10].

Ключевой характеристикой таких приборов является разрешающая способность. Этот параметр определяется авторами ряда работ по-разному. Так, в работах [5, 6] разрешение рассчитывается через степень отличия тангенсов углов наклона спектральных кривых соответственно для положительной и отрицательной реакций агглютинации в определённом диапазоне длин волн. Работы [7, 8, 9] посвящены совершенствованию данного спектрофотометрического метода. Стоит отметить, что в [5, 6] используется понятие порогового значения разрешения. Однако, достигнутые в этих работах значения разрешения не велики – увеличение разрешающей способности метода типирования крови и реализующих его приборов по сей день является актуальной задачей. Здесь стоит учесть особенность трансфузионной практики – ошибка при определении группы крови донора и реципиента должна быть полностью исключена. В работах [10, 11] за величину разрешения принято отношение величин оптических сигналов, так же соответствующих положительной и отрицательной реакции агглютинации.

Для повышения величины разрешения и, как следствие, достоверности результата при типировании крови в приборах может быть применено ультразвуковое воздействие на образцы. В работе [12] было экспериментально продемонстрировано значительное отличие в скорости седиментации для образцов с положительной и отрицательной реакцией агглютинации при воздействии на них ультразвуком. Из этого следует, что к определённому

моменту времени среда образца с положительной реакцией станет практически полностью прозрачной, а среда другого образца, с отрицательной реакцией, останется мутной. По измерениям определённых оптических величин судят о наличии реакции агглютинации, а затем на основе полученных результатов судят о групповой принадлежности всей пробы. Впервые такая методика была представлена в аналоговом виде в работе [10] и подробно описана в [13]. В [5, 14] было впервые предложено использовать цифровую камеру для регистрации результатов и, как следствие, применять программные способы для их обработки.

Стоит заметить, что рассматриваемая в рамках настоящей работы версия АОМ типирования крови позволяет получать достаточно высокие значения разрешающей способности, что в свою очередь говорит о достоверности результатов. Для сравнения в первых работах, посвященных АОМ [10, 11] данная величина имела значения в диапазоне от единиц до нескольких десятков. С развитием метода его разрешение увеличилось до сотен и тысяч [12]. Это позволяет не только повысить достоверность определения групповой принадлежности пробы крови, но и делать это в случаях проб со слабой агглютинацией.

Помимо разработки методов типирования крови по системе АВ0, существуют работы, посвященные исследованиям реологических характеристик крови с использованием методик, близких к тем, что используются в седиментационном АОМ. Например, исследования сотрудников МГУ им. М. В. Ломоносова [15, 16], которые связаны с использованием оптоакустического пинцета для определения ряда параметров при агрегации эритроцитов.

В связи с вышесказанным, **целью** настоящей диссертационной работы является исследование и моделирование процессов, протекающих в образцах крови при использовании седиментационного АОМ типирования крови, а также в разработке и определении оптимального цифрового способа обработки результатов, дающего наибольшее значение разрешения.

Задачи, решаемые в работе:

- Исследование процесса седиментации свободных эритроцитов, их агрегатов и агглютинатов, при условии наличия гемагглютинирующих агентов в образцах;
- Теоретическая и экспериментальная демонстрация того, что процесс седиментации крови является коллективным процессом;
- Разработка механической модели седиментации слоя крови;
- Теоретическое и экспериментальное исследование влияния ультразвуковой стоячей волны на протекание седиментации крови;
- Создание экспериментальной установки, позволяющей производить определение групповой принадлежности исследуемого образца крови;
- Создание ряда программных способов обработки экспериментальных данных, целью которых является повышение разрешающей способности АОМ.

Научные результаты и положения, выносимые на защиту:

1. Модели, созданные в рамках настоящей работы и использующие предложенный впервые принцип коллективного оседания эритроцитов в форме монослоёв, адекватно описывают седиментацию крови.
2. Метод описания коллективной седиментации клеток может быть распространён и на случай движения, группировки ансамбля эритроцитов и их ассоциатов под действием ультразвуковой стоячей волны.
3. Предложен и разработан ряд программных способов обработки экспериментальных результатов, с помощью которых в рамках условий настоящей работы возможно достижение значений разрешающей способности АОМ вплоть до $10^4 - 2,5 \times 10^6$.

Научная новизна и практическая значимость работы:

- Исследованы процессы протекающие в образцах крови при их использовании в акустооптическом методе определения группы крови человека;

- Разработаны и экспериментально апробированы механическая и теоретические модели, описывающие седиментацию и группировку под действием УЗ эритроцитов и их агрегатов как коллективные процессы;
- Разработаны и опробованы программные способы обработки экспериментальных данных, значительно повышающие разрешающую способность всего АОМ, повышая точность определения группы крови в сложных ситуациях. Максимальное значение разрешающей способности, которое было получено в рамках настоящей работы составило $2,5 \times 10^6$.

Апробация работы:

Материалы, изложенные в диссертации, докладывались на следующих конференциях и симпозиумах:

1. Оптическая цифровая регистрация седиментации эритроцитов и ее моделирование в форме коллективного процесса Дубровский В.А., Дворецкий К.Н., Марков С.В. – SFM-2017
2. Регистрация седиментации эритроцитов и ее моделирование в форме коллективного процесса Дубровский В.А., Дворецкий К.Н., Марков С.В. – Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине –2017.
3. Registration and modeling of the sedimentation process of erythrocytes and their aggregates in vitro, Дубровский В.А., Марков С.В., Дворецкий К.Н., Карпочева Е. П. –SFM-2018.
4. Ultrasonic standing wave action upon the sedimentation process of human erythrocytes, Дубровский В.А., Марков С.В., Торбин С. О., Карпочева Е. П. – SFM-2018.
5. Влияние эффекта агрегации на процесс седиментации эритроцитов в растворах крови человека Дубровский В.А., Марков С.В., Дворецкий К.Н., Карпочева Е. П. –Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине – 2018.

6. Red blood cells and their aggregates sedimentation mechanical model - experiment and mathematical description of the process, Дубровский В.А., Марков С.В., Ковалев Д.Г. – SFM-2019.
7. The process of erythrocytes grouping by ultrasound standing wave, Дубровский В.А., Марков С.В., Торбин С. О. – SFM-2020;
8. Acousto-optical human blood typing method. Experimental data processing, Дубровский В.А., Марков С.В. – SFM-2021.

По материалам диссертации опубликовано 9 работ в отечественных и зарубежных изданиях.

Публикации в изданиях из перечня ВАК:

1. Оптическая цифровая регистрация седиментации эритроцитов и ее моделирование в форме коллективного процесса, В.А. Дубровский ИК.Н. Дворецкий, **С.В. Марков**, Е.П. Карпочева, В.В. Тучин // Оптика и спектроскопия, 2019, том 126, вып. 5, С 678 – 689;
2. Экспериментальное и математическое моделирование седиментации эритроцитов донорской крови в форме коллективного процесса, В. А. Дубровский, **С. В. Марков**, Д. Г. Ковалёв // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2021. Т. 21, вып. 2. С. 165–177;
3. The Sedimentation Rate of Free Erythrocytes and Their Associates, the Influence of a Standing Ultrasonic Wave, Valeri A. Doubrovski, **Sergey V. Markov**, Stanislav O. Torbin, Elena P. Karpocheva // Journal of Biomedical Photonics & Engineering, 2021, том 7, выпуск 4;
4. Влияние способов обработки экспериментальных результатов на разрешающую способность акустооптического метода определения группы крови человека, В. А. Дубровский, **С. В. Марков** // Оптика и спектроскопия, 2022, том 130, вып. 6, С 906–917;

Публикации в других изданиях:

5. Оптическая цифровая регистрация седиментации эритроцитов и ее моделирование в форме коллективного процесса" Дубровский В.А., Дворецкий К.Н., **Марков С.В.** // Проблемы оптической физики и биофотоники. SFM-2017
6. Регистрация седиментации эритроцитов и ее моделирование в форме коллективного процесса Дубровский В.А., Дворецкий К.Н., **Марков С.В.** // Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине – 2017: Материалы Всероссийской школы-семинара.
7. Регистрация и моделирование процесса седиментации эритроцитов и их агрегатов in vitro Дубровский В.А., **Марков С.В.**, Дворецкий К.Н., Карпочева Е. П. // Проблемы оптической физики и биофотоники. SFM-2018.
8. Влияние эффекта агрегации на процесс седиментации эритроцитов в растворах крови человека Дубровский В.А., **Марков С.В.**, Дворецкий К.Н., Карпочева Е. П. // Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине – 2018: Сборник статей Всероссийской школы-семинара.
9. Механическая модель седиментации эритроцитов и их агрегатов – экспериментальное и математическое описание процесса Дубровский В.А., **Марков С.В.**, Ковалев Д.Г. // Проблемы оптической физики и биофотоники. SFM-2019.

Диссертация состоит из введения, основной части, содержащей пять глав, заключения и списка цитируемой литературы.

Первая глава посвящена обзору основных гематологических понятий, связанных с эритроцитами крови человека, а также современных методов и аппаратуры для типирования крови человека и определения СОЭ.

Вторая глава описывает основные характеристики и принцип работы АОМ типирования крови, его преимущества, а также результаты, получаемые с помощью данного метода.

В третьей главе описывается принцип коллективного подхода, используемый для построения моделей процессов в рамках настоящей работы. Изложены основные результаты исследования седиментации крови:

седиментация эритроцитов, эритроцитарных агрегатов, агглютинатов. Также представлены математические и механические модели данного процесса. Проведено сравнение экспериментальных результатов с результатом моделирования.

В четвёртой главе речь идёт о действии УЗ на образцы крови. Исследуется процесс группировки эритроцитов в поле стоячей УЗ волны в случаях наличия и отсутствия в образце гемагглютинирующих агентов (цоликлонов). Приводится описание математической модели группировки, а также сравнение результатов моделирования и эксперимента.

Пятая глава посвящена описанию разработанных в рамках настоящей работы цифровых и статистических способов обработки данных, полученных с помощью АОМ и изучению влияния выбора того или иного способа на разрешающую способность всего метода в целом.

В заключении кратко перечислены основные результаты и выводы настоящей работы, а также указаны перспективные направления исследования по тематике диссертации.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА КРОВИ.

Согласно данным ВОЗ (Всемирной Организации Здравоохранения) в настоящее время по всему миру проводятся огромное количество различных видов анализов крови ежедневно: как общих (ОАК), так и более специфичных (для определения групповой принадлежности или выявления какого-либо патологического процесса) [2]. Настоящая работа посвящена исследованию физических процессов, которые протекают в образцах крови при их анализе *in vitro*. В частности, речь пойдёт о процессах, связанных с эритроцитами. Это обусловлено двумя фактами:

- 1) Эритроциты являются самыми многочисленными из всех форменных элементов крови человека, следовательно, в значительной мере влияют на свойства крови;
- 2) Наличие специфичных антигенов на поверхности эритроцитов определяет групповую принадлежность крови.

1.1 Эритроцитарные ассоциаты. Группы крови по системе АВ0

В процессах, протекающих во время исследования образцов крови, важную роль играют эритроцитарные ассоциаты: агрегаты и агглютинаты. Первые влияют на седиментацию крови, а наличие вторых в образце является неким идентификатором протекания реакции агглютинации и, как следствие, несёт информацию о групповой принадлежности пробы крови.

Агрегация эритроцитов представляет собой обратимое взаимодействие клеток, приводящее к их временному совместному передвижению. Этот комплексный процесс характеризуется скоростью образования агрегатов, их размером, морфологией и прочностью [17]. Взаимодействие двух эритроцитов может протекать как "наползание" одной клетки на другую или как "схлопывание" их поверхностей после частичного контакта [18]. Вовлечение в процесс агрегации новых клеток приводит к формированию "монетных столбиков", являющихся структурной основой более сложных трехмерных

образований, *in vitro* напоминающих сеть [19, 20]. Время агрегации, оценивают достаточно большими величинами, наблюдая за этим процессом в пробе крови в течение ~ 200 – 300 с [21]. По данным вискозиметрических исследований, период формирования агрегатов эритроцитов человека составляет 1 – 20 с [22].

Дезагрегация нормальных эритроцитов происходит относительно легко в результате взаимного скольжения поверхностей клеток в противоположные стороны [23].

Агглютинация эритроцитов представляет собой иной вид взаимодействия клеток, который обусловлен их хаотичным "склеиванием". В отличие от агрегации, этот процесс необратим и является результатом положительного исхода реакции агглютинации *in vitro* с участием соответствующих агентов. Понятие естественной агглютинации эритроцитов в гематологии сравнивают, а зачастую путают, с патологической агрегацией, так как комплексы клеток в обоих случаях обладают некоторыми схожими морфологическими параметрами.

Главным отличием этих процессов является понятие обратимости. При агглютинации, как было сказано выше, наблюдается "склеивание" клеток, в процессе которого эритроциты в большинстве случаев разрушаются, а сам комплекс представляет собой аморфное образование.

Группа крови – генетически обусловленный иммунологический признак крови, который исходя из его сходств и различий у разных индивидов, позволяет подразделять людей на разные группы [24]. Самой распространённой системой классификации групп крови человека на данный момент является система АВ0 открытая в 1940 году Карлом Ландштейнером. Согласно данной системе кровь человека можно разделить на четыре группы по наличию в плазме и в мембранах эритроцитов специфических молекул белков: антител и антигенов соответственно. В таблице 1.1 представлено распределение этих молекул в соответствии с групповой принадлежностью крови.

В плазме крови человека могут содержаться антитела *анти-А* и *анти-В* (α , β агглютинины), а на поверхности эритроцитов – антигены А и В, причём из

белков *A* и *анти-A* содержится только один, то же самое – для белков *B* и *анти-B*. При переливании в случае содержания в крови одновременно антител *анти-A* в плазме крови и эритроцитов с антигенами *A* происходит агглютинация эритроцитов, то же происходит при наличии антигенов *B* и антител *анти-B*. На этом принципе основана реакция агглютинации при определении группы крови [25].

Таблица 1.1

Распределение антигенов и антител в соответствии с группой крови

Группа крови	0(I)	A(II)	B(III)	AB(IV)
Антитела в плазме	α и β агглютинины	β агглютинины	α агглютинины	отсутствуют
Антиген эритроцитов	отсутствуют	A агглютиноген	B агглютиноген	A и B агглютиноген

В современной практике для определения групп крови применяются цоликлоны – растворы моноклональных антител к антигенам, расположенным на поверхности эритроцитов человека. Существует большое количество цоликлонов к разным антигенам, которые предназначены для определения групп крови по различным системам. Наиболее часто для определения группы крови по системе АВ0 используются цоликлоны *анти-A*, *анти-B* и *анти-AB* [26].

Определение групповой принадлежности производится в нативной крови, взятой в консервант; в крови, взятой без консерванта; в крови, взятой из пальца. Используется метод прямой гемагглютинации на плоскости: на пластине или планшете. Процедура производится в помещении с хорошим освещением при температуре 15 – 25 °С. Смешивают кровь и цоликлоны, после чего наблюдают за ходом реакции, слегка покачивая пластинку (планшет) в течении 3 минут [26].

Положительный результат выражается в появлении агглютинатов. Они заметны невооруженным глазом в виде мелких красных сгустков, быстро сливающихся в более крупные хлопья. При отрицательной реакции агглютинаты не обнаруживаются [26]. В таблице 1.2 приведены данные о групповой

принадлежности крови образца в зависимости от результата реакции агглютинации.

Таблица 1.2

Исход реакции агглютинации в зависимости от группы крови и цоликлона

Тип реакции агглютинации		Группа крови образца
<i>анти-А</i>	<i>анти-В</i>	
–	–	0(I)
+	–	A(II)
–	+	B(III)
+	+	AB(IV)

1.2 Некоторые современные методы и аппаратура для анализа крови

Как было упомянуто ранее, в современной гематологической практике применяются достаточно сложные приборы, которые способны определять различные параметры крови. На примере анализаторов фирмы Sysmex рассмотрим некоторые параметры крови, которые возможно получить с их помощью.

Автоматический Гематологический Анализатор Sysmex XP-300 представляет собой компактный прибор с простым управлением. Выбрав соответствующие настройки для каждой процедуры, пользователь может привести прибор в соответствие со своими потребностями или существующими условиями лаборатории. Выполнение анализа возможно, как в режиме анализа цельной крови, так и в режиме предварительного разбавления. Благодаря этому анализатор XP-300 также можно использовать с небольшим объемом крови (минимальный требуемый объем 20 мкл) [27].

Перечень параметров, определяемых с помощью данного анализатора: WBC (число лейкоцитов), RBC (число эритроцитов), PLT (число тромбоцитов), HGB (гемоглобин), HCT (показатель гематокрита), MCV (средний объем эритроцитов), MCH (среднее содержание гемоглобина в эритроцитах), MCHC (средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах), RDW-SD (ширина распределения эритроцитов – SD), RDW-CV (ширина распределения

эритроцитов – CV), PDW (Ширина распределения тромбоцитов), MPV (средний объем тромбоцитов), P-LCR (процент больших тромбоцитов), PCT (тромбокрит), а также ряд параметров, связанных с лейкоцитами. Для примера также приведём данные о точности измерения некоторых базовых параметров: WBC $\pm 3\%$ или $\pm 0,2 \times 10^3/\text{мкл}$; RBC $\pm 2\%$ или $\pm 0,03 \times 10^6/\text{мкл}$; PLT $\pm 5\%$ или $\pm 10 \times 10^3/\text{мкл}$ [27].

Автоматический Гематологический Анализатор Sysmex XN-1000 представляет собой анализатор, работающий по принципу подсчета компонентов крови, предназначенный для диагностики *in vitro* и пригодный для массового обследования пациентов в клинических лабораториях. Прибор позволяет выполнять количественный анализ, идентификацию, определять уровень присутствия компонентов и отмечать имеющиеся в заметных количествах компоненты крови и биологических жидкостей (эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и других клеток) посредством измерения электрического импеданса, рассеяния света лазера и связывания с красителем.

В основном режиме анализатор способен помимо базовых определять до 36 параметров, связанных с количеством, средним размером и распределением клеток крови. В режиме анализа биологической жидкости прибор способен подсчитывать абсолютное и относительное количество мононуклеарных и полиморфноядерных клеток крови. В третьем режиме, как следует из его названия, реализуется подсчёт гематопоэтических клеток-предшественников [28].

Безусловно, к плюсам данных приборов относится количество и точность измеряемых и счётных (статистических) параметров, но есть и существенный минус – высокая стоимость и сложность в эксплуатации. Поэтому такими анализаторами оснащают в основном крупные медицинские центры.

Зачастую на практике нет необходимости определять все параметры крови из вышеперечисленных, поэтому для более специфичных исследований существуют различные установки узкого спектра применения. Они дешевле и проще в работе, так как принципиально, на уровне разработки, нацелены на

определение какого-либо конкретного параметра образца крови и, в некоторых случаях, расчётных величин, которые связаны с данным параметром. Рассмотрим далее несколько примеров таких приборов.

1.2.1 Методы типирования крови

Как было упомянуто во введении данной работы, определение группы крови по системе *ABO* является одним из наиболее часто используемых тестов лабораторной диагностики. Чрезвычайно высокая частотность проведения подобных тестов требует создания специальной аппаратуры [3 – 10].

Тенденцией в данной области анализа крови человека является стремление создать метод, который бы требовал минимум затрат со стороны пробоподготовки и являлся быстрым, более точным, наглядным и простым по сравнению с методами, используемыми в настоящее время. Одним из них является метод, описанный в работе [29]. Она описывает метод типирования крови, основанный на использовании специфических "умных" микрокювет. Сам же метод основан на анализе света, который проходит через микрокювету с исследуемым раствором: кровь, сыворотка, изотонический раствор. По анализу спектра светового пучка, прошедшего через образец, определяют произошла ли реакция агглютинации. Приведённое в работе значение различия между двумя показателями ≈ 16 раз является достаточно достоверным критерием для детектирования реакции агглютинации. Точность данного метода заключается в том, что наличие агглютинатов в образце определяется не человеком, а посредством спектрального анализа света. В то же время в методе есть и небольшие недостатки, а именно: использование специфических кювет и использование спектрометра. Это, безусловно, делает метод точнее, но, в то же время, менее универсальным.

Ещё один достойный внимания метод типирования крови описан в работе [30]. Принцип данного метода довольно прост: для типирования образца используют так называемые "*paper-based blood typing device*" – специальные волокнистые листы бумаги. Эритроцитарные агглютинаты застревают в

волокон бумаги и локализуются в месте нанесения образца и агента, способствующего их образованию, в то время как свободные эритроциты растекаются и достаточно равномерно распределяются внутри листа. Главными достоинствами здесь являются простота, наглядность и точность. Но, как и в других методах, есть недостатки, в данном случае – это пробоподготовка. Для проведения эксперимента типирования крови требуется подготовить лист бумаги – нанести на него специальный раствор, а также подготовить образец для анализа. Здесь используется не цельная кровь, как в методе, описанном выше, а эритроцитарная масса, подготовленная определённым образом. Этот недостаток негативно сказывается на универсальности и времени проведения всего анализа целиком.

Работа [31] является продолжением предыдущей работы. В ней проводится сравнение двух методов типирования крови, связанных с использованием специальной бумаги: метод элюции (описанный в предыдущей статье [30]) и проточный метод. В ходе исследования проводились не только эксперименты по определению групповой принадлежности крови, но и по наличию в образце других антител. В результатах работы авторами подчёркивается то, что методы типирования крови с использованием бумаги являются перспективными за счёт своей простоты, наглядности и дешевизны. Но вместе с тем и указывают на то, что не все антитела достаточно хорошо реагируют, чтобы их наличие в образце можно было зарегистрировать.

Метод исследования крови, описанный в следующей работе [32] является прообразом АОМ с точки зрения оптической части регистрации наличия агглютинатов в исследуемом образце. В его основе лежит сравнение зелёной и красной компонент цифровых изображений, полученных в результате проведения микроскопии слоя крови, облучаемого двумя источниками света с длинами волн 540 нм (зелёный свет) и 640 нм (красный свет). Стоит также отметить, что в работе [32] применяется микроскопический подход, а в настоящей работе – седиментационный. Такой выбор авторами обусловлен

рассеянием и поглощением излучения кровью. В ходе исследования были проведены эксперименты с различными сочетаниями компонентов в образцах: цельная кровь, физиологический раствор, агглютинирующие сыворотки. Дополнительно на образцы воздействовали УЗ волнами. На полученных после микроскопии цифровых изображениях отчётливо видны различия между образцами (рис. 1.1). В данной работе также реализуется программный метод определения присутствия агглютинатов на изображении (рис. 1.2).

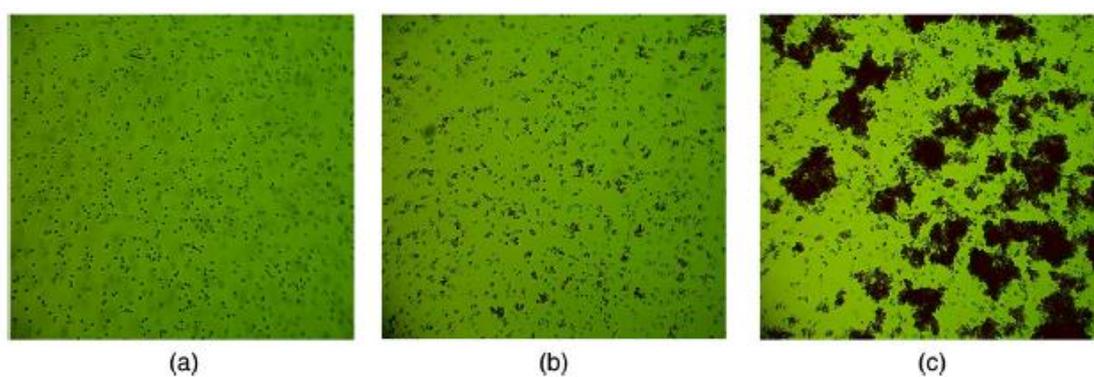


Рисунок 1.1. Цифровые изображения образцов.

a) отрицательная реакция – эритроциты равномерно распределены по объёму; b) положительная реакция – эритроциты собраны в комплексы (агглютинаты); c) положительная реакция и УЗ воздействие – агглютинаты особо крупных размеров.

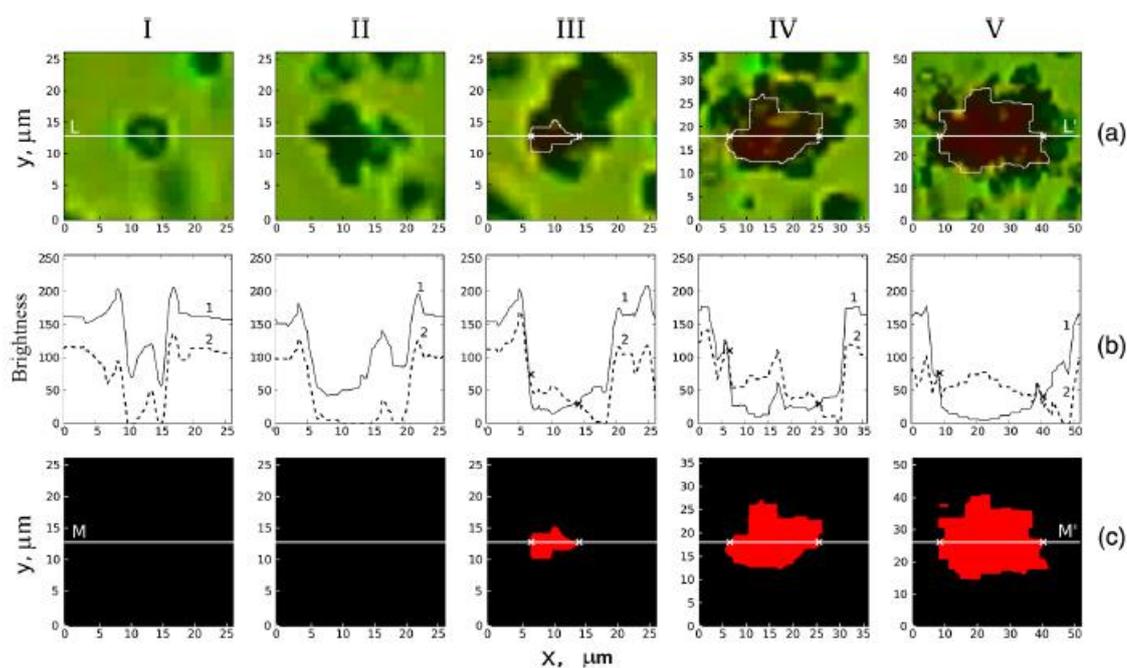


Рисунок 1.2. Порядок анализа изображений.

- a) изображения эритроцита (I) и эритроцитарных комплексов (II - V);
 б) графики интенсивности света, выходящего из образца: 1 - зелёная компонента, 2 - красная; в) бинаризованные изображения.

В работе [33] наличие агглютинатов в образце крови определяют с помощью проточной цитометрии. Работа [34] в основном посвящена другому методу анализа: цифровой микрофотографии. Используя программные методы обработки цифровых снимков, авторы не только определяют присутствие агглютинатов, но и показывают возможность определения их параметров.

Исследование факторов, способствующих увеличению разрешающей способности фотометрического метода регистрации агглютинации эритроцитов *in vitro* проводились в [35]. В работе использовались фотометрический и нефелометрический методы, поэтому понятие разрешающей способности было определено как отношение величин фототока для положительного и отрицательного результата реакции агглютинации в образце. Авторами было показано увеличение этой величины при варьировании некоторыми параметрами образца на этапе пробоподготовки, а также параметрами внешнего воздействия на образец и временем наблюдения.

1.2.2 СОЭ. Методы определения СОЭ

Схожая тенденция (упрощение и универсальность) присутствует и в разработке методов для определения СОЭ. В частности, в работе [36] описывается более быстрый способ определения данного параметра – *micro-ESR method*. Его главным отличием от классических методов является использование капиллярных трубок и капиллярной крови, что исключает венепункцию. В работе показано, что микро-метод даёт удовлетворительные результаты за время почти втрое меньшее, чем традиционный. Данный метод представляется более приемлемым для проведения анализа СОЭ в экстренных ситуациях, за счёт малого, по сравнению с традиционным методом, времени проведения. Но, как отмечают авторы, данный метод имеет некоторые погрешности.

Работа [37] посвящена созданию двухмерной модели седиментации эритроцитов, а также описанию прямой связи процессов агрегации и седиментации. Приведённая модель описывает зависимость количества эритроцитарных комплексов от концентрации эритроцитов в образце и от времени наблюдения (рис. 1.3).

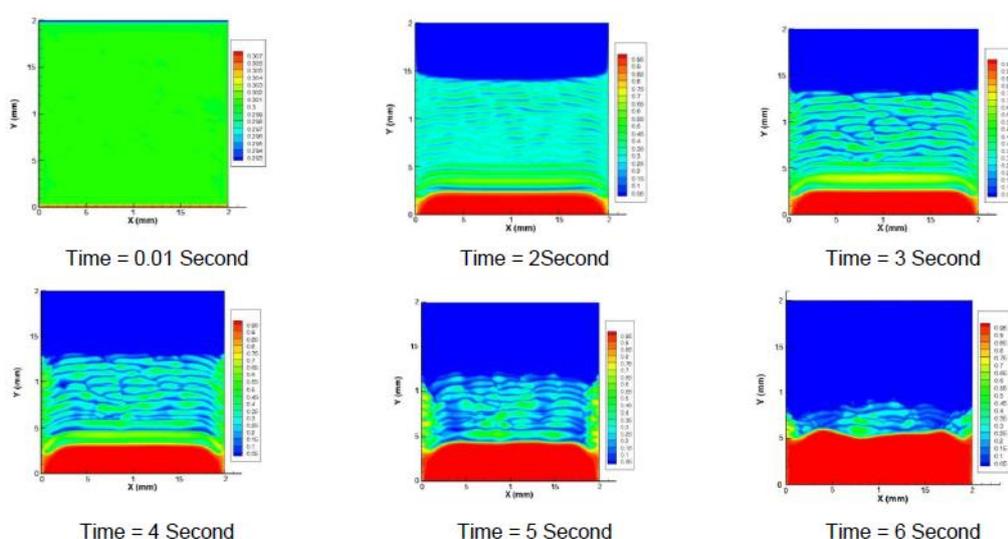


Рисунок 1.3. Иллюстрация модели. Зависимость количества и размеров эритроцитарных агрегатов от времени наблюдения.

1.3 Выводы

Данная глава является вводным материалом для всей диссертационной работы в целом. В ней были рассмотрены и описаны основные параметры, характеристики и термины, относящиеся к теме, интересующей авторов настоящей работы в области биологии, биофизики и гематологии.

Также были рассмотрены биологические процессы, лежащие в основе седиментационного АОМ типирования крови: агрегация и агглютинация эритроцитов. Было показано, что естественная агрегация является обратимым процессом, происходящим с эритроцитами в кровяном русле достаточно часто и обусловлен взаимодействием, объединением, близко перемещающихся клеток. Показано также, что процесс агглютинации, хоть и так же имеет результатом образование эритроцитарных комплексов, принципиально отличается от агрегации. Реакция агглютинации используется для типирования крови человека, а сам процесс происходит *in vitro* при наличии специальных агентов – сывороток или моноклональных антител.

Помимо этого, был приведён обзор работ других авторов, имеющих схожую тематику научной деятельности, а именно исследование методов определения СОЭ и типирования крови человека, что является дополнительным пунктом, отвечающим за актуальность работы. В обзоре были приведены работы как зарубежных, так и российских авторов. Была показана тенденция развития методов исследования крови – универсальность, простота обслуживания аппаратуры и пробоподготовки, снижение стоимости лабораторных установок и реагентов. Но наиболее важной особенностью данных работ являлось нивелирование ошибок, связанных с человеческим фактором, то есть автоматизация интерпретации результата эксперимента. Эта особенность прослеживалась как в работах, посвящённых определению СОЭ, так и в работах по методам типирования крови.

ГЛАВА 2. АКУСТООПТИЧЕСКИЙ МЕТОД (АОМ) ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

В первой главе был приведён обзор различных приборов для типирования крови. Разрешающая способность R является одной из наиболее важных характеристик для приборов такого рода. В зависимости от принципиального устройства этот параметр может определяться по-разному. В работах [5, 6] за разрешение было взято соотношение тангенсов угла наклона спектральных кривых для положительной и отрицательной реакции агглютинации.

Среди приборов для инструментального определения групповой принадлежности пробы крови стоит отметить [38], а также развитие подходов к конструированию подобных систем на основе проточной цитометрии [39, 40].

Одним из способов повышения разрешающей способности является использование седиментационного акустооптического метода типирования крови человека.

2.1 Основы акустооптического метода типирования крови

В основе седиментационного АОМ типирования крови лежат несколько явлений:

- Группировка клеток крови под УЗ воздействием;
- Агглютинация эритроцитов;
- Седиментация одиночных эритроцитов/агрегатов/агглютинатов;
- Просветление образца.

На этапе пробоподготовки путём смешивания в кювете цельной донорской крови, физиологического раствора и цоликлона в пропорциях, соответствующих текущим условиям эксперимента, создаётся исследуемый образец, который помещается на лабораторную установку. Во время ультразвукового воздействия в кювете с образцом крови возникает стоячая волна, в узлах которой происходит группировка эритроцитов. За счёт группировки происходит "принудительное" перемещение эритроцитов в области с их повышенной концентрацией и

последующее локальное уплотнение эритроцитарной массы. При этом в любом случае будут образовываться клеточные ассоциаты: агрегаты при отрицательной реакции и агглютинаты при положительной реакции агглютинации. После отключения УЗ в первом случае наблюдается дезагрегация: клеточные комплексы на короткое время сохраняются, что приводит к локальному по времени ускорению седиментации, но после их разрушения эритроциты вновь равномерно распределяются по образцу и продолжают медленно оседать. Во втором случае формирование клеточных комплексов происходит настолько интенсивно, что некоторые, крайне крупные, агглютинаты начинают оседать до отключения УЗ воздействия. Это обусловлено тем, что их размеры много превышают размеры зоны группировки (расстояние равное четверти длины волны по обе стороны от узла), а радиационная сила стоячей волны оказывается не способна удержать настолько массивные объекты. При отключении УЗ происходит быстрое оседание менее крупных агглютинатов, что в итоге приводит к достаточно скорому просветлению образца. Разница в седиментации агрегатов и агглютинатов при УЗ воздействии была экспериментально показана в [12]. Скорости оседания отличались на несколько порядков. С учётом вышесказанного можно сделать вывод о том, что при положительной реакции среда образца станет практически полностью прозрачной к какому-то моменту времени, отсчитываемому от начала эксперимента. К тому же моменту времени образец, в котором не произошло реакции агглютинации, будет непрозрачным, мутным, из-за взвеси эритроцитов. Измерения некоторых оптических параметров будут показывать исход реакции агглютинации. Именно этот принцип используется для установления групповой принадлежности в АОМ.

Стоит отметить, что данный метод принципиально позволяет получать достоверно высокие значения разрешающей способности. Для сравнения, в первых работах, касающихся разработки АОМ [10, 11], величины разрешающей способности составляли значения от единиц до нескольких десятков. С развитием метода и применением различных способов оптической регистрации

в [12] значения разрешения выросли то сотен и тысяч. Такое увеличение разрешающей способности позволило повысить достоверность АОМ для образцов крови не только с нормальной, но и со слабой агглютинационной способностью.

2.2 Пример экспериментального определения группы крови образца на основе АОМ

Разберём подробно пример проведения эксперимента по определению группы крови с использованием АОМ.

Первым этапом является пробоподготовка. Объекты исследования – пробы донорской крови. Для типирования одной пробы изготавливались три образца:

1. Цельная кровь + цоликлон *анти-А* + физиологический раствор;
2. Цельная кровь + цоликлон *анти-В* + физиологический раствор;
3. Цельная кровь + физиологический раствор;

В экспериментах использовались кюветы размером $5 \times 18 \times 32$ мм³. Объём каждого образца составлял 2500 мкл. Содержание крови во всех исследуемых образцах – 2% от общего объёма. Соотношение объёмов компонент:

для образцов (1 и 2): цельная кровь: цоликлон: физиологический раствор = $1:10:36 = 2:20:78$ (%) = $50:500:1950$ (мкл);

для «чистого» образца (3): цельная кровь: физиологический раствор = $1:49 = 2:98$ (%) = $50:2450$ (мкл).

Образец 3 служил в качестве опорного, так как здесь принципиально, на этапе пробоподготовки, исключается возможность реакции агглютинации эритроцитов в силу отсутствия в образце цоликлонов. Эта особенность делает его референтным для двух других. Сами же эксперименты для всех трёх образцов были идентичными (время наблюдения, длительность и параметры УЗ воздействия). Сравнивая результаты реакции агглютинации в образцах 1 и 2 с образцом 3, в котором она априори отсутствовала, то есть он являлся аналогом отрицательной реакции агглютинации, можно с большей уверенностью судить о групповой принадлежности исследуемой пробы крови. Наличие системы из

трёх, а не из двух образцов, является важным отличием этой работы от других, связанных с типированием крови.

Пробоподготовка проходила следующим образом. Для всех образцов в кювете смешивались в нужных объёмах цельная кровь и физиологический раствор. Для образца 3 на этом пробоподготовка заканчивалась. Для образцов 1 и 2, в силу своей высокой агглютинирующей активности, добавление цоликлонов и перемешивание всей взвеси происходило непосредственно перед началом эксперимента, когда образец находится на стенде экспериментальной установки.

Второй этап эксперимента – регистрация группировки, агрегации/агглютинации эритроцитов и их последующей седиментации, то есть запись цифровых видеороликов процессов, происходящих в образцах. Для проведения данного этапа использовалась установка, показанная на рисунке 2.1а.

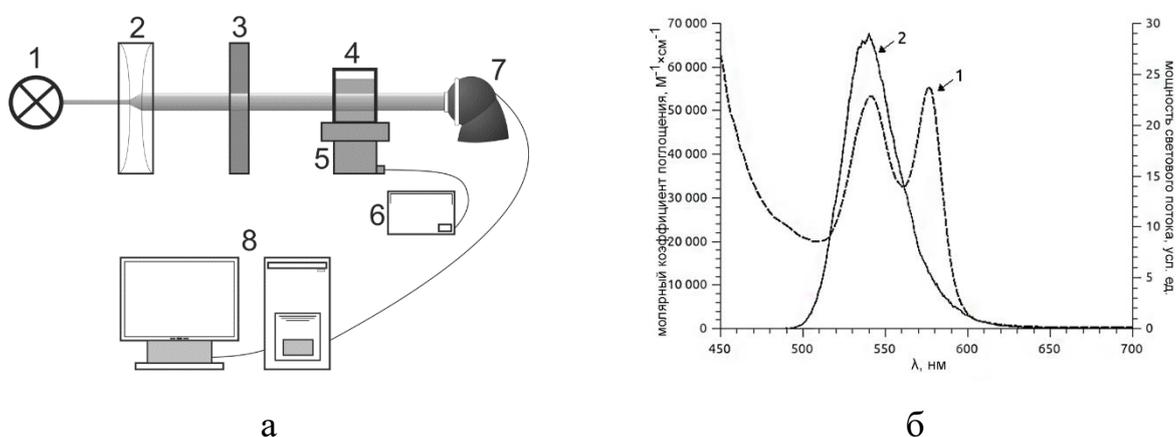


Рисунок 2.1. а) Схема экспериментальной установки АОМ типирования крови. 1 – светодиод, 2 – конденсор, 3 – нейтральный светофильтр, 4 – кювета с образцом, 5 – ультразвуковой преобразователь, 6 – генератор, 7 – 8-разрядная цифровая камера, 8 – компьютер.
б) Спектры: 1 – поглощение гемоглобина (левая ось ординат); 2 – излучение светодиода (правая ось ординат).

Кювета с исследуемым образцом (4) располагалась на пьезопреобразователе (5). За счёт такого расположения УЗ вола была

ориентирована вертикально. Для создания УЗ колебаний в пьезопреобразователе использовался генератор ГЗ-112/1 с усилителем (6), выходное напряжение которого контролировалось осциллографом С1-79. Перед проведением эксперимента производилась настройка генератора на резонансную частоту по отношению к пьезопреобразователю $f = 2,25$ МГц. Также устанавливалось напряжение, которое подавалось на пьезопреобразователь. Оно не превышало 15 В, что позволяло оказывать УЗ воздействие без разрушения эритроцитов.

Образец зондировался коллимированным, за счёт конденсора (2) и светофильтра (3), излучением светодиода типа *LXHL-GIS* (1) с максимумом мощности потока излучения на длине волны $\lambda = 540$ нм (зелёный свет). Спектр излучения светодиода соответствует спектру поглощения гемоглобина (рис. 2.1 б). Такой выбор спектра зондирующего излучения был сделан с целью повышения контрастности регистрируемого изображения.

После прохождения через образец световой поток попадал на матрицу полихромной web-камеры *Logitech Quick Cam* (7), которая регистрировала протекание эксперимента с частотой 15 кадров в секунду.

Регистрация начиналась сразу после перемешивания образца. Спустя 10 секунд образец подвергался воздействию УЗ волны на протяжении 50 секунд. Длительность видеороликов составляла примерно 2 минуты. Этого времени было достаточно для того, чтобы в образцах с положительной реакцией агглютинации наступало практически полное просветление, или, иными словами, седиментация претерпевала "насыщение".

Полученные видеоролики подвергались дальнейшей цифровой обработке на компьютере (8): первый шаг – разложение на кадры с временным интервалом в 1 секунду; второй шаг – выделение на каждом кадре из трёх – красной, зелёной и синей (*Red Green Blue, RGB*) – только одной, зелёной компоненты (обусловлено спектральными особенностями зондирующего излучения и поглощения гемоглобина); третий шаг – применение программных способов анализа к

полученным массивам данных с целью расчёта разрешения и, как следствие, определения групповой принадлежности данной пробы крови.

Промежуточным результатом данных экспериментов, подлежащему дальнейшей компьютерной обработке, являются цифровые изображения (кадры) процесса седиментации (рис. 2.2).

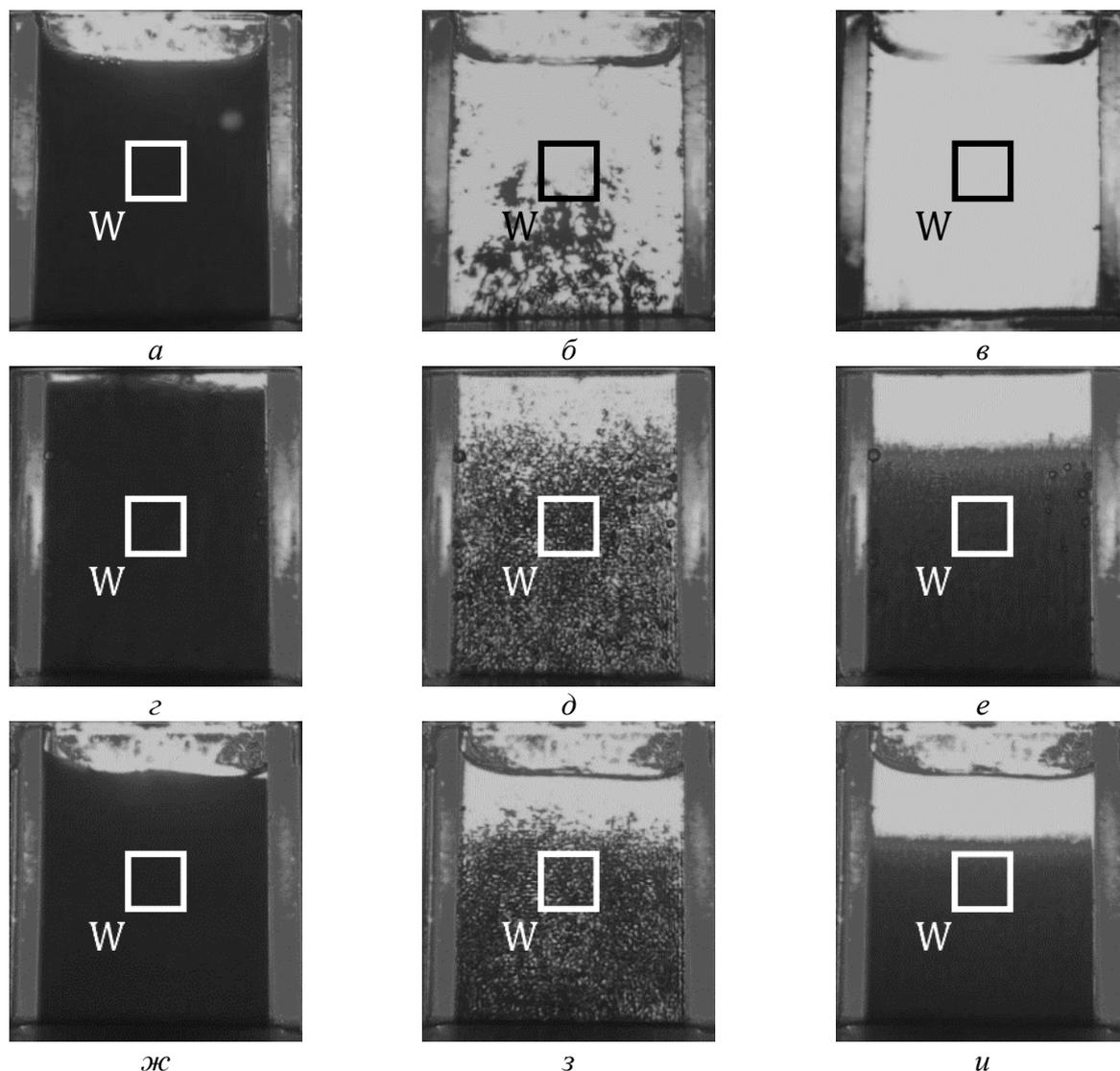


Рисунок 2.2. Примеры исследуемых цифровых изображений: а, б, в - положительная реакция агглютинации; г, д, е - отрицательная реакция агглютинации; ж, з, и – «чистый» образец. W – зона обработки изображений.

Изображения на рисунке 2.2 соответствуют следующим временным отметкам:

а, г, ж – непосредственно перед включением УЗ;

б, д, з – сразу после выключения УЗ;

в, е, и – спустя 1 минуту после отключения УЗ.

Здесь нетрудно заметить, что изображения $\delta - \varepsilon$ и $e - u$ попарно подобны. Первая пара (δ, ε) демонстрирует формирование эритроцитарных агрегатов, вторая (e, u) – дезагрегацию, распад комплексов на отдельные свободные эритроциты или на более мелкие агрегаты. В этом случае взвесь становится вновь непрозрачной, а изображения (e, u) почти идентичными. В случае положительной реакции агглютинации происходит следующее: при выключении УЗ сформированные крупные агглютинаты, которые обладали достаточно малой массой и размерами, чтобы удерживаться стоячей волной, быстро седиментируют (δ), а сам образец претерпевает значительное просветление (ε). Выделенная зона интереса W показывает участок цифровой обработки кадров, её размер составляет 100×100 пикселей. Расположение данной зоны было определено именно таким образом, чтобы исключить влияние следующих факторов на результат обработки: краевые эффекты у стенок кюветы; накопление эритроцитарной массы на дне кюветы и неоднородность взвеси в районе мениска в верхней части. Все эти явления в той или иной степени могут происходить в рамках эксперимента независимо от состава образца.

Как итог, по величине коэффициента пропускания образца (метод фотометрии) или по величине яркости цифрового изображения можно определить в какой из кювет произошла реакция агглютинации. Основываясь на результатах эксперимента и результатах обработки данных, при условии, что нам известен состав образца для каждого случая, можно сделать вывод о групповой принадлежности исследуемой пробы крови в соответствии с данными, представленными в таблице 1.2.

2.3 Понятие разрешающей способности АОМ

В зависимости от выбора способа обработки экспериментальных данных, за разрешающую способность метода может браться соотношение различных расчётных величин. Общий принцип для всех этих способов – это сравнение полученных величин для образцов с цоликлонами, в которых потенциально

может протекать реакция агглютинации, с теми же величинами для "чистого" образца. Таким образом происходит нивелирование неопределённости в случаях одновременного отсутствия или наличия агглютинатов в двух других образцах, когда группа крови пробы 0(I) или АВ(IV) соответственно. Благодаря такому подходу, АОМ имеет не одно значение разрешающей способности, а два. Далее, для определения в каком(их) образцах произошла реакция агглютинации, достаточно сравнить эти два значения.

Разберём такой подход на условном примере. Пусть после цифровой обработки и анализа один из способов имеет как результат некую величину K , связанную со степенью просветления образца. Данная величина была определена для всех трёх образцов, то есть мы имеем следующий набор: K_A , K_B и K_0 . Где K_A и K_B – величины, относящиеся к образцам, содержащим цоликлоны *анти-А* и *анти-В* соответственно, а K_0 относится к "чистому" образцу. Для определения разрешения производится расчёт отношения этих величин следующим образом: $R_A = K_A/K_0$; $R_B = K_B/K_0$. Так как в данном примере величина K относится к просветлению, то для образца, в котором прошла реакция агглютинации, данная величина численно будет больше, чем в образце без реакции и в "чистом" образце: $K_+ > K_-$; $K_+ > K_0$. В другом случае, если реакция агглютинации не произошла, то величина K_- численно будет близка к величине K_0 . Из вышесказанного следует, что при отсутствии реакции агглютинации, величина разрешения будет на уровне единицы, а в случае с наличием реакции агглютинации в образце – эта величина будет много больше единицы. По значениям R_A и R_B судят о наличии реакции агглютинации, а затем, в соответствии с Таблицей 1.2, определяют группу крови исследуемой пробы.

2.4 Выводы

Подводя итоги главы стоит отметить некоторые особенности АОМ. Одной из главных особенностей здесь является простота интерпретации результатов, так как она, если можно так выразиться, привычна для современной практики. Это связано с тем, что используются те же самые гемагглютинирующие агенты

– цоликлоны. Принципиальное отличие АОМ от традиционного метода типирования крови – цифровой анализ результатов эксперимента. Здесь заключаются сразу две особенности: автоматизация обработки данных и высокое значение разрешающей способности. То есть точность и достоверность АОМ выше. При обработке и анализе данных в рамках настоящей работы при использовании статистических способов обработки достигалось значение разрешения порядка 2.5×10^6 . Ещё одной немаловажной особенностью можно считать действие стоячей УЗ волной на образцы. Такое специфическое воздействие выступает в роли своеобразного катализатора реакции агглютинации: при совпадении группы крови образца и цоликлона происходит индуцированный процесс слипания эритроцитов вблизи узлов стоячей волны. При этом увеличивается как скорость образования клеточных комплексов, так и их размеры, что приводит в свою очередь к резкой седиментации и просветлению образца.

Все вышеперечисленные особенности в совокупности являются основой для АОМ, позволяя определять групповую принадлежность проб крови с высоким уровнем достоверности. Каждая особенность будет рассмотрена более подробно в последующих главах настоящей диссертационной работы.

ГЛАВА 3. КОЛЛЕКТИВНЫЙ ПОДХОД К ОПИСАНИЮ ОДНОВРЕМЕННОГО ДВИЖЕНИЯ АНСАМБЛЯ ЭРИТРОЦИТОВ

В рамках настоящей работы основным явлением, лежащим в основе АОМ типирования крови, является седиментация эритроцитов и их ассоциатов. Это обусловлено двумя факторами:

По количеству (или концентрации) эритроциты намного превосходят все остальные клетки крови. Это не утверждение того, что только лишь эритроциты имеют большее значение в составе крови для нормального функционирования человеческого организма, а показатель того, что за этими клетками можно наблюдать, не прибегая к использованию микроскопического оборудования, если рассматривать их с точки зрения единой структуры, сети.

В то же время, в рамках настоящей работы целью является подробное описание принципов на которых основывается метод определения групповой принадлежности крови по системе *ABO*, что определяется исключительно свойствами эритроцитов.

В данной главе настоящей диссертационной работы будут рассмотрены результаты экспериментальных исследований седиментации крови, а также представленных теоретических (математических) и механических моделей этого процесса.

Расслоение крови на клеточную и плазменную составляющие было обнаружено в 1894 году Эдмундом Биернаки [41], польским врачом, который в своих работах также связывал скорость расслоения с некоторыми типами заболеваний. Через несколько десятилетий, после того как Альфом Вестергреном в 1921 году был предложен способ измерения скорости седиментации [42], данное явление нашло своё применение в медицинской практике. С того времени, уже на протяжении более 100 лет, анализ скорости оседания эритроцитов (СОЭ) входит в число традиционных для лабораторной диагностики [43]. Параметр скорость оседания или, как будет также часто

упоминаясь в настоящей работе, скорость седиментации эритроцитов – параметр, показывающий величину равномерной скорости движения эритроцитов под действием силы тяжести, зависящей от ряда параметров, как физических (концентрация эритроцитов, вязкость крови), так и от иммунологических.

Несмотря на приверженность к уже отработанным и надёжным методам анализа в медицинской практике, существует достаточно большое количество исследований, связанных с совершенствованием данного метода анализа [44, 45], а также работ, посвященных изучению связи СОЭ с типом характером заболеваний [43 – 46]; влиянием физических, иммунологических и биохимических факторов на СОЭ [46 – 53]. Также существует немало работ по моделированию, как самой седиментации, так и процессов и механизмов, предшествующих ей [47, 51 – 59].

Однако стоит также отметить, что результаты СОЭ носят неоднозначный характер. В некоторых случаях стандартные значения скорости седиментации наблюдаются при терминальных стадиях заболеваний, в то время как при некоторых "лёгких" заболеваниях значения СОЭ принимали достаточно высокие значения [47]. Это может быть связано с тем, что как метод СОЭ недостаточно проработан, не смотря на его широкое применение [60].

На сегодняшний день существует множество трактовок для описания седиментации крови. Одним из распространённых и простых считается анализ седиментации одиночного эритроцита, представленного в виде шара эквивалентного объёма, основанный на описании движения клетки в плазме согласно закону Стокса [61].

Если же рассматривать седиментацию цельной крови, то следует учитывать взаимодействия между соседними клетками и их агрегатами, так как в нативном состоянии расстояние между эритроцитами меньше размера самих клеток [54, 62]. Также стоит отметить, что во время седиментации происходит формирование встречного потока плазмы, проходящего через поры – свободное

от клеток и их ассоциатов пространство в седиментирующем слое крови – и оказывающего тем самым некоторое тормозящее действие за счёт трения [52, 54]. При рассмотрении и моделировании процессов *in vitro* представляют, что кровь содержится в цилиндрическом сосуде (капилляре), тогда слой крови – это цилиндр такого же радиуса, как и сосуд, и высотой равной диаметру модели тех объектов, которые рассматриваются: эритроциты при малом и эритроцитарные агрегаты при достаточно высоком содержании крови в образце. Стоит также уточнить, что в состав слоя крови включён объём раствора плазмы, содержащийся в порах и в зазоре (кольце) между клеточной массой и стенками сосуда.

Принято считать, что для образцов с цельной кровью начало седиментации, или же её более интенсивное проявление, происходит сразу после начала формирования во взвеси так называемых "монетных столбиков", а затем – агрегатов [47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 62, 63]. С точки зрения моделирования поведение эритроцитарных агрегатов возможно описать, используя те же принципы, что и для индивидуальных клеток, но сразу же стоит отметить, что агрегаты имеют различные размеры, следовательно, необходимо учесть их распределение по размерам, точнее распределение эквивалентных шаров по диаметрам [62]. Процессы формирования и седиментации агрегатов происходят вместе с течением времени наблюдения как за реальным образцом, так и при моделировании, что попытались учесть и реализовать в своей модели авторы работы [62], утверждая также, что во время создания такой теоретической модели испытывали острую нехватку экспериментальных данных, подтверждающих её достоверность.

Существует иной, по сравнению с "микроскопическим" (индивидуальным), подход к описанию седиментации крови. Он основан на модели С. Д. Балаховского – сетевой модели строения взвеси крови [64]. Им была обнаружена некая сетевая структура, в основе которой находятся эритроцитарные "монетные столбики". В этом случае седиментация крови

представляет собой движение частей этой сети и последующее уплотнение всей структуры, а не движение её частей (эритроцитов и агрегатов) по отдельности [47], то есть данная модель предполагает, что седиментация крови – коллективный процесс. Отметим так же, что в модели С. Д. Балаховского учитывается взаимодействие сетчатой клеточной структуры с встречным потоком, приводящее к замедлению эритроцитарной сети.

В основном целью рассмотренных выше работ является изучение СОЭ в качестве полноценного разностороннего метода диагностики. Однако в этих работах в качестве объектов исследования выступают образцы лишь цельной или слабо разбавленной крови. С другой стороны, седиментация эритроцитов и их ассоциатов в случаях с меньшим содержанием крови в образцах может использоваться в рамках разработки АОМ типирования крови [13, 34, 35, 65 – 67].

В представленных выше работах содержание крови в исследуемых образцах составляла порядка 1% и менее, вплоть до 0,1% (разведение цельной крови физиологическим раствором в 600 раз). Противоположный подход к концентрации крови в образцах использовали авторы [53]. В рамках данной работы использовались образцы с концентрацией от 33% до 100% цельной крови. Стоит отметить, что скорость седиментации с ростом содержания крови так же возрастала, согласно представленным результатам. Интерес также представляет результат работ [13, 34, 35, 65 – 67], в которых при достаточно сильном разведении крови наблюдается снижение седиментации.

По результатам, представленным авторами вышеперечисленных работ, можно сделать вывод о том, что большинство известных моделей седиментации крови – это анализ или моделирование оседания одиночных эритроцитов или их ассоциатов с помощью закона Стокса, то есть о том, что все они основаны на микроскопических принципах.

В данной главе настоящей диссертационной работы нами поставлена цель – на основании экспериментальных данных и результатах математического

(теоретического) и механического моделирования показать, что седиментация крови носит коллективный характер.

3.1 Экспериментальное исследование седиментации эритроцитов и их агрегатов

Исследование седиментации эритроцитов и их агрегатов проводилось на установке, описанной в главе 2 настоящей работы. Отличительной особенностью экспериментов, проводимых в текущей главе, являлось отсутствие ультразвукового воздействия на образцы (данный вид воздействия будет более подробно описан в главе 4). В качестве ёмкостей для образцов использовались стеклянные кюветы размером 10×10×45 мм. Содержание цельной крови в образцах варьировалось от 0.25% до 100%, остальная же часть была представлена физиологическим раствором. Стоит отметить, что для проведения одной серии экспериментов потребовалось порядка 150 мл донорской крови, в то время как в распоряжении авторов находились отдельные образцы объёмом до 20 мл. Поэтому, только в рамках данных экспериментов, было произведено смешение образцов крови с идентичной друг другу группой крови с целью увеличения общего объёма для адекватного проведения серии экспериментов с образцами, в которых отличным параметром являлось только содержание в них цельной крови. В итоге было проведено 8 серий подобных экспериментов длительностью по несколько часов.

Пробоподготовка образца заключалась в следующем: в кювету с заранее заготовленным объёмом физраствора помещалась соответствующая порция цельной донорской крови, после чего весь образец перемешивался с помощью микродозатора. Это приводило к тому, что в течение первых 20 – 30 минут наблюдения за образцом его содержимое находилось в турбулентном состоянии. Длительность этой фазы зависела от содержания крови в образце. Сама же седиментация наступала позже.

Методика записи протекания эксперимента также схожа с той, что описана в главе 2 настоящей работы – просвечивание образца коллимированным

излучением светодиода LXHL-G1S (спектр соответствует максимуму поглощения гемоглобина) и регистрация прошедшего светового потока полихромной камерой *Logitech Quick Cam*. Результатами эксперимента являлись цифровые видеоролики седиментации крови в образцах. Благодаря подбору спектров излучения светодиода и поглощения крови, при анализе полученных роликов, а точнее кадров, в зелёной компоненте отчётливо видна контрастная граница радела эритроцитарной массы и надосадочной жидкости (далее "седимент-супернатант").

Результаты экспериментов представлены на рисунке 3.1. Стоит отметить, что при наличии нескольких серий подобных экспериментов, абсолютные значения скорости седиментации или динамика смещения границы "седимент-супернатант" были достаточно близки.

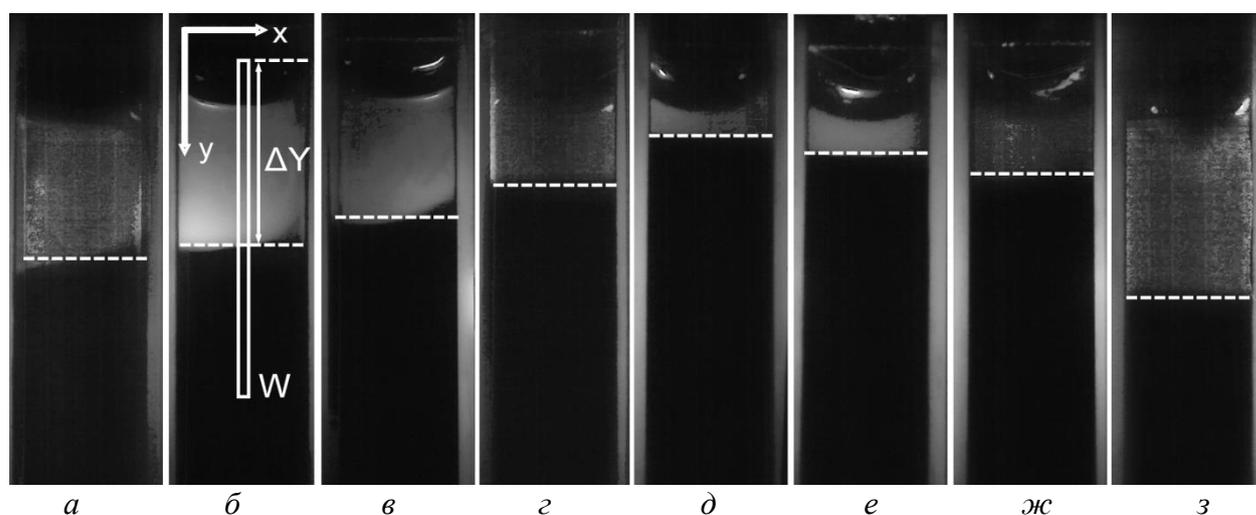


Рисунок 3.1. Изображения кювет с образцами крови.

Концентрация крови (%): а) 0.25; б) 0.5; в) 1; г) 10; д) 30; е) 60; ж) 80; з) 100.

Время регистрации изображений – 120 минут. W – область обработки фотоизображения ΔY – смещение границы к данному моменту времени.

На рисунке 3.1 видно, что при достижении концентрации крови в образце к максимальному (100%) и минимальному значению (0.25%) наблюдается максимальное смещение границы "седимент-супернатант" относительно

начального уровня. В то время как наименьшим смещением обладает образец с концентрацией равной 30%.

Цифровая обработка изображений, подобных представленным на рисунке 3.1 проводилась в зоне интереса W и состояла в следующем. Сначала изображение раскладывалось на компоненты RGB, затем, как было указано выше, выделялась только зелёная компонента. После чего значения яркости пикселей в зоне W преобразовывались в двумерный массив, в котором строки соответствовали положению вдоль вертикальной оси Y . Полученный массив использовался для построения одномерного массива путём усреднения значений в его строках, то есть вдоль оси X . В итоге был получен массив, в котором каждый элемент соответствовал вполне определённой координате с точки зрения своего номера, а по значению – яркости образца в данной области, величиной B (brightness). Следующим этапом в анализе было определение положения границы "седимент-супернатант". Здесь задача заключалась в поиске такого элемента массива с координатой (номером) Y_b , что для него и всех последующих элементов значение яркости было равно нулю, то есть $B(Y \geq Y_b) = 0$. Так как нумерация элементов массива начинается сверху, то с точки зрения эксперимента это означает, что седимент, поглощающий световой поток, находится ниже уровня Y_b . Затем, зная масштаб цифрового изображения, величина Y_b пересчитывалась из пикселей в миллиметры. Таким же образом для каждого кадра каждого ролика определялось положение границы "седимент-супернатант" относительно начальной точки отсчёта. В итоге были получены ряды со значениями смещения положения границы раздела с течением времени, что в свою очередь позволило достаточно точно определить скорость седиментации крови в образцах.

Примеры результатов цифровой обработки представлены на рисунке 3.2.

Для каждого образца скорость оседания определялась как отношение величины максимального в рамках эксперимента перемещения границы "седимент-супернатант" к времени. Как отмечалось в начале данной главы, на

представленных графиках рисунка 3.2 наблюдается некоторая хаотичность положения границы в первые несколько минут. Но, спустя некоторое время, зависимость перемещения границы от времени принимала линейный характер.

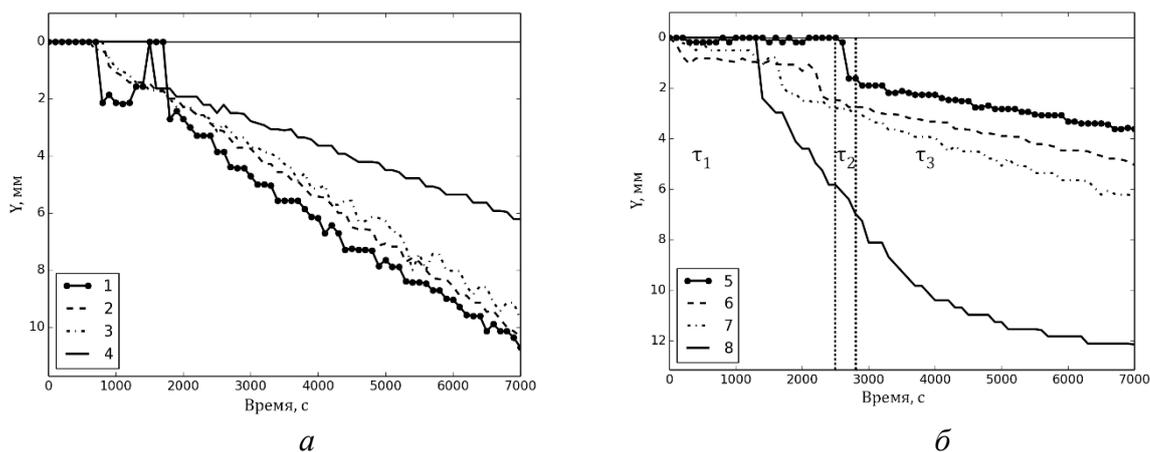


Рисунок 3.2. Зависимости перемещения границы "седимент-супернатант" от времени.

Концентрация цельной крови в образцах: 1 – 0.25%, 2 – 0.5%, 3 – 1%, 4 – 10%; 5 – 30%, 6 – 60%, 7 – 80%, 8 – 100%.

На рисунке 3.2 б видно, что седиментация, или же перемещение границы "седимент-супернатант", начинается с некоторым запаздыванием не только из-за эффектов, следовавших за перемешиванием образца, но также из-за свойств самой крови. Отметим так же, что запаздывание тем меньше, чем больше концентрация крови в образце. Это обусловлено тем, что для начала седиментации в образце крови должны начать формироваться эритроцитарные агрегаты, что напрямую связано с концентрацией эритроцитов. То есть, чем больше содержание крови в образце, тем выше вероятность и темп образования агрегатов. При малом содержании крови в образцах, как оказано на рисунке 3.2а, такого эффекта не наблюдается.

Помимо вышеописанного объяснения задержки седиментации, нами выдвинута ещё одна версия процесса, происходящего одновременно с

образованием агрегатов. Речь идёт о явлении, описанном в работе [47]. Авторы данной работы утверждают, что начало седиментации – это момент времени, когда слой эритроцитарной массы отрывается от мениска, являющегося границей между воздухом и образцом, а также, что продолжительность этого явления составляет десятки минут. Обработка экспериментальных видеороликов позволило в рамках настоящей работы определить количественно это время: на то, чтобы началась седиментация у образцов уходит 4 – 40 минут в зависимости от содержания в них крови. Помимо этого, обработка цифровых кадров показала возможный механизм вышеописанного процесса. На кадрах, относящихся к начальному этапу седиментации заметно формирование областей, постепенно заполняемых раствором плазмы, у стенок в верхней части кюветы.

Эти наблюдения послужили основой к моделированию процесса седиментации крови с учетом встречного потока плазмы, протекающей вдоль стенки стеклянной трубки (кюветы) – раздел 3.3.2. настоящей диссертационной работы. Фото, как результат встречного потока раствора плазмы вдоль стенки кюветы, приведены на рисунке 3.3.

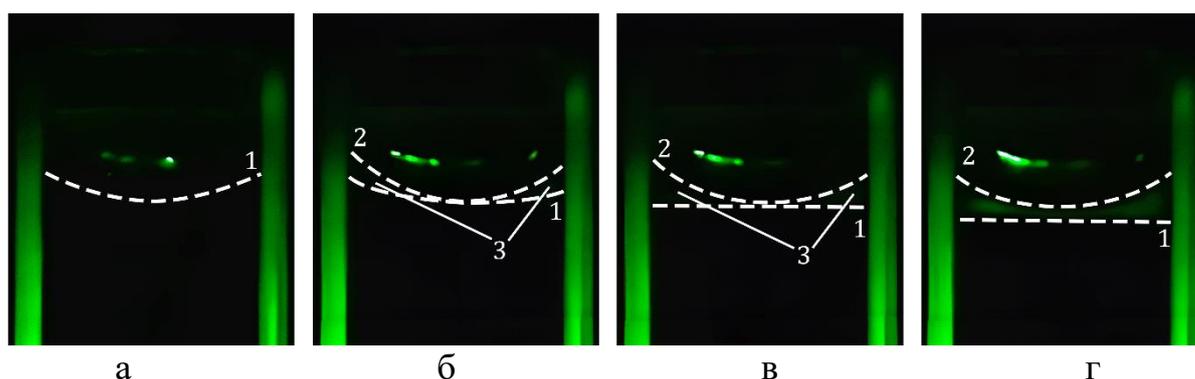


Рисунок 3.3. Изображения верхней части кюветы в разные моменты времени.

а – 6 мин, б – 31 мин, в – 36 мин, г – 53 мин.

Обозначения: а) 1 – граница "кровь – воздух", (б, в, г) 1 – граница "кровь-плазма", 2 – граница "плазма – воздух"; 3 – область заполняемая раствором плазмы.

Так как изображения получились довольно темными, то на рисунке 3.3 границы между кровью и воздухом или кровью и плазмой и др. выделены

пунктирными линиями. Заметим, что кровь практически не оседала вплоть до 31 минуты (рис. 3.3 г) и только, когда над столбом крови накопилось такое количество раствора плазмы, при котором вершина (экстремум) вогнутого мениска плазмы (линия 2) коснулась линии (уровня) крови (линия 1, рис. 3.3 в), стартует процесс седиментации крови. Именно в этот момент изогнутая линия 1 для крови трансформировалась в прямую. Наконец, когда над кровью сформировался некий слой раствора плазмы начинается вполне заметное оседание крови (рис. 3.3 г).

Эту динамику старта седиментации крови можно трактовать следующим образом. Хотя при моделировании седиментации крови для простоты кювета полагалась цилиндрической, однако, в эксперименте для удобства регистрации кювета была выбрана прямоугольной. Через некоторое время над столбом крови по периметру стеклянных стенок кюветы образовывался некий объем раствора плазмы, хотя в вершине вогнутого мениска сохранилась граница "кровь-воздух". Возникает вопрос о механизме образования этого пристеночного объема раствора плазмы поверх эритроцитарного столба крови. Этот вопрос не возникал бы, если бы имело место оседание столба крови – в этом случае этот RBC-столб подобно поршню выдавливал бы часть раствора плазмы, и та направлялась бы вдоль стенок кюветы в область поверх крови вблизи стенок. Однако, к этому моменту времени оседания крови еще не наблюдается (рис. 3.3 б).

В этой связи можно предположить, что вблизи стенок узкий слой жидкости толщиной ΔR можно представить в виде эффективной цилиндрической капиллярной трубки. Диаметр такой трубки может составлять величину порядка 10 мкм. Напомним, что трубку можно считать капилляром, если ее диаметр $D \leq 1$ мм. Тогда даже в отсутствии седиментации эритроцитарного столба раствор плазмы за счет капиллярных сил может подниматься вверх против силы тяжести вдоль стенок кюветы и формировать некий объем раствора плазмы над эритроцитарной массой вблизи стенок. Возможно, это и есть первичный акт, приводящий в дальнейшем к оседанию крови. Так как этот капиллярный канал,

по которому протекает вверх раствор плазмы формировался в процессе агрегации эритроцитов, то действительно правы те исследователи, которые утверждают, что седиментация крови начинается с явления агрегации.

Попробуем ответить на вопрос, почему и каким образом стартует седиментация крови? Считаем, что до определенного момента силы поверхностного натяжения удерживают кровь от оседания (рис.3.3а). В ходе накопления раствора плазмы над эритроцитарным столбом вблизи стенок кюветы (рис.3.3б, в) силы поверхностного напряжения ослабевают – обратите внимание, что линия границы «кровь-плазма» становится прямой (рис.3.3в). В этот момент силы поверхностного натяжения настолько уменьшились, что они не способны удерживать эритроцитарный столб крови в покое, он начинает оседать. Этот процесс иллюстрируется графиками на рисунке 3.3б.

Для определенности рассмотрим явление седиментации крови при минимальной изначальной концентрации эритроцитов – кривая 5. Для каждого момента времени скорость оседания эритроцитов определялась как $\Delta Y/\Delta t$. Из рисунка 3.3б видно, что при малых временных интервалах τ_1 кинетические кривые, несмотря на некоторую хаотичность, в среднем расположены горизонтально, то есть скорость седиментации $\Delta Y/\Delta t = 0$. Однако, в дальнейшем (при больших временах τ_3) зависимость $Y(t)$ в широких пределах носит практически линейный характер, следовательно, граница "раствор плазмы - взвесь эритроцитов" движется с постоянной скоростью. Исключение составляет случай цельной крови: при определенных смещениях ΔY граница "раствор плазмы – эритроцитарная масса" достигает таких глубин по оси Y , где плотность взвеси крови и ее вязкость за счет высоких концентраций эритроцитов становятся значительными. Тогда зависимость скорости седиментации крови от времени претерпевает "насыщение" – кривая 8. Обращаем внимание на узкий интервал времени τ_2 , где кривая 5 претерпевает резкий скачок. Дадим трактовку каждому из интервалов времени τ_1 – τ_3 .

Проведем некоторое сопоставление графиков (рис. 3.2б, кривая 5) с фотокадрами (рис. 3.3). Надо полагать, что в течении времени τ_1 седиментация крови отсутствует, идет процесс агрегации, формируются микроканалы вдоль стенок кюветы, начинает организовываться поток раствора плазмы, протекающий вверх, начинается накопление раствора плазмы поверх эритроцитарного столба (рис. 3.3а, б).

Скачок седиментации во временного интервала τ_2 соответствует моменту, отображенному на рисунке 3.3г – полному заполнению вогнутого мениска плазмой – момент старта седиментации крови.

Период τ_3 – процесс агрегации эритроцитов в основном завершился, эритроцитарный столб оседает, вытесняя раствор плазмы наверх по ранее сформированным микроканалам, происходит дальнейшее увеличение объема надосадочной жидкости – супернатанта (рис. 3.2б). Нам представляется, что к этому моменту процесс агрегации в основном завершился, потому что предполагается, что в противном случае процесс седиментации не был бы линейным.

По результатам обработки экспериментальных результатов (рисунки 3.1 и 3.3) была построена кривая зависимости скорости седиментации крови от её концентрации в образце – рисунок 3.4. На данном рисунке видно, что минимум седиментации приходится на 30%, причём скорость седиментации возрастает как при повышении концентрации, так и при её понижении, что полностью соответствует экспериментальным изображениям (рис. 3.1) и кинетическим кривым (рис. 3.2). Стоит отметить, что при сильном разведении образца скорость седиментации крови стремится к скорости седиментации одиночного эритроцита.

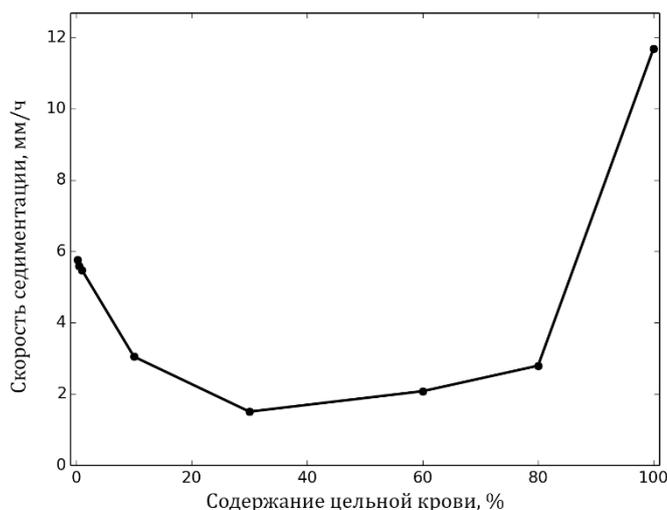


Рисунок 3.4. Зависимость скорости седиментации крови от её концентрации в образце.

3.2 Экспериментальное исследование седиментации агглютинатов

В отличие от агрегатов, наличие агглютинатов в образцах крови является спецификой пробоподготовки, а не результатом естественного процесса, происходящего во взвеси крови. Факторы, ведущие к агглютинации следующие: наличие в образце гемагглютинирующего агента и соответствие этого агента и группы крови образца (таблица 1.2). Сам же процесс агглютинации принципиально отличается от агрегации (глава 1). Его хаотичность отличается от спонтанной агрегации и дезагрегации тем, что это необратимый процесс. Поэтому при попытке построения модели седиментации агглютинатов необходимо учитывать вероятность образования клеточных комплексов, которая зависит от ряда иммунологических факторов, являющихся индивидуальными для каждой отдельно взятой пробы крови. Такая задача является достаточно трудоёмкой, поэтому в рамках данной диссертационной работы исследование седиментации агглютинатов рассматривалось только с точки зрения экспериментальных методов исследования.

В данном разделе будут лишь приведены экспериментальные результаты этого исследования. Так как сам процесс агглютинации играет важную роль в

сочетании с ультразвуковым воздействием, то более подробно, и в сравнении с другими вариантами комбинации этих факторов, седиментация агглютинатов будет рассмотрена в главе 4.

Как было указано выше, агглютинация невозможна без наличия гемагглютинирующих агентов – цоликлонов. Поэтому пробоподготовка в данной серии экспериментов включала в себя условия по добавлению этих агентов в исследуемые образцы. Соотношение между цельной кровью и цоликлоном составляло $1: 10$, по аналогии с гемагглютинирующими сыворотками. Таким образом весь состав образца, с учётом концентрации крови 2%, в пропорциях выглядит следующим образом: *цельная кровь: цоликлон: физраствор* = $1: 10: 39$, или, в процентном соотношении – $2: 20: 78 \%$.

Эксперименты проводились на установке, описанной в главе 2. Процесс подготовки образца к регистрации эксперимента отличался от предыдущих незначительно: порция цельной крови добавлялась к остальной части образца (физраствор + цоликлон) также непосредственно перед началом регистрации, когда образец уже находился на экспериментальной установке. Такой подход связан с высокой активностью цоликлонов. Здесь стоит отметить, что цоликлоны и группы крови подбирались принципиально для получения положительного исхода реакции агглютинации. Регистрация проводилась посредством записи видеороликов процесса с помощью цифровой камеры *Logitech Quick Cam*. Результаты промежуточной обработки данных приведен на рисунке 3.5.

Здесь видно, что седиментация, так же, как и в случае с агрегатами, начинается не сразу. Естественно, имеет место и турбулентное движение частиц после добавления порции крови, так как это обусловлено проведением опыта в обоих случаях. Принципиальным различием здесь является темп седиментации.

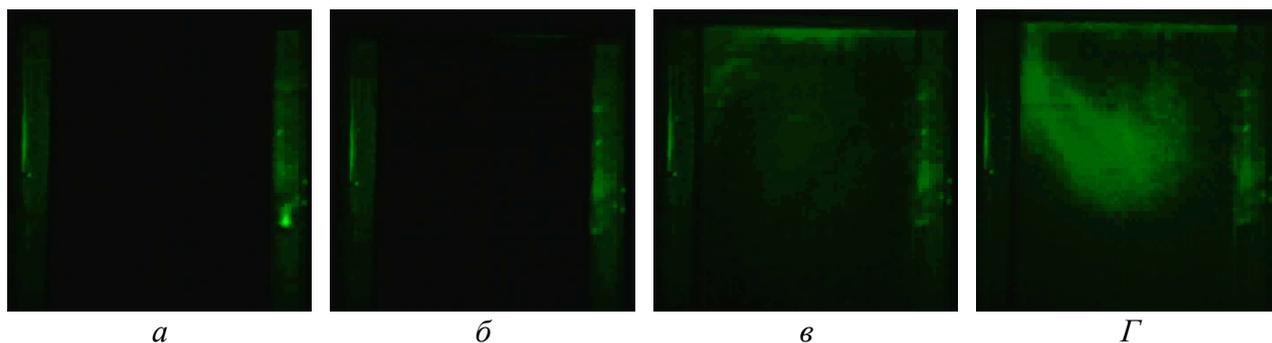


Рисунок 3.5. Изображения кюветы с образцом в различные моменты времени регистрации эксперимента.

а) 10 с; б) 5 мин 16 с; в) 10 минут; г) 12 мин 50 с.

На рисунке б видно в верхней части кюветы появление надосадочной жидкости, то есть к этому моменту седиментация уже началась. Но за счёт того, что механизм формирования клеточных комплексов при агрегации и агглютинации отличаются, то и седиментация также будет отличаться. В моменты времени непосредственно перед началом седиментации агглютинаты образуются по аналогии с агрегатами – спонтанно, а их размеры не столь велики, но уже достаточны для того, чтобы седиментировать. Процессы, происходящие в образце в данном временном интервале наблюдения (0 – 5 минут), достаточно схожи с теми, что протекают в образцах без цоликлонов. Но с течением времени проявляются естественные различия. В последующие моменты времени такие первичные агглютинаты становятся центрами образования более крупных комплексов: оседая, они встречают на своём пути вниз отдельные клетки и агглютинаты меньших размеров и объединяются с ними. Здесь проявляется необратимость агглютинации: чем больше клеток и комплексов встретит первичный агглютинат, тем крупнее он станет и, следовательно, станет выше его скорость седиментации. Стоит также отметить, что такие первичные агглютинаты образуются случайным образом во всём объёме образца. Таким образом в седиментации агглютинатов участвуют ряд факторов, зависящих от неких случайных величин: вероятность образования первичных агглютинатов, как факт «слипания» эритроцитов; вероятность образования первичных

агглютинатов в конкретном слое в образце; вероятность столкновения первичных агглютинатов с другими клеточными компонентами.

На рисунке 3.5в, г, помимо границы "седимент-супернатант", видно замутнение в надосадочной жидкости. Оно связано с лавинообразным характером седиментации. Крупные клеточные комплексы достигают таких размеров, что при оседании локально создают завихрения во встречном потоке, который, в свою очередь, захватывает мелкие комплексы и отдельные эритроциты, увлекая их за пределы границы раздела сред.

Анализ изображений проводился по тому же алгоритму, описанному в разделе 3.1. Вышеупомянутый эффект замутнения надосадочной жидкости не повлиял на результаты обработки. Считалось, что граница раздела относится к основной массе оседающей крови. Такой вывод был сделан на основе того, что яркость зоны над границей уменьшилась незначительно, то есть количество клеток, которые привели к этому, поглотив часть излучения светодиода, было многократно меньше основной массы, находящейся под границей раздела "седимент-супернатант". Пример результатов обработки экспериментальных данных приведён на рисунке 3.6.

На данном рисунке видно, что седиментация агглютинатов происходит неравномерно, несколькими этапами. Начальный этап – формирование спонтанных первичных агглютинатов на протяжении примерно 5 – 6 минут; затем резкое нарастание темпа седиментации за счёт лавинообразного эффекта; после чего наступает как бы повторная седиментация тех клеток и комплексов, которые остались не захваченными лавинообразным эффектом. Последний этап характеризуется тем, что во взвеси присутствуют достаточно крупные агглютинаты, которые расположены на относительно большом расстоянии друг от друга, что не приводит к повторному появлению лавинообразного оседания.

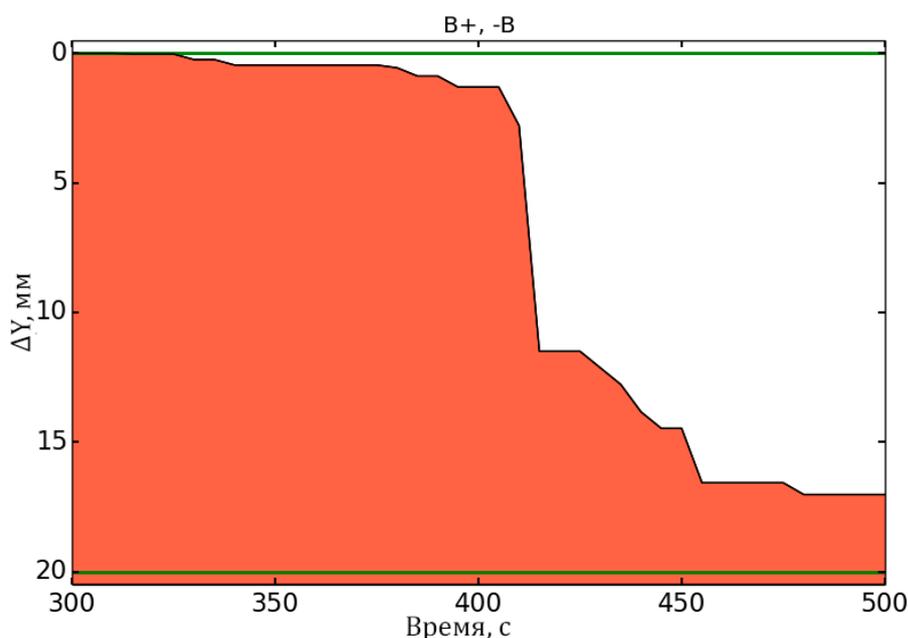


Рисунок 3.6. Кинетика движения границы "седимент-супернатант" для образца с агглютинатами.

Для сравнения скоростей седиментации агрегатов и агглютинатов в образцах с одинаковым процентным содержанием цельной крови, скорость седиментации для агглютинатов была подсчитана интегрально, то есть учитывалось только полное смещение и общее время наблюдения, приближаясь по смыслу к понятию СОЭ.

Подводя итоги данного раздела можно утверждать следующее.

Седиментация агглютинатов как процесс зависит от множества вероятностных величин, в следствие чего сам процесс является неравномерным во времени. Это делает создание модели седиментации агглютинатов крайне сложной задачей, и в рамках настоящей работы её решение не планировалось.

Общая скорость седиментации агглютинатов выше, чем у агрегатов. С одной стороны, об этом свидетельствуют экспериментальные результаты, с другой стороны – само понятие процесса агглютинации. Факт того, что образующиеся в процессе оседания клеточные комплексы не только не разрушаются со временем, но и могут увеличиваться в размерах за счёт

присоединения других комплексов и клеток, говорит о том, что эти комплексы во много раз превышают по размерам агрегаты, а, следовательно, их скорость движения, даже на этапе повторной седиментации, где оставшиеся во взвеси агглютинаты крупнее любого нормального эритроцитарного агрегата, будет выше за счёт большей массы.

Таким образом, скорость седиментации, или же скорость просветления образца, является одной из главных величин для АОМ типирования крови. С учётом явного различия этой величины для случаев с положительной и отрицательной реакцией агглютинации, можно сказать, что первично она может являться критерием, по которому происходит типирование образца. Но, с другой стороны, время эксперимента и обработки полученных результатов достаточно велико. Из-за чего требуется внесение в эксперимент внешнего фактора, который ускорял бы процесс седиментации для случаев с положительной реакцией агглютинации. Таким фактором является применение ультразвуковых стоячих волн. Более подробно влияние такого рода воздействия на седиментацию и образец в целом описано в главе 4 настоящей диссертационной работы.

3.3 Теоретические модели седиментации крови

В разделе 3.1 было экспериментально показано, что при концентрации крови в образце $\approx 30\%$ скорость седиментации принимает минимальные значения. Приблизительные расчёты показали, что именно при таком количестве крови межклеточное расстояние в среднем соизмеримо с размерами (диаметром) эритроцитов. Данные расчёты, естественно, проводились для модели клеток, то есть их диаметр составляет ≈ 5.5 мкм. Логично предположить, что при снижении концентрации цельной крови расстояние между клетками увеличивается и, например, для концентрации 0.25% оно составляет 40 мкм. В связи с этим легко предположить, что агрегация будет проходить с очень низкой вероятностью в силу удалённости клеток друг от друга. Если же рассматривать аналогичные величины, но при увеличении концентрации, то расстояние между клеточными моделями становится меньше их диаметра – при концентрации в 100% (цельная

кровь) эта величина составляет 0.4 мкм. В данном случае ситуация с процессом агрегации обратная – её вероятность достаточно велика. Это послужило основанием для создания двух моделей седиментации: седиментация эритроцитов (раздел 3.3.1) и седиментация эритроцитарных агрегатов (раздел 3.3.2). Обе модели учитывают, что седиментация представляет из себя коллективный процесс. Обе модели имеют общие базовые принципы. Рассмотрим их подробнее, прежде чем переходить к описанию каждой модели конкретно.

Седиментацию крови будем представлять, как оседание цилиндрического слоя крови. Данный слой находится в верхней части столба жидкости – образца – и имеет следующие характеристики: h – высота; R – радиус слоя ($R \gg h$). Здесь стоит сразу отметить, что присутствует несоответствие между формами поперечного сечения сосуда в модели (круг) и кюветы (квадрат) в эксперименте. Использование в эксперименте именно квадратной кюветы обусловлено отсутствием оптических эффектов во время регистрации – цилиндр с образцом представляет собой некое подобие линзы, что, естественно, привело бы к наличию искажений.

Рассматриваемый слой крови движется вертикально вниз с некоторой скоростью v . Напомним, что в рассматриваемой модели слой крови имеет неоднородную структуру – присутствуют, так называемые, поры, чьи размеры связаны с межклеточным расстоянием. Обозначим их размеры как d_p – диаметр, r_p – радиус поры, а количество – N_p (p – pore). Одним из важных факторов, влияющих на седиментацию, является наличие встречного потока жидкости, протекающей через данные поры. В случаях с малым содержанием крови в образце эта жидкость представляет собой раствор плазмы, а в случае с большей концентрацией, близкой к цельной крови, в данной жидкости могут содержаться также свободные эритроциты, не вошедшие в состав агрегатов.

Для описания седиментации в данных условиях построения модели требуется определить параметры, относящиеся к седиментирующему с

некоторой скоростью слою крови. То есть нахождение всех величин, от которых зависит скорость седиментации, а также их зависимость от концентрации цельной крови в образце.

3.3.1 Модель коллективной седиментации эритроцитов

При построении модели седиментации в случае малых концентраций, ещё раз напомним, что расстояние между клетками значительно больше их размеров, а значит в рассматриваемом слое находятся только эритроциты, процесс агрегации посчитаем отсутствующим.

Прежде, чем перейти к уравнению баланса, стоит уточнить состав рассматриваемого слоя (монослоя). Он представляет собой некий квазисплошной диск, в составе которого эритроциты и некоторый объём раствора плазмы в порах. Поэтому величина его плотности ρ_d будет находиться в пределах между плотностью раствора плазмы ρ_l и плотностью эритроцита ρ_{RBC} . Данную величину можно определить, как:

$$\rho_d = \rho_l + \frac{4N_{RBC}r_{RBC}^3(\rho_{RBC} - \rho_l)}{3hR^2}, \quad (3.1)$$

где N_{RBC} – количество эритроцитов; r_{RBC} – радиус сферической модели эритроцита (≈ 2.75 мкм).

Уравнение баланса сил строилось из соображений, что на диск, движущийся в жидкости, действуют силы тяжести M_dg , Архимеда $F_{Арх}$ и трения $F_{тр}$, действующая на боковые поверхности пор. Оно имеет вид:

$$M_d a = M_d g - F_{Арх} - F_{тр}. \quad (3.2)$$

Силу трения можно описать следующим образом:

$$F_{тр} = k_1 N_p \eta_l S_{p,lat} \left(\frac{dv}{dr_p} \right) = k_1 N_p \eta_l 2\pi r_p h \left(\frac{dv}{dr_p} \right). \quad (3.3)$$

В данном выражении учтены следующие параметры: коэффициент вязкости жидкости (раствор плазмы) η_l ; площадь боковой поверхности поры $S_{p,lat} = 2\pi r_p h$; градиент скорости встречного потока dv/dr_p ; коэффициент соответствия

k_I , который учитывает отличие формы поры от цилиндра и определяется экспериментально.

В поперечном сечении цилиндрического сосуда распределение скорости вдоль его диаметра носит параболический характер с максимумом в центре и минимумом, практически отсутствием скорости, около его стенок. С учётом малого размера поры такое распределение можно представить в виде линейной функции. Тогда выражение для градиента скорости в поре можно переписать следующим образом:

$$dv/dr_p = v_{max}/r_p = 2v_{mean}/r_p. \quad (3.4)$$

Здесь скорость v_{mean} – средняя скорость встречного течения в поре. Для определения градиента скорости и скорости оседания диска нужно найти выражение, которое показывает связь между v_{mean} и v_{sed} .

Рассмотрим для этого выражения, описывающие объёмные скорости течения. Объём жидкости, который вытесняет диск без учёта раствора плазмы, находящегося в порах, обозначим за Q_1 и найдём его с помощью следующего выражения:

$$Q_1 = v_{sed}S_{RBC} = v_{sed}\pi(R^2 - N_p r_p^2), \quad (3.5)$$

где S_{RBC} – площадь, которую занимают исключительно эритроциты в рассматриваемом слое. Следовательно, объём жидкости Q_1 распределяется по порам за счёт встречного течения. Со стороны пор этот объём обозначим как Q_2 :

$$Q_2 = N_p v_{mean} \pi r_p^2. \quad (3.6)$$

С учётом вышесказанного получаем равенство $Q_1 = Q_2$, а из него получим следующее выражение для связи v_{sed} и v_{mean} :

$$v_{sed}\pi(R^2 - N_p r_p^2) = N_p v_{mean} \pi r_p^2, \quad (3.7)$$

или

$$v_{mean} = v_{sed}[(R^2/N_p r_p^2) - 1]. \quad (3.8)$$

С учётом (3.8) получим выражение для градиента скорости в поре:

$$dv/dr_p = 2v_{mean}/r_p = 2(v_{sed}/r_p) [(R^2/N_p r_p^2) - 1]. \quad (3.9)$$

Подставим (3.9) в (3.3), а полученный результат в выражение баланса (3.2).

Получим:

$$M_d a = M_d g - F_{\text{Арх}} - k_1 4\pi N_p \eta_l h [(R^2/N_p r_p^2) - 1] v_{sed}. \quad (3.10)$$

Зная, что $M_d = \rho_d V_d$, подставим её и выражение для $F_{\text{Арх}}$ в (3.10):

$$M_d a = g V_d (\rho_d - \rho_l) - k_1 4\pi N_p \eta_l h [(R^2/N_p r_p^2) - 1] v_{sed}. \quad (3.11)$$

Из этого выражения видно, что сила трения зависит от скорости седиментации диска, что представляется вполне логичным. Поэтому, рост скорости движения диска приводит к росту силы трения, и в какой-то момент наступает состояние баланса – ускорение a становится равным нулю. Тогда получим выражения для скорости седиментации из (3.11):

$$v_{sed} = g R^2 (\rho_d - \rho_l) / [4k_1 \eta_l N_p ((R^2/N_p r_p^2) - 1)]. \quad (3.12)$$

Зная выражения для плотности диска ρ_d , преобразуем (3.12):

$$v_{sed} = [g N_{er} r_{er}^3 (\rho_{er} - \rho_l) / 3h] / [k_1 \eta_l N_p ((R^2/N_p r_p^2) - 1)]. \quad (3.13)$$

Как было указано в начале данного раздела, рассматриваемый диск является монослоем, то есть $h = 2 r_{er}$, то связь N_{er} с концентрацией выглядит так:

$$N_{er} = c \pi R^2 h = 2c \pi R^2 r_{er}. \quad (3.14)$$

С учётом этого и некоторых преобразований перепишем (3.13):

$$v_{sed} = \pi g R^2 r_{er}^3 c (\rho_{er} - \rho_l) / [3k_1 \eta_l ((R^2/r_p^2) - N_p)]. \quad (3.15)$$

В полученном выражении (3.15) присутствуют два взаимозависимых величины: N_p и r_p – количество и радиус пор, соответственно. Определив выражение, которое связывает данные параметры и подставив его в (3.15), можно получить величину одного из них. При этом, естественно, потребуется использовать экспериментальные данные, а точнее значения скорости $v_{sed}(c)$.

Определим величину площади, занимаемой жидкостью в монослое:

$$S_l = S_d - S_{er} = \pi(R^2 - N_{er}r_{er}^2), \quad (3.16)$$

где S_{er} – суммарная площадь сферических моделей эритроцитов. Разделим S_l на количество пор N_p , чтобы получить площадь одной поры.

$$\pi(R^2 - N_{er}r_{er}^2)/N_p = k_2\pi r_p^2, \quad (3.17)$$

Здесь k_2 – поправочный коэффициент. Из (3.17) можно получить выражение для определения радиуса поры r_p .

$$r_p = \sqrt{R^2 - \frac{2\pi c r_{er}^3}{k_2 N_p}}. \quad (3.18)$$

Подстановка (3.18) в (3.15) даёт следующее выражение:

$$v_{sed} = \frac{\pi g R^2 r_{er}^3 c (\rho_{er} - \rho_l) [1 - 2\pi c r_{er}^3]}{3k_1 \eta_l N_p ((k_2 - 1) + 2\pi c r_{er}^3)}. \quad (3.19)$$

Данное выражение можно использовать для поиска зависимости $N_p(c)$ с учётом экспериментальных значений скорости седиментации v_{sed} . При расчёте $N_p(c)$ учитывались пределы концентраций эритроцитов, соответствующие ограничениям рассмотренной модели седиментации – случай малого содержания цельной крови в образце.

На рисунке 3.7 представлена расчётная зависимость N_p , а также аппроксимированные зависимости N_p и r_p от концентрации. Аппроксимация $N_p(c)$ выглядит следующим образом:

$$N_p(c) = ac^b, \quad (3.20)$$

где коэффициенты $a = 0.223$ и $b = 1.07$ были подобраны для наилучшего соответствия с расчётной зависимостью.

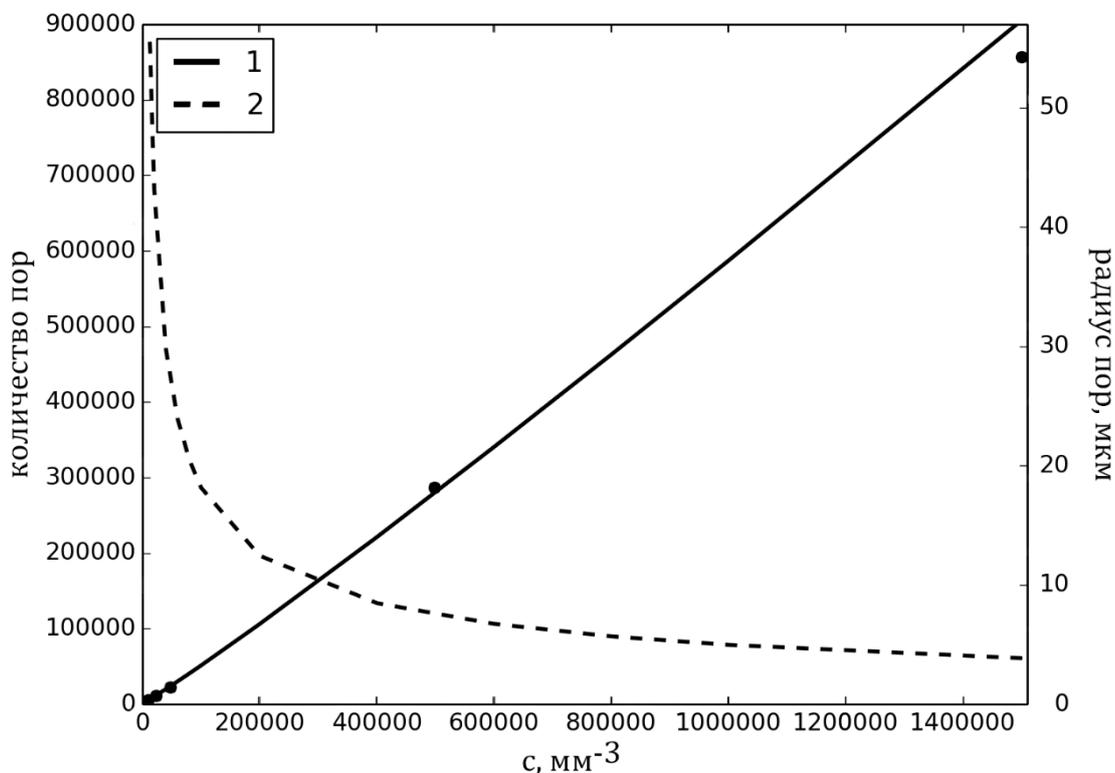


Рисунок 3.7. Аппроксимированные зависимости количества отверстий N_p (график 1) и радиуса отверстий r_p (график 2) от концентрации эритроцитов c в образце, а также расчёт $N_p(c)$ по формуле модели (точки).

Результат подстановки полученных значений зависимости $N_p(c)$ в выражение (3.19) показан на рисунке 3.8, демонстрируя хорошее совпадение экспериментальной и модельной зависимостей v_{sed} . Для нахождения зависимости $v_{sed}(c)$ использовались следующие параметры: радиус цилиндра $R = 5$ мм; радиус сферической модели эритроцита $r_{er} = 2.74$ мкм; плотность эритроцита $\rho_{er} = 1.092 \times 10^3$ кг/м³; плотность раствора плазмы (жидкости) $\rho_l = 1 \times 10^3$ кг/м³; $c = [0.25; 100]$ % от c_0 ($c_0 = 5 \times 10^6$ мкл⁻³); вязкость жидкости $\eta_l = 1.01 \times 10^{-3}$ Пуаз. Значения коэффициентов, при которых наблюдалось максимальное сходство зависимостей были: $k_1 = 50000$; $k_2 = 1.5$.

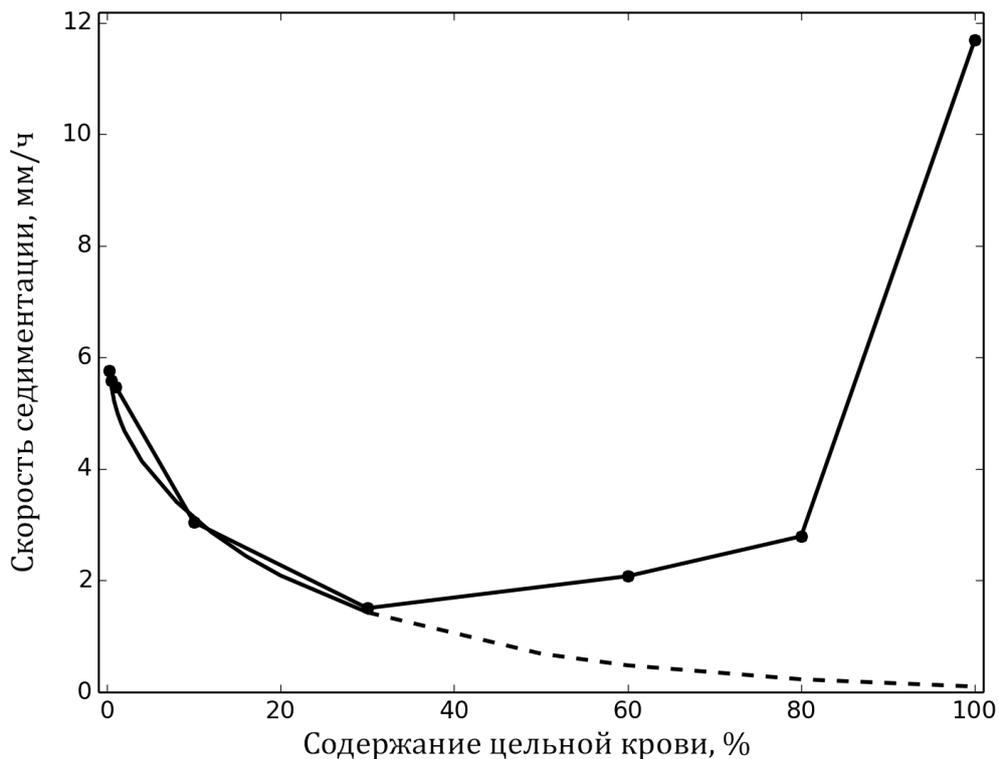


Рисунок 3.8. Зависимости скорости седиментации от концентрации цельной крови в образце.

Точки – результаты экспериментов; пунктирная линия – результат моделирования.

Из сопоставления графиков на рисунке 3.8 можно сделать следующие выводы.

Снижение концентрации крови в образце приводит к тому, что скорость седиментации слоя по значениям стремится к скорости седиментации одиночного эритроцита. Это показано как в эксперименте, так и при построении модельной зависимости $v_{sed}(c)$. Что представляется естественным: с уменьшением концентрации возрастает расстояние между клетками, то есть возрастает размер пор, из-за чего снижается величина линейной скорости встречного потока, что в свою очередь приводит к снижению силы трения и увеличению скорости седиментации.

Резкое отличие графиков на данном рисунке после отметки значения концентрации цельной крови в 30% свидетельствует о том, что при повышении

концентрации возрастает вероятность агрегации эритроцитов. Данный процесс принципиально отсутствовал в построении модели. Он будет учтён и подробно описан в следующем разделе 3.3.2.

3.3.2 Модель коллективной седиментации агрегатов

В данном разделе настоящей работы будет рассмотрена модель седиментации крови при условии наличия в ней эритроцитарных агрегатов. Это является не единственным отличием рассматриваемой модели от модели из раздела 3.3.1. Здесь, за счёт высокой концентрации крови в исследуемых образцах появляется в некотором смысле зазор между монослоем и стенками сосуда. Это также является принципиальным отличием этих двух моделей.

Для начала стоит подробно описать геометрию модели, которая схематично изображена на рисунке 3.9.

Представим раствор крови в цилиндрической стеклянной трубке радиусом R_0 в виде некоего столба 2 радиусом R_d , содержащего плазму, эритроциты и их агрегаты, а также вышеупомянутый зазор ΔR между внешней поверхностью этого столба крови и внутренней стенкой стеклянной цилиндрической трубки 3 $\Delta R = R_0 - R_d$ ($\Delta R \ll R$). В пределах зазора ΔR наблюдается течение встречного потока раствора плазмы, вытесняемой седиментирующим столбом крови. Помимо этого, встречного потока параллельно протекает еще один – поток раствора плазмы, движущийся сквозь поры в столбе крови. По аналогии с разделом 3.3.1 под термином «поры» будем понимать межэритроцитарное или межагрегатное пространство (на рис.3.9 не показано). Очевидно, что оба потока важны для понятия скорости седиментации, так как они притормаживают оседание крови и, следовательно, должны быть учтены в разрабатываемой модели.

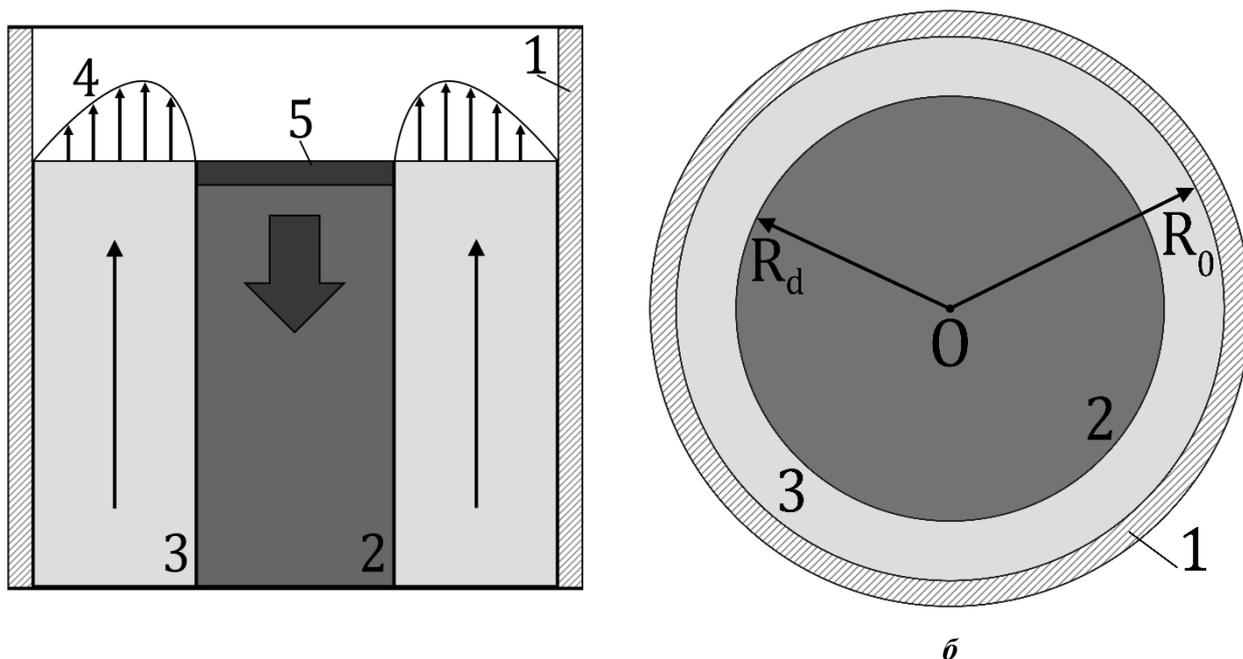


Рисунок 3.9. Схема модели седиментации.

а) профиль стеклянной цилиндрической трубки с раствором крови; б) вид сверху.
 1 – стеклянная цилиндрическая трубка; 2 – проба крови; 3 – встречный поток раствора плазмы; 4 – распределение скорости встречного потока; 5 – монослой крови.
 Стрелки – направления седиментации монослоя и встречного потока раствора плазмы.

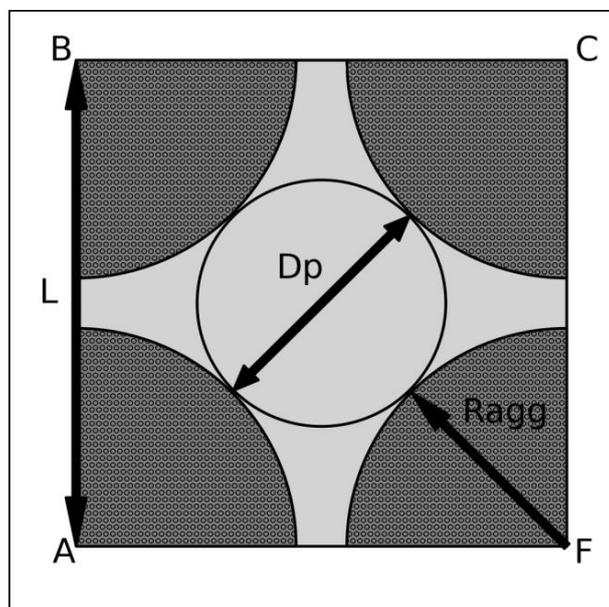
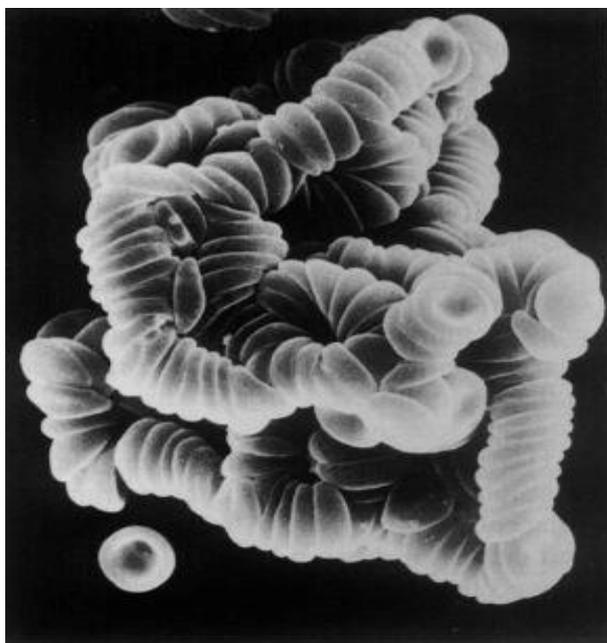
Для построения модели седиментации крови рассмотрим параметры её корпускулярных элементов. Эритроциты будем моделировать сферой объемом равным объему реального эритроцита (по аналогии с моделью в 3.3.1). Диаметр такой модели эритроцита составляет $d_{\text{rbc}} \approx 5.68$ мкм [53] (сфера такого диаметра соответствует объему реального нормоцита), а совокупность всех эритроцитов раствора без учета эффекта агрегации будем полагать монодисперсной эритроцитарной средой.

В настоящей работе многократно отмечалось, что стартом к седиментации является процесс агрегации эритроцитов. Размер эритроцитарного агрегата, его форма и количество эритроцитов в агрегате q могут быть различными. Параметр q зависит от нескольких факторов:

1. гематологические и биохимические свойства данной пробы крови – образцы крови разных доноров (пациентов) обладают разными q ;
2. концентрация эритроцитов в пробе, а для данной пробы – степень ее разведения физраствором, то есть от количества цельной крови в образце k ;

3. время в ходе агрегации эритроцитов.

Так при нормальной СОЭ величина $q_{\text{norm}} \approx 12$ (**norm** – normal) [50]. Некоторое представление о возможном количестве эритроцитов в агрегате и его форме дает изображение на рисунке 3.10 а. Хотя форма агрегатов весьма сложна и произвольна, однако для определенности подобно эритроцитам полагалось, что агрегаты имеют сферическую форму, размеры которой определялись радиусом эритроцита-сферы r_{rbc} и величиной q . Кроме того, реальное взаимное расположение агрегатов также произвольно, как и их размеры. Однако, для простоты модели эритроцитарный диск представлялся организованной периодической структурой (рис. 3.10 б), агрегаты которой полагались монодисперсной средой. Заметим, что сквозь пору с диаметром D_p (p – pore, пора) протекает встречный поток раствора плазмы в направлении перпендикулярном к плоскости рисунка 3.10 б.



а

б

Рисунок 3.10. Структура эритроцитарного агрегата.
а) микрофотография; б) модель структуры ячейки агрегатов.

Довольно очевидно, что с ростом концентрации эритроцитов данной пробы крови – например, снижение степени разведения ее физраствором –

увеличивается вероятность взаимодействия эритроцитов друг с другом, и, как результат, возрастает величина $q(C)$ – «текущее» значение параметра, характерное для данной концентрации эритроцитов C в растворе образца крови. Таким образом, совокупность эритроцитарных агрегатов остается монодисперсной средой, но их размеры зависят от начальной концентрации эритроцитов C_0 и содержания крови в образце k . Эта величина аналогична концентрации крови, упомянутой в предыдущих разделах настоящей работы, и может меняться в пределах от 0 (отсутствие крови в образце) до 1 (образец – цельная кровь). Текущая концентрация эритроцитов в образце $C = k \times C_0$.

Для определения зависимости $q(C)$ разумно полагать, что:

1. количество эритроцитов в агрегатах максимально $q_{\max} = q_0$ при стремлении концентрации эритроцитов C к значению, соответствующему цельной крови C_0 ($C < C_0$ и $C \rightarrow C_0$);
2. количество эритроцитов в агрегатах стремится к нулю при стремлении концентрации эритроцитов C к нулю ($C < C_0$ и $C \rightarrow 0$).

Одним из возможных вариантов функции, удовлетворяющим таким условиям, является сигмоида $S(C)$ вида:

$$S(C) = \frac{2}{\left(1 + e^{-\frac{C-C_0}{C}}\right)}. \quad (3.21)$$

Действительно, при $C < C_0$ и $C \rightarrow C_0$ величина $S(C) \rightarrow 1$, а при $C < C_0$ и $C \rightarrow 0$ значение $S(C) \rightarrow 0$. Тогда, введя переменную $k = C/C_0$ (содержание крови в образце), функцию $q(C)$ можно записать в виде:

$$q(C) = q_0 S(C) = \frac{2q_0}{\left(1 + e^{\left(\frac{1}{k}-1\right)}\right)}, \quad (3.22)$$

где q_0 – среднестатистическое значение количества эритроцитов в агрегате для образца данной цельной крови. При этом, для простоты моделирования, будем считать, что все агрегаты по-прежнему монодисперсны, однако образцы разных доноров (пациентов) имеют разные величины q_0 , как отмечалось выше – от единиц и десятков до сотен и более. Поэтому, при моделировании

седиментации крови данного образца величину q_0 следует рассматривать как специальный параметр.

Считаем, что диаметр агрегата $D_{agg} = 2R_{agg}$, при котором его объем равен сумме объемов входящих в него реальных эритроцитов определяется:

$$D_{agg} = d_{rbc} \sqrt[3]{q} = 2r_{rbc} \sqrt[3]{q} \quad (3.23)$$

Отметим, что изображение на рисунке 3.10 б качественно (масштабно) отображает реальные размеры агрегатов и пор. Оценки показывают, что для нормального значения СОЭ диаметр агрегата составляет $D_{agg} = 2R_{agg} \approx 13$ мкм.

Средним диаметром поры D_p будем считать диагональ квадрата ячейки АС (рис. 3.10 б) за вычетом диаметра агрегата D_{agg} , то есть:

$$D_p = \sqrt{2}L - d_{rbc} \sqrt[3]{q(C)} = \sqrt[3]{q(C)} \left(\sqrt{2} \sqrt[3]{1/kC_0} - d_{rbc} \right). \quad (3.24)$$

Для примера, оценим порядок величины D_p : например, при $k = 0.8$, $C_0 = 5 \times 10^6$ мм⁻³ величина D_p оказывается порядка 8 мкм. И, наконец, совокупность пор в диске будем представлять, как систему параллельных идентичных цилиндрических трубок, по которым совокупно протекает встречный поток раствора плазмы крови.

Для регистрации скорости седиментации крови, по аналогии с моделью из раздела 3.3.1, выделим в области верхней поверхностности столба эритроцитов (Рис.1а) некий монослой высотой h примерно равной размеру агрегата ($h \approx D_{agg}$). Скорость его перемещения будем принимать за величину скорости седиментации. Заметим, что для проб крови разных субъектов или степеней ее разведения k эта высота h различна.

Рассмотрим теперь параметры, связанные с величиной зазора между внешним контуром эритроцитарного седиментирующего столба крови и внутренней поверхностью цилиндрической стеклянной трубки.

На рисунке 3.9 показано, что в структуру модели седиментации крови входит некоторый зазор ("кольцо") между внешним контуром диска и внутренней поверхностью цилиндрической стеклянной трубки. В процессе

седиментации крови сквозь этот зазор так же, как и сквозь поры в диске, протекает встречный поток. Естественно, этот встречный поток также действует тормозящим образом на седиментацию крови. Более того, важно подчеркнуть, что явление седиментации крови обусловлено не только оседанием крови, но и течением встречного потока раствора плазмы. Именно оба взаимно противоположно направленных движений обуславливают накопление раствора плазмы поверх эритроцитарной массы, а, следовательно, перемещение (седиментацию) границы "эритроцитарная масса - раствор плазмы" в единицу времени, то есть величину скорости. Естественно, в этот процесс накопления надосадочной жидкости (супернатант) поверх эритроцитарной массы (седимент) вносит определенный вклад и поток раствора плазмы, протекающий сквозь упомянутое "кольцо". Заметим, что на это обстоятельство будет указано в разделе 3.1, а в [52] описаны чрезвычайно интересные экспериментально обнаруженные явления, происходящие в области "кольца" при седиментации крови. Приведем некоторые из них в виде цитат [52]:

- в процессе седиментации крови «в какой-то момент вблизи стенки капилляра возникает течение вверх» – встречный поток;
- это встречное течение оказывается настолько сильным, что «оно выбрасывает вверх даже очень большие ассоциаты эритроцитов»;
- кроме того, одновременно «из оседающей клеточной массы начинают проявляться малые яркие частицы» нано и микроразмеров, трактуемые как пузырьки газа; «по мере увеличения интенсивности восходящего потока увеличивается количество и размеры этих частиц, как и скорость седиментации границы»;

кроме того, в [52] показано, что СОЭ зависит от формы и размеров стеклянной трубки (кюветы) – «закономерности оседания крови в узких капиллярах отличаются от таковых в прямоугольной кювете».

Предполагается, что предложенная здесь модель коллективной седиментации крови позволит дать трактовку вышеперечисленным явлениям из

[52], а также поведению зависимости скорости седиментации крови от концентрации эритроцитов в образце. Кроме того, модельно будет дана оценка вклада в скорость седиментации обоих встречных потоков – протекающих сквозь поры и кольцо, выявить их конкуренцию, то есть соотношения их линейных и объемных скоростей.

Перейдём к построению модели для зависимости скорости седиментации крови от степени ее разведения физиологическим раствором.

Для нахождения скорости седиментации эритроцитарного слоя (диска) v_{sed} в растворе плазмы крови рассмотрим его движение с учетом наличия пор и кольца заполненных этим раствором. Оседающий эритроцитарный диск создает давление ΔP в жидкости (раствор плазмы), которое подобно поршню вытесняет некоторое ее количество Q_d (индекс d – *disk*). Полагая жидкость несжимаемой можно считать, что это количество жидкости протекает сквозь кольцо и поры в диске; запишем уравнение баланса расхода жидкости для данной задачи:

$$Q_d = Q_p + Q_r, \quad (3.25)$$

где Q_p и Q_r - количество жидкости, протекающее сквозь поры и кольцо в единицу времени соответственно – расход жидкости (индексы: p – *pore*, r – *ring*). Очевидно, что величины, входящие в (3.25) связаны с геометрическими размерами оседающего диска, пор, кольца и другими параметрами. В частности, Q_d связано с искомой скоростью седиментации крови:

$$Q_d = S_d v_{sed} = \pi[(R_0 - \Delta R)^2 - N_p r_p^2] v_{sed}, \quad (3.26)$$

где S_d , R_d – площадь и радиус эритроцитарного диска, N_p , r_p – количество и радиус пор в диске, ΔR – ширина кольца. Легко видеть, что нахождение Q_p , Q_r , их подстановка наряду с (3.26) в (3.25) позволяет найти скорость седиментации крови.

Величины Q_p и Q_r проще найти на основании закона Паскаля: давление, производимое на жидкость, передаётся в любую точку среды без изменений во всех направлениях. Тогда применительно к нашей задаче: на жидкость,

расположенную в порах монослоя (диска) и в кольце действуют одинаковые давления $\Delta P_p = \Delta P_r = \Delta P$. Давления ΔP_p и ΔP_r формируют потоки жидкости, встречно движущиеся с соответствующими скоростями по отношению к направлению седиментации крови. Найдем величину давления ΔP с учетом силы веса диска и силы Архимеда:

$$\Delta P = \frac{(Mg - F_{\text{Арх}})}{S_d} = gh(\rho_d - \rho_l), \quad (3.27)$$

где M – масса эритроцитарного диска, S_d – его площадь, g – ускорение свободного падения, $F_{\text{Арх}}$ – сила Архимеда, h – высота (толщина) диска, ρ_d и ρ_l – плотности диска и жидкости (раствора плазмы) соответственно (индекс: l – liquid). Здесь важно подчеркнуть, что выделенный нами эритроцитарный диск включает в себя три компонента: эритроциты (и их агрегаты) раствор плазмы крови и порцию физиологического раствора. Поэтому плотность эритроцитарного диска ρ_d будем рассматривать как результат суммирования плотностей всех трех компонент:

$$\rho_d = k\rho_{rbc}HCT + k\rho_{pl}(1 - HCT) + \rho_s(1 - k), \quad (3.28)$$

где k – степень разведения крови физраствором, или иначе – доля объема цельной крови по отношению к общему объему диска $k = V_{bl} / V_d$ (индексы: bl – blood, d – disk). В формуле (3.28): HCT – величина гематокрита исследуемой крови, то есть отношение объема седимента исследуемой крови (объем эритроцитарной массы V_{rbc}) к общему объему пробы крови V_{bl} ($HCT = V_{rbc} / V_{bl}$), ρ_s – плотность физиологического раствора (индексы: pl – plasma, s – saline). Плотность жидкости ρ_l , протекающей во встречном потоке сквозь кольцо и поры определим двумя последними слагаемыми правой части соотношения (3.28), то есть:

$$\rho_l = k\rho_{pl}(1 - HCT) + \rho_s(1 - k) \quad (3.29)$$

Вернемся к соотношению (3.27): выразим связь между давлением ΔP и количеством жидкости, протекающим сквозь поры Q_p в единицу времени, через их совокупное гидравлическое сопротивление ω_p :

$$Q_p = \Delta P / \omega_p = \Delta P / (8\eta_l h / \pi N_p r_p^4), \quad (3.30)$$

где η_l – коэффициент вязкости жидкости (раствор плазмы). Важно заметить, что формула для гидравлического сопротивления ω_p , использованная в (3.30), справедлива для цилиндрической трубки, поэтому выражение, подобное (3.30) для кольцевого зазора записать невозможно. В этой связи было предложено мысленно заменить кольцевой зазор на эквивалентную трубку цилиндрического сечения, радиус которой R_{eq} должен удовлетворять следующим требованиям: $Q_r = Q_{eq}$ и $v_r = v_{eq}$, где Q_{eq} – расход жидкости, протекающей через эквивалентную цилиндрическую трубку, v_r и v_{eq} – линейные средние скорости потоков сквозь кольцо и эквивалентную трубку соответственно (индекс *eq* – *equivalent*). Легко показать, что эти условия вполне удовлетворяются при равенстве площадей «кольца» и поперечного сечения эквивалентной трубки $S_r = S_{eq}$, или:

$$\pi R_{eq}^2 = 2\pi \Delta R (R_0 - \Delta R). \quad (3.31)$$

Теперь можно записать выражение для кольца по аналогии с (3.30):

$$Q_r = \Delta P / \omega_r = \Delta P / (8\eta_l h / \pi R_{eq}^4), \quad (3.32)$$

или с учетом (3.31):

$$Q_r = \Delta P / \left[2\eta_l h / \pi (R_0 - R)^2 \Delta R^2 \right], \quad (3.33)$$

Подставим (3.26), (3.27), (3.33) в (3.25) и определим скорость седиментации крови v_{sed} :

$$v_{sed} = \frac{g(\rho_d - \rho_l)}{8\eta_l ((R_0 - \Delta R)^2 - N_p r_p^2)} \times (N_p r_p^4 + 4(R_0 - \Delta R)^2 \Delta R^2) \quad (3.34)$$

Из (3.34) следует физически оправданный результат: при условии одновременного $N_p = 0$ и $\Delta R = 0$ скорость седиментации крови v_{sed} , естественно, обращается в нуль. В то же время (3.34) приводит к двум вполне корректным частным случаям:

- 1) Пусть $N_p = 0$ (отсутствие пор), но $\Delta R \neq 0$ (присутствие кольца):

$$v_{sed} = \frac{g(\rho_d - \rho_l)\Delta R^2}{2\eta_l}. \quad (3.35)$$

- 2) Пусть $\Delta R = 0$ (отсутствие кольца), но $N_p \neq 0$ (присутствие пор):

$$v_{sed} = \frac{g(\rho_d - \rho_l)N_p r_p^4}{8\eta_l(R_0^2 - N_p r_p^2)}. \quad (3.36)$$

Для расчета скорости седиментации v_{sed} при $\Delta R \rightarrow 0$ по формуле (3.36) необходимо предварительно сделать некоторые оценки параметров образца исследуемой крови: $(\rho_d - \rho_l)$, N_p , η_l и ΔR . Заметим, что r_p для подстановки в (3.36) можно найти, пользуясь выражением (3.24). Не трудно показать из (3.28), (3.29), что:

$$(\rho_d - \rho_l) = kHCT\rho_{rbc}. \quad (3.37)$$

Количество пор N_p в диске качественно можно оценить следующим способом:

$$N_p = S_d / S_{mc}, \quad (3.38)$$

где S_d и S_{mc} – площадь диска и одной ячейки модели (рис. 3.10 б) соответственно (индекс *mc* – model cell). Искомая величина N_p в (3.38) показывает, сколько ячеек модели укладывается на площади диска. Полагая $S_d = \pi(R_0 - \Delta R)^2$ и $S_{mc} = L^2$, с учетом (3.23) можно оценить величину N_p для заданного ΔR , например, равного D_p .

При разведении крови в физрастворе изменяется как концентрация эритроцитов в растворе, так и концентрация плазмы пробы η_l . Воспользуемся исследованиями зависимости коэффициента вязкости крови от степени ее разведения в физрастворе [68]; экспериментально показано, что эта зависимость достаточно убедительно описывается экспоненциальной функцией вида $\eta = \eta_0 e^{\alpha C}$, где η_0 – вязкость плазмы, C – концентрация эритроцитов в растворе крови, α – коэффициент, подбираемый для наилучшего согласования экспоненциальной аппроксимации экспериментальных результатов. В данной задаче (3.34) есть

необходимость найти зависимость η_l от степени разведения плазмы в физрастворе k_{pl} с последующей подстановкой результата в (3.34). Будем полагать по аналогии с [68], что эта зависимость также определяется экспонентой:

$$\eta_l = \eta_{sal} e^{\alpha k_{pl}}, \quad (3.39)$$

где η_{sal} – коэффициент вязкости физраствора, α – коэффициент, подбираемый для наилучшего согласования экспоненциальной функции аппроксимации с экспериментальными результатами, $k_{pl} = V_{pl} / V_{sol}$ – отношение объемов плазмы и общего количества жидкости (плазма + физраствор) соответственно. Очевидно, что при $V_{pl} = 0$ (плазма отсутствует, имеется лишь физраствор) из (3.39) следует $\eta_l(k_{pl} = 0) = \eta_{sal}$, а при $V_{pl} = V_{sol}$ (физраствор отсутствует, жидкость состоит целиком из плазмы крови) $\eta_l(k_{pl} = 1) = \eta_{sal} e^{\alpha}$. Воспользуемся стандартными параметрами η_{sal} и $\eta_l(k_{pl} = 1) = \eta_{pl}$: а) известно, что 20% физиологический раствор имеет вязкость более, чем в 1,5 раза большую, чем чистая вода, тогда не трудно показать, что коэффициент вязкости физраствора (концентрация NaCl = 0.9%) составляет $\eta_{sal} \approx 1.02$ – близко к вязкости дистиллированной воды $\eta(H_2O) \approx 1.016-1.019$; б) в норме вязкость плазмы составляет $\eta_{pl} \approx 1.7-2.2$, в среднем примем $\eta_{pl} = 2.0$. Подстановки $\eta_{sal} \approx 1.02$ и $\eta_{pl} = 2.0$ в (3.38) позволяет отыскать коэффициент α , а, следовательно, численно конкретизировать (3.39).

Пользуясь (3.28), (3.29), (3.38), (3.39) на основании (3.34) можно рассчитать зависимость скорости седиментации крови от степени ее разведения k . При этом для расчета радиуса пор в эритроцитарном диске можно воспользоваться:

$$r_p = \sqrt[3]{q} \left[\frac{\sqrt[2]{2}}{2} \sqrt[3]{\frac{1}{kC_0}} - r_{rbc} \right] \quad (3.40)$$

Оценка величины радиуса пор для, например, $k = 0.8$, $q = 12$ и $C_0 = 5 \times 10^6$ дает $r_p = 3.82$ мкм. Результат расчета и эксперимента зависимости $v_{sed}(k)$ представлены на рисунке 3.11.

Из данного рисунка видно следующее:

– результаты расчетов удовлетворительно совпадают с экспериментальными, что подтверждает правомочность применения предложенного подхода коллективного описания процесса седиментации при решении задач об оседании объектов;

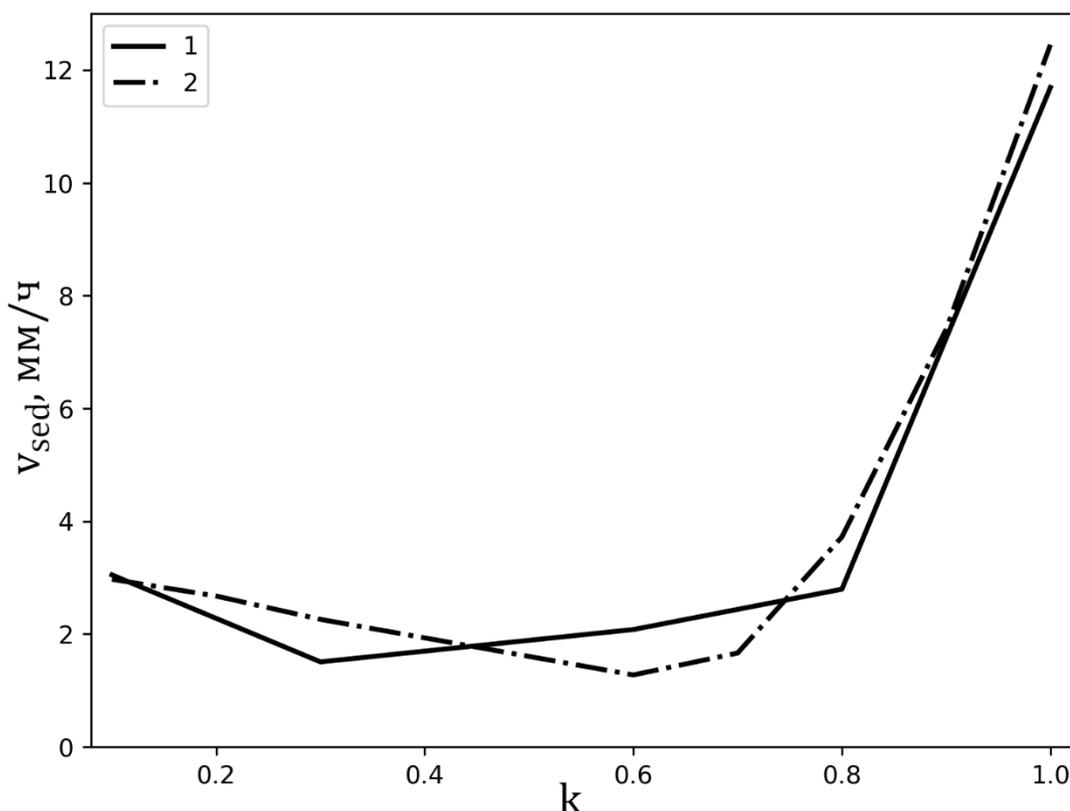


Рисунок 3.11. Зависимость скорости седиментации крови в образце от содержания её в образце.

1 — экспериментальные данные (раздел 3.1); 2 — расчет по формуле (14) с учетом двух встречных потоков.

– скорость седиментации минимальна при разведениях крови порядка 30 – 50 %, однако она возрастает при сильных (малые концентрации эритроцитов) или слабых разведениях крови; это объясняется тем, что в первом случае межклеточное расстояние велико в силу большого разведения крови (по этой же причине RBC-агрегаты практически не образуются), а во втором случае

расстояние между RBC-агрегатами сравнительно возрастает в связи со значительным ростом их образования;

– стоит обратить внимание, что при больших концентрациях эритроцитов ($k \approx 1$) скорость седиментации крови в случае учета зазора ΔR несколько выше, нежели без его учета.

Итак, встречный поток раствора плазмы протекает по двум каналам: сквозь поры в эритроцитарном диске и сквозь зазор ΔR вблизи стеклянной стенки трубки (кюветы). Оба потока тормозящим образом влияют на скорость седиментации крови (эритроцитарного столба, рис. 3.9) в силу противоположной направленности своего течения по отношению к направлению процесса седиментации. Однако, представляет интерес соотношение линейных скоростей раствора плазмы в этих двух каналах.

Такой анализ может дать информацию о кинетике оседания крови и, следовательно, о механизме СОЭ. Заметим, что о соотношении линейных скоростей интересующих нас потоков будем судить опосредованно – по соотношению скоростей седиментации столба эритроцитов в случаях отсутствия пор или, наоборот, отсутствия зазора ΔR . Для этого поделим формулу (3.35) на (3.36):

$$\frac{v_{sed}(N_p \rightarrow 0)}{v_{sed}(\Delta R \rightarrow 0)} = \frac{4(R_0^2 - N_p r_p^2)\Delta R^2}{N_p r_p^4} \quad (3.41)$$

где отношение $v_{sed}(N_p \rightarrow 0) / v_{sed}(\Delta R \rightarrow 0)$ показывает во сколько раз скорость

седиментации крови больше или меньше при течении раствора плазмы сквозь зазор ΔR , чем сквозь поры. Логично предположить, что помимо иных факторов это соотношение скоростей зависит от соотношения площадей, сквозь которые эти потоки протекают. Поэтому выразим (3.41) через площади поперечного сечения поры S_p и зазора $S_{\Delta R}$. Кроме того, введем следующие обозначения: S_0 – площадь внутреннего поперечного сечения трубки (кюветы), S_d – площадь поперечного сечения эритроцитарного диска (RBC-столба), $S_{p,\Sigma}$ –

сумма площадей всех пор эритроцитарного диска. После преобразований (3.41) получим:

$$\frac{v_{sed}(N_p \rightarrow 0)}{v_{sed}(\Delta R \rightarrow 0)} = 4 \left[\frac{S_d}{S_{p,\Sigma}} - 1 \right]. \quad (3.42)$$

При получении (3.42) также использовали: $\Delta R \approx r_p$, $S_{\Delta R} = 2\pi R \Delta R$, $\Delta R \ll R$. Из (3.42) видно, что если $S_d = S_{p,\Sigma}$, то есть кровь отсутствует полностью, то, естественно, скорость седиментации крови $v_{sed}(N_p \rightarrow 0)$ равна нулю в связи с ее полным отсутствием. Зависимость (3.42) представлена на рисунке 3.12 а.

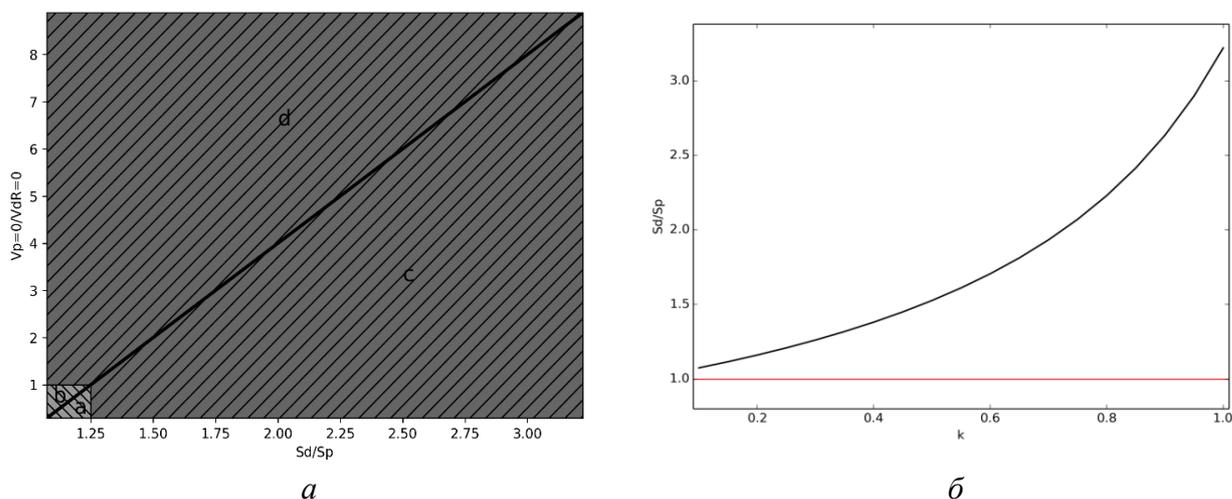


Рисунок 3.12. Иллюстрация зависимостей с участием соотношения площади диска и пор. а) зависимость отношения скоростей седиментации крови (кольцо / поры) от отношения площадей (площадь диска / площадь пор); б) - зависимость отношения площадей (площадь диска / площадь пор) от содержания крови в образце k .

Дадим трактовку рисунку 3.12 а. Для начала рассмотрим зоны с – d.

Данным заштрихованным зонам с – d соответствуют случаи, когда соотношение площадей составляет $(S_d / S_{p,\Sigma}) > 1.25$. Предположим, что для данной трубки (кюветы) $S_d \approx S_0 = \text{const}$, так как $\Delta R \ll R$, поэтому увеличение отношения $(S_d / S_{p,\Sigma})$ возможно лишь при уменьшении суммарной площади пор $S_{p,\Sigma}$, то есть при слабой изначальной агрегации эритроцитов ($k \approx 0.3 - 0.5$). Если же рассматривать процесс агрегации случаях, когда $k \approx 1$, то в ходе этого процесса размеры агрегатов, как и расстояние между ними (r_p), возрастает, также возрастает и зазор ΔR или иначе – увеличивается радиус эффективной трубки R_{eq}

(3.31). Известно, что в силу непрерывности потока, рост диаметра эквивалентной трубки приводит к уменьшению линейной скорости потока, что в свою очередь уменьшает силу трения между стенками эффективной трубки и потоком жидкости – в результате скорость движения эритроцитарного столба, то есть скорость седиментации возрастает.

Перейдём теперь к рассмотрению зон $a - b$.

Зонам $a - b$ соответствует случай, когда $1 < (S_d / S_{p,\Sigma}) < 1.25$, а отношение скоростей седиментации обратное $(v_{sed}(N_p \rightarrow 0) / v_{sed}(\Delta R \rightarrow 0)) < 1$. Этот случай имеет место быть, когда $S_{p,\Sigma}$, естественно, меньше, чем S_d , но их отношение приближается к единице $(S_d / S_{p,\Sigma}) \rightarrow 1$. Такое соотношение может наблюдаться при сильной степени агрегации эритроцитов. Таким образом, в процессе агрегации эритроцитов мы плавно переходим от зон $c - d$ к зонам $a - b$.

Касаемо трактовки рисунка 3.12 б, то здесь несколько проще: данный рисунок показывает, что с увеличением содержания крови в растворе увеличивается степень агрегации, увеличиваются размеры агрегатов, а также межагрегатное расстояние – растёт суммарная площадь пор $S_{p,\Sigma}$. В определенной мере это поддерживает вышеприведенную трактовку для случая зон $c - d$ на рисунке 3.12 а.

В начале данного раздела отмечалось, что скорость седиментации крови зависит от формы и размеров сосуда, в которой происходит этот процесс. В [47] авторами утверждается: «закономерности оседания крови в узких капиллярах отличаются от таковых в прямоугольной кювете». В связи с этим на рисунке 3.13а представлены результаты моделирования подобной зависимости (формула (3.34)). В качестве вариационного параметра был выбран радиус цилиндрической кюветы R .

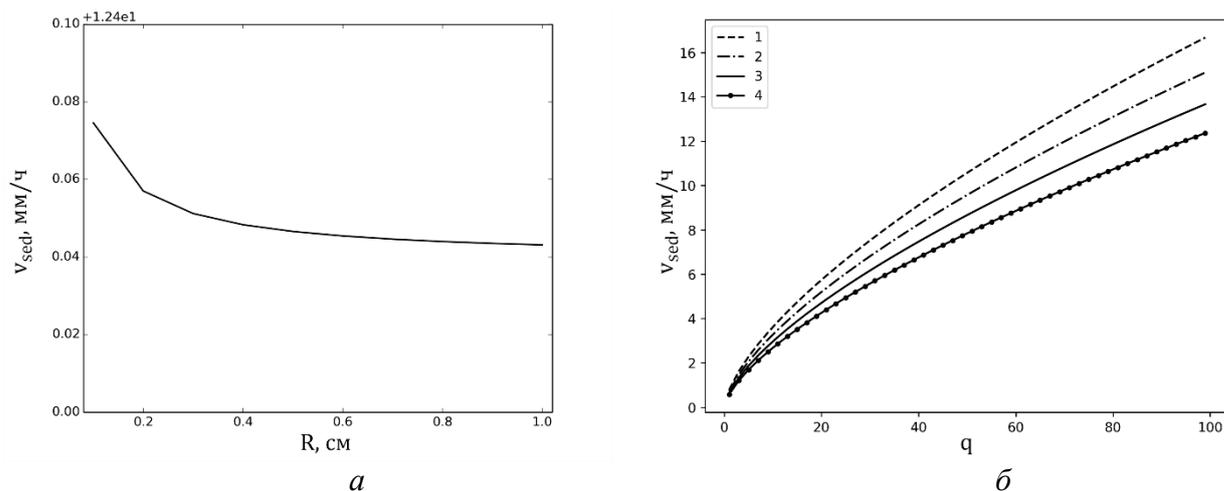


Рисунок 3.13. Зависимости скорости седиментации крови.
 а) – от радиуса кюветы (стеклянной трубки), б) – от агрегационной способности крови образцов при разных уровнях разведения физиологическим раствором.
 Значения k : 1- 0.85; 2 – 0.9; 3 – 0.95; 4 – 1.0.

Из рисунка 3.13а видно, что скорость седиментации крови уменьшается с увеличением радиуса сосуда (кюветы). Физически это объясняется тем, что с увеличением R возрастает площадь контакта встречного потока раствора плазмы с боковой поверхностью эритроцитарного столба (рис. 3.9 а). При этом сила трения пропорциональная площади [69] возрастает, а скорость седиментации крови падает:

$$F_{fr} = \eta S \frac{\Delta v}{\Delta r}, \quad (3.43)$$

формула Ньютона [69], где F_{fr} – сила трения, S – площадь поверхности эритроцитарного столба, η - коэффициент вязкости жидкости, $\Delta v / \Delta r$ – градиент скорости течения жидкости.

Здесь стоит также упомянуть о зависимости скорости седиментации крови от агрегационной способности эритроцитов разных проб. За величину агрегационной способности эритроцитов в настоящей работе принята величина q – среднее значение количества клеток эритроцитарном агрегате. Напомним, что в норме этот параметр $q = 12$. Моделирование процесса седиментации (3.34) дает следующую зависимость $v_{sed}(q)$ – рисунок 3.13 б. Данную зависимость не трудно объяснить – увеличение q увеличивает размеры агрегата, а вместе с этим

и межагрегатное расстояние. Тогда возрастают размеры пор, уменьшается скорость встречного потока, а скорость седиментации эритроцитов и их агрегатов возрастает. В данном случае, параметр q является независимым от содержания крови k , в отличие от всех других рассмотренных зависимостей. На графиках рисунка 3.13 б видно, что с уменьшением k скорость седиментации возрастает при одинаковых значениях q . Можно представить, что агрегаты формируются искусственно, со строго определённым количеством клеток в них. Поэтому разница в скорости может быть описана следующим образом. При одинаковом значении числа клеток в агрегате их количество напрямую зависит от изначального количества клеток в образце, то есть от k . Следовательно, чем меньше k , тем меньше агрегатов в слое, тем больше суммарная площадь пор, тем ниже линейная скорость встречного потока в них, тем меньше сила трения, тем выше скорость седиментации.

В рамках работы над данным разделом была построена теоретическая модель седиментации крови в форме коллективного оседания эритроцитов и их агрегатов. Данная модель оказалась более полной, по сравнению с моделью из 3.3.1, так как учитывает не только седиментацию агрегатов, но и свободных эритроцитов – случай при $q = 1$. Дана подробная трактовка для основных аспектов, от которых зависит скорость седиментации.

3.4 Механические модели коллективной седиментации крови

Как было сказано в разделе 3.1, существует множество подходов к описанию седиментации, которые в основной своей массе являются микроскопическими, то есть рассматривающие движение только единично выбранной клетки или ассоциата. В данном разделе будут описаны основные механические модели седиментации, которые учитывают её коллективный характер.

3.4.1 Механическая модель седиментации эритроцитарного ассоциата

Здесь стоит начать с микроскопического подхода, так как наиболее упрощённым является анализ индивидуального оседания тела в представлении

его формы в виде шара. Такой подход основан на использовании закона Стокса [61]:

$$F_{fr} = 6\pi\eta r_b v \quad (3.44)$$

где F_{fr} – сила трения (сила Стокса, f_r – friction, трение) между жидкостью и движущимся относительно нее шаром радиусом r_b (**b**-ball), v – скорость движения шара относительно жидкости, а η – коэффициент ее вязкости. С учетом (3.44) запишем известную формулу для скорости седиментации шара в жидкости v_{sed} , помещенной в цилиндр [70, 71]:

$$v_{sed} = \frac{2gr_b^2(\rho_b - \rho_l)}{9\eta \left(1 + 2.4 \frac{r_b}{R}\right) \left(1 + 3.1 \frac{r_b}{H}\right)} \quad (3.45)$$

где ρ_b и ρ_l – плотность шара и жидкости соответственно (**l**-liquid, жидкость), g – ускорение свободного падения, R – внутренний радиус цилиндра с жидкостью, H – высота столба жидкости в цилиндре. Первая скобка в знаменателе (3.45) учитывает влияние размера (радиуса R) цилиндра на скорость оседания шара [70], вторая скобка в знаменателе отражает влияние дна цилиндра на скорость седиментации шара [71]. Заметим, что оседание шара приводит к формированию на дне цилиндра встречного потока жидкости по отношению к направлению движения седиментирующего шара.

При описании седиментации крови, например, эритроцитов, клетки представляются в виде шаров объемом равным объему реального эритроцита. При этом радиус шарообразной модели эритроцита r_{rbc} можно оценить по формуле $r_{rbc} = 0.71R_{rbc}$ [62], где R_{rbc} – радиус реального эритроцита в плоскости его диска. Заметим, что выше приведенная формула учитывает пространственную ориентацию реального оседающего эритроцита.

Однако, в реальных седиментационных задачах, как правило, рассматривается оседание не индивидуальных тел, а их совокупностей, чрезвычайно близко расположенных друг к другу. При седиментации крови расстояние между соседними эритроцитами может быть меньше размеров самих эритроцитов. Это усложняет задачу разработки такой модели, так как приводит к необходимости учитывать взаимовлияние соседних эритроцитов, а с математической точки зрения – к необходимости решения самосогласованных задач [50, 62]. Более того, в случае гематологических седиментационных

исследований в связи с вышеотмеченным малым расстоянием между эритроцитами возможна их агрегация, или, при особых условиях, агглютинация, что также сильно усложняет задачу [51, 58, 72, 73].

В работах [68, 74] предложен иной подход к описанию процесса седиментации объектов – механических тел или эритроцитов. Совокупность таких объектов биологического или небιологического происхождения рассматриваются как общее, интегральное квазисплошное тело, седиментирующее в данной жидкости. Или иначе – анализируется не индивидуальное оседание механических тел или эритроцитов, или эритроцитарных агрегатов, а седиментация квазисплошного объекта, например, слоя крови, содержащего свободные эритроциты и/или их агрегаты. Такой подход в [74] имел название – анализ «коллективной» седиментации.

В рамках данного раздела проводились эксперименты, содержащие в себе процедуру, которая обычно осуществляется при измерении коэффициента вязкости жидкости методом Стокса [75]. Объектами исследования являлись шары и группы шаров. Средний диаметр используемых шаров $d_b \pm \sigma d = 5,378 \pm 0,0024$ мм, средняя плотность шаров $\rho_b \pm \sigma \rho = 1,877 \pm 0,04$ г/см³, где σd и $\sigma \rho$ – стандартные отклонения для диаметров и плотностей шаров соответственно. При определении плотности шаров измерялись диаметр и масса каждого шара индивидуально, находилась плотность каждого шара и, как результат, средняя величина плотности шаров ρ_b и ее «разброс» $\sigma \rho$. Шары подбирались из множества таким образом, чтобы время седиментации любого из отобранных шаров было максимально возможным и, кроме того, времена должны быть близкими. Размеры стеклянного цилиндра: высота $H_0 = 230$ мм, внутренний диаметр $D = 2R = 28$ мм, расстояние между специальными метками для определения времени падения шаров $L = 155$ мм, расстояние от нижней метки до дна $h = 23$ мм. Диаметр D и высота H_0 сосуда выбирались небольшими, чтобы иметь возможность наблюдать движение шаров в условиях влияния стенок сосуда и его дна. Высота столба жидкости в цилиндре $H = 210$ мм. Жидкость –

глицерин с коэффициентом вязкости $\eta = 14,4$ Пуаз и плотностью $\rho_1 = 1,26$ г/см³ при комнатной температуре 23 – 24 °С.

Эксперимент заключался в измерении времени движения шаров в жидкости τ с последующим вычислением скорости шара (или группы шаров) по формуле $v_{\text{sed}} = L/\tau$. Сначала скорость v_{sed} измерялась индивидуально для каждого из отобранных шаров, затем результаты усреднялись. Далее определялись скорости седиментации групп шаров, состоящих из двух, затем трех и более шаров – максимальное число шаров в группе составляло 6 шт. За скорость седиментации группы шаров принималась скорость движения ее центра. С каждой группой из нескольких шаров выполнялось множество опытов, однако, учитывались лишь те из них, в которых отсутствовали соударения шаров между собой или со стенкой цилиндра. Количество таких, успешных, опытов для каждой группы с данным количеством шаров было выбрано равным 30, так что общее число измерений составляло 180.

Экспериментально было обнаружено, что при идентичных условиях проводимых экспериментов группа шаров движется быстрее, чем один отдельный шар. Для демонстрации этого эффекта с помощью цифровой камеры изготавливались ролики, кадры из которых для примера представлены на рисунке 3.14.

На рисунке 3.14 б для облегчения восприятия изображения шары обведены контурами; для случая, когда один из шаров заслонял другой, использовался пунктир. Величина, равная $2R_{\text{eq}}$ – диаметр некой эквивалентной сферы (eq – equivalent, эквивалентный), которая будет использована в дальнейшем при моделировании движения группы шаров. Из рисунка 3.14 видно, что в одной и той же жидкости при идентичных условиях три шара движутся быстрее, чем один. Это отличие в скоростях составляет примерно 25 % относительно скорости движения одиночного шара. Зависимость скорости движения шаров от их количества в группе N приведена на рисунке 3.15.

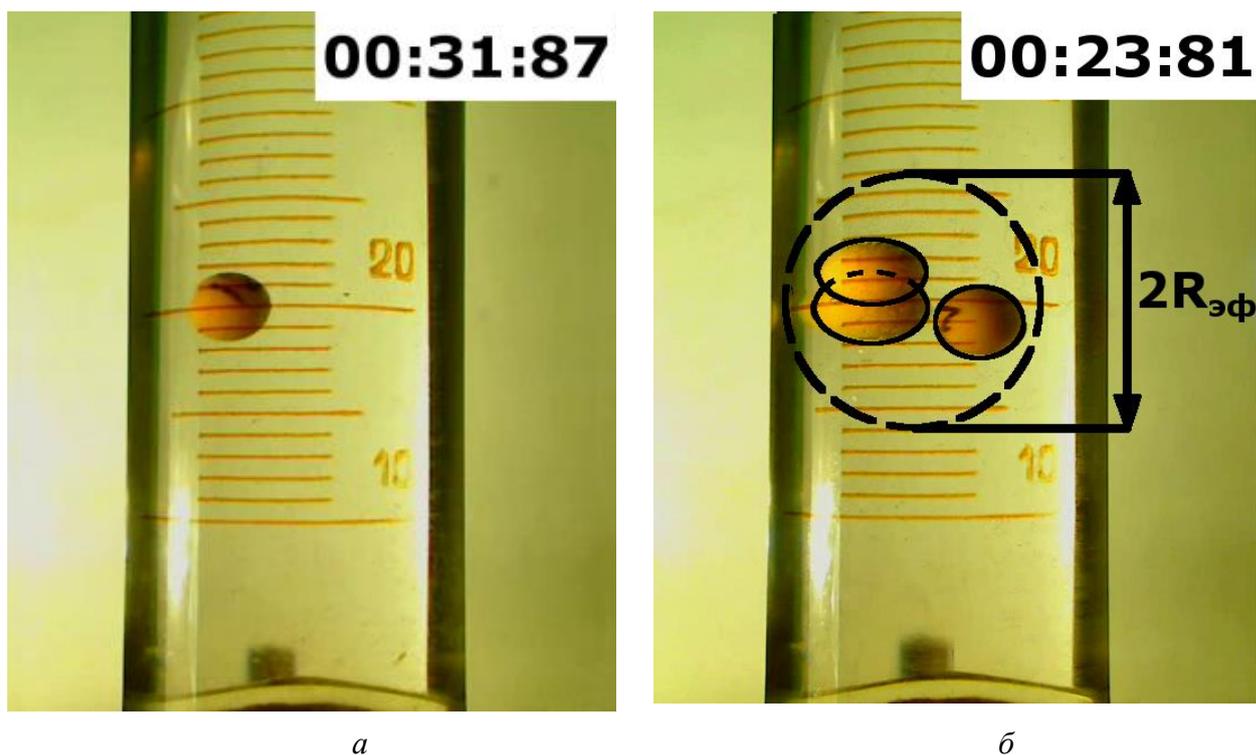


Рисунок 3.14. Фото идентичных положений одного (а) и трех (б) шаров, но в разные моменты времени. Время указано вверху фотографии; метки на цилиндре соответствуют объемным величинам жидкости в мл.

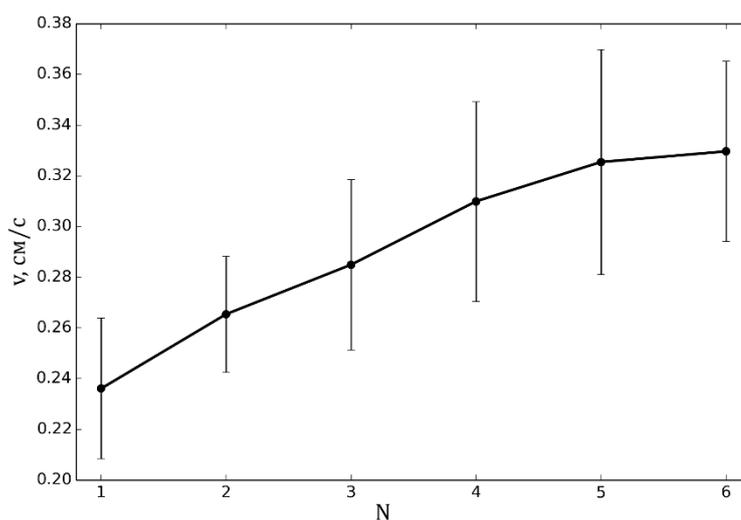


Рисунок 3.15. Экспериментальная зависимость скорости движения центра группы шаров v_{sed} от их количества N в группе. Вертикальные отрезки символизируют среднеквадратичное отклонение σ_v в экспериментальных точках.

Из рисунка 3.15 видно, что с увеличением количества шаров в группе N нелинейно возрастает скорость движения всей группы v_{sed} , однако с каждым дополнительным шаром в группе скорость всей группы увеличивается на меньшую величину. Для оценки достоверности отличия скоростей «соседних» групп (например, попарно скорости седиментации групп из 2 и 3 шаров, или аналогично из 3 и 4 шаров и т.д.) была подсчитана вероятность такого отличия для любых пар групп шаров (Таблица 3.1). При проведении статистических оценок имелось в виду, что любой группе шаров соответствовала статистическая выборка объемом 30 элементов (измерений).

Таблица 3.1

	Вероятность отличия скоростей (P)							
	Количество шаров в группе (N)							
Количество шаров в группе (N)		1	2	3	4	5	6	
	1							
	2	1						
	3	1	0,913					
	4	1	0,998	0,759				
	5	1	1	0,959	0,725			
	6	1	1	0,995	0,928	0,552		

Из Таблицы 3.1 видно, что с увеличением количества шаров в группе N вероятность достоверного отличия скоростей «соседних» групп шаров P снижается (P – probability, вероятность). Так, например, отличие скоростей групп шаров из 6-ти и 5-ти шаров минимально и вероятность составляет $P = 0,552$, однако, сравнение скоростей групп из 6-ти и 4-х шаров дает уже вполне достоверный результат $P = 0,928$. Таблица 3.1 показывает, что, несмотря на замедление скорости роста v_{sed} для центра группы шаров (рис. 3.14), в целом с увеличением N скорость седиментации группы шаров возрастает, оставаясь больше скорости седиментации одиночного шара. Обращает на себя внимание и то, что независимо от количества шаров в группе N все шары группы движутся практически вместе, «коллективно». Данный эффект изображен на рисунке 3.16.

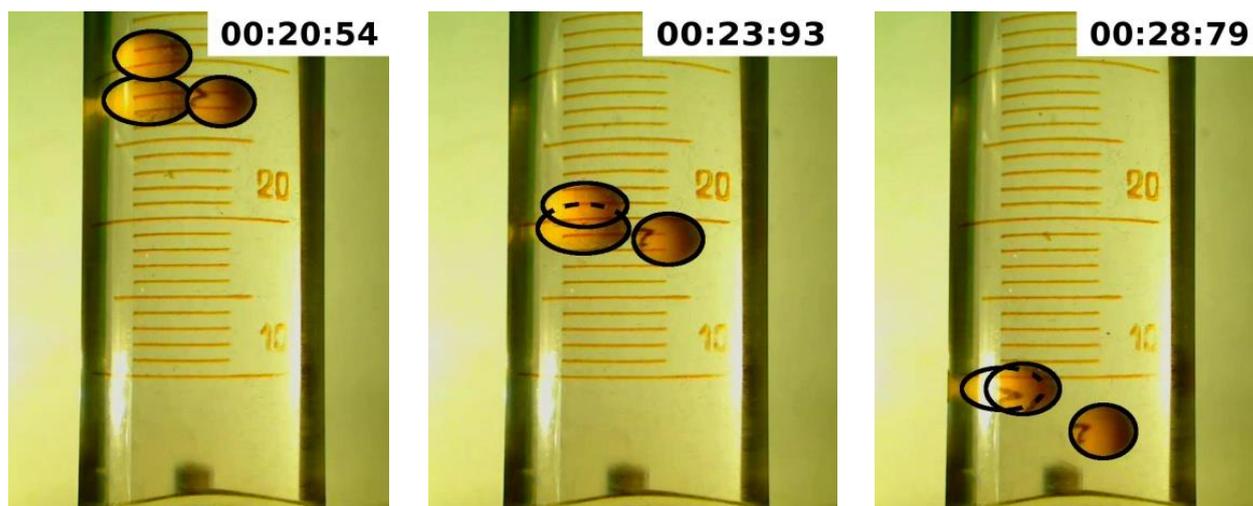


Рисунок.3.16. Фото положений группы из трех шаров в различные моменты времени.

Перед описанием модели седиментации группы шаров поясним понятие "коллективного движения". Если реальные шары значительно удалены друг от друга, то они оседают практически независимо друг от друга. Однако, при уменьшении расстояния между шарами, когда оно соизмеримо или меньше их диаметров, то в этом случае шары оказываются гидродинамически связанными и в этом смысле они оседают коллективно.

Для описания коллективного движения группы шаров в жидкости введем следующую модель – некий виртуальный эквивалентный шар объемом V_{eq} и радиуса R_{eq} , заполненный жидкостью и содержащий группу оседающих идентичных реальных шаров объемом V_b каждый (рис.3.14 б). Очевидно, что объем эквивалентного шара V_{eq} , а, следовательно, и его радиус R_{eq} не должны оставаться постоянными, они должны зависеть от количества шаров в группе N , от радиуса реального шара r_b , а также от их взаимного расположения. В то же время важно отметить, что введенный нами эквивалентный шар не является реальным, непроницаемым шаром: по мере движения шара сквозь него проходит жидкость, однако, количество жидкости в эквивалентном шаре остается величиной постоянной – в силу несжимаемости жидкости ее количество, проникающее в эквивалентный шар равно количеству жидкости, вытекающей из него. Плотность такого эквивалентного шара ρ_{eq} равна:

$$\rho_{eq} = \rho_l + N \left(\frac{r_b}{R_{eq}} \right)^3 (\rho_b - \rho_l) \quad (3.46)$$

Отметим, что величина ρ_{eq} рассчитывалась не как среднее между ρ_b и ρ_l , а с учетом масс шаров и жидкости в объеме эквивалентного шара V_{eq} . Из (3.46) видно, что ρ_{eq} варьируется в пределах $\rho_l \leq \rho_{eq} \leq \rho_b$ в зависимости от числа реальных шаров N ; так, например, при $N = 0$ (отсутствие шаров) $\rho_{eq} = \rho_l$, а при $N = 1$ и $r_b = R_{eq}$ (один сплошной шар), $\rho_{eq} = \rho_b$, то есть эквивалентный шар сплошной с плотностью ρ_b).

Для введенного эквивалентного шара запишем соотношение (3.45) в форме:

$$v_{sed} = \frac{k2gR_{eq}^2(\rho_{eq} - \rho_l)}{9\eta \left(1 + 2.4 \frac{R_{eq}}{R}\right) \left(1 + 3.1 \frac{R_{eq}}{H}\right)} \quad (3.47)$$

где k – коэффициент пропорциональности, введенный как нормировочный множитель для стыковки теоретических результатов с экспериментальными.

Подставим (3.46) в (3.47), получим:

$$v_{sed} = \frac{k2g(Nr_b^3/R_{eq})(\rho_b - \rho_l)}{9\eta \left(1 + 2.4 \frac{R_{eq}}{R}\right) \left(1 + 3.1 \frac{R_{eq}}{H}\right)} \quad (3.48)$$

Для определения скорости v_{sed} по формуле (3.48) необходимо предварительно найти величину R_{eq} (коэффициент k подбирается с учетом экспериментальных результатов). Найдем R_{eq} из следующих соображений. При движении в жидкости любого тела, в частности шара, на него действует сила трения со стороны жидкости. Полагаем, что эта сила описывается формулой Ньютона F_{fr} [69]:

$$F_{fr} = \eta S \frac{\Delta v}{\Delta r} \quad (3.49)$$

где в общем случае S - площадь поверхности контакта любого тела с движущейся жидкостью (или наоборот), а $\Delta v/\Delta r$ – градиент скорости потока жидкости вблизи поверхности S . Применительно к нашей задаче перепишем (3.49):

$$F_{fr} = \eta S_{eq} \frac{\Delta v}{\Delta r} \quad (3.50)$$

Здесь F_{fr} – сила трения, действующая на эквивалентный шар, S_{eq} – площадь поверхности эквивалентного шара, $\Delta v/\Delta r$ – градиент скорости потока жидкости вблизи поверхности S_{eq} . Будем полагать, что площадь поверхности

эквивалентного шара S_{eq} пропорциональна сумме площадей поверхностей, входящих в него реальных шаров S_0 , то есть $S_{eq} = \alpha NS_0$. В этом условии α – коэффициент пропорциональности. Тогда согласно (3.49) можно предполагать, что сила трения, действующая на совокупность реальных шаров, близка к силе трения, действующая на эквивалентный шар. Именно поэтому такой виртуальный шар и был назван эквивалентным, а соотношение $S_{eq} = \alpha NS_0$ будем рассматривать как основу для выбора конкретного значения радиуса эквивалентного шара R_{eq} . Коэффициент α введен для того, чтобы учесть поправку, связанную с течением жидкости внутри эквивалентного шара в силу его транспарентности для жидкости. Действительно, помимо обтекания эквивалентного шара жидкостью, часть ее проходит сквозь эквивалентный шар, создавая при этом дополнительное сопротивление его движению. Как отмечалось выше, коэффициент α должен зависеть от N , r_b , а также от взаимного пространственного расположения шаров в эквивалентном шаре. Для одного шара ($N = 1$) S_{eq} должна быть равным S_0 , т.е. $\alpha = 1$. Однако с увеличением N функция $\alpha(N)$ должна возрастать, оставаясь $\alpha(N) \geq 1$. Тогда из вышеупомянутого условия следует:

$$R_{eq} = r_b \sqrt{\alpha N} \quad (3.51)$$

Проанализируем смысл функции $\alpha(N)$. Из вышеприведенного соотношения $S_{eq} = \alpha NS_0$ следует, что $\alpha(N) = S_{eq}(N)/NS_0 = S_{eq}(N)/S_{\Sigma}(N)$, где $S_{eq}(N)$ – площадь поверхности эквивалентного шара, зависящая от N , и содержащего не только реальные шары, но и жидкость встречного потока. Величина $S_{\Sigma}(N)$ – интегральная площадь поверхностей реальных механических шаров в эквивалентном шаре. Таким образом, величина α определяется соотношением площадей поверхностей эквивалентного и реальных механических шаров; физически она отображает факт наличия дополнительного трения, обусловленного движением встречного потока внутри эквивалентного транспарентного шара.

Подставим (3.51) в (3.48):

$$v_{sed} = \frac{k2gr_b^2\sqrt{N}(\rho_b - \rho_l)}{9\eta\sqrt{\alpha} \left(1 + 2.4 \frac{r_b\sqrt{\alpha N}}{R}\right) \left(1 + 3.1 \frac{r_b\sqrt{\alpha N}}{H}\right)} \quad (3.52)$$

Из (3.52) видно, что для получения теоретической модельной зависимости $v_{\text{sed}}(N)$ (аналог экспериментальной – рис. 3.15) следует предварительно определить коэффициенты k и $\alpha(N)$. Для нахождения численного значения коэффициента k зададим $N = 1$ (один шар), тогда из (3.51) следует, что $\alpha = 1$, а скорость для такого случая известна из эксперимента (рис. 3.15); как результат из (3.52) значение k составит $k = 0.4171$. Далее, для найденного k , задавая в (3.52) различные $N = 1, 2, \dots, 6$ и пользуясь экспериментальными значениями $v_{\text{sed}}(N)$ (рис. 3.15), можно найти зависимость $\alpha(N)$ (Рис. 3.17, график 1). Рост величины $\alpha(N)$ свидетельствует о нелинейном увеличении количества жидкости в объеме V_{eq} по мере роста N .

Аппроксимация той же зависимости $\alpha(N)$, представленная на рисунке 3.17 (график 2), строилась таким образом, чтобы соответствующая кривая максимальным образом совпадала с эмпирическими точками (рис. 3.17, график 1).

Наилучшее совпадение аппроксимации $\alpha(N)$ (рис. 3.17, график 2) с эмпирическими результатами (график 1) оказалось при следующем соотношении:

$$\alpha(N) = N^{\beta}, \quad (3.53)$$

где β – константа, подбираемая для наилучшего совпадения аппроксимации (3.53) с поведением экспериментальной зависимости $\alpha(N)$ – график 1. Изображение этого графика 2 на рисунке 3.17 соответствует $\beta = 0.65$.

Не исключено, что аппроксимация зависимости $\alpha(N)$ посредством иной функции вполне возможна; важно, чтобы подобранная аппроксимация максимальным образом приближалась к поведению функции $\alpha(N)$, найденной с использованием экспериментальных результатов. Кроме того, стоит отметить, что при изменении условий задачи, например, изменения диаметров идентичных шаров в эквивалентном шаре, величина β , а, возможно и вид функции (3.53) претерпит изменение.

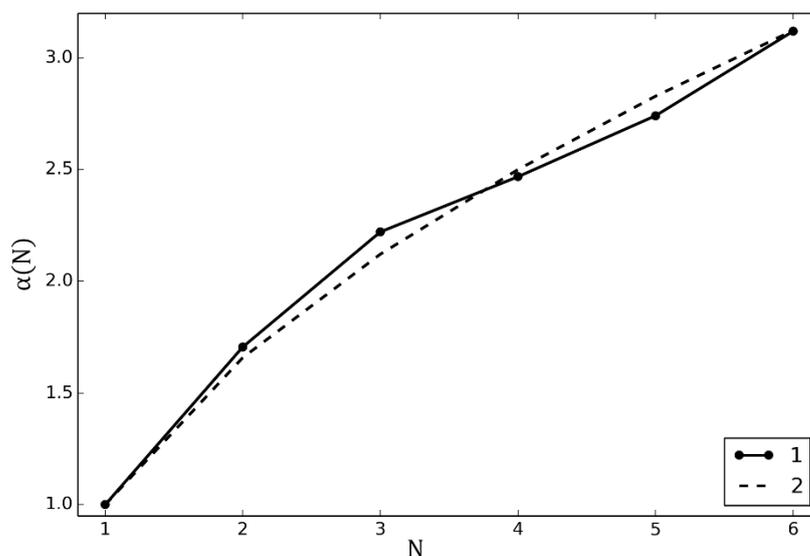


Рисунок 3.17. Зависимость коэффициента α от количества реальных шаров N в эквивалентном виртуальном шаре: а) ломанная кривая 1 соответствует значениям коэффициента $\alpha(N)$, рассчитанного по формуле (б) с использованием экспериментальных результатов v_{sed} (Рис.2), б) кривая 2 - аппроксимации функции $\alpha(N)$.

Подстановка найденного значения \mathbf{k} , а также соотношения (3.53) в (3.52) позволяет определить зависимость скорости седиментации эквивалентного шара, а, следовательно, и всей группы шаров. Сравнение экспериментальных результатов с моделированием проиллюстрировано на рисунке 3.18.

Полученное выражение (3.52) с учетом (3.53) и соответствующие графики на рисунках 3.17 и 3.18 позволяют проанализировать зависимость скорости оседания группы шаров (эквивалентного шара) v_{sed} от их количества N .

Независимо от того, является ли эквивалентный шар прозрачным по отношению к встречному потоку жидкости, $\alpha \neq 1$ (рис. 3.18, кривые 1,2), или нет, $\alpha = 1$ (рис. 3.18, кривая 3), скорость его седиментации, а, следовательно, и группы реальных шаров, возрастает с увеличением числа шаров N в эквивалентном шаре. Однако, механизмы этого явления для эквивалентных шаров V_{eq} этих двух типов (кривые 1,2 или 3) различны.

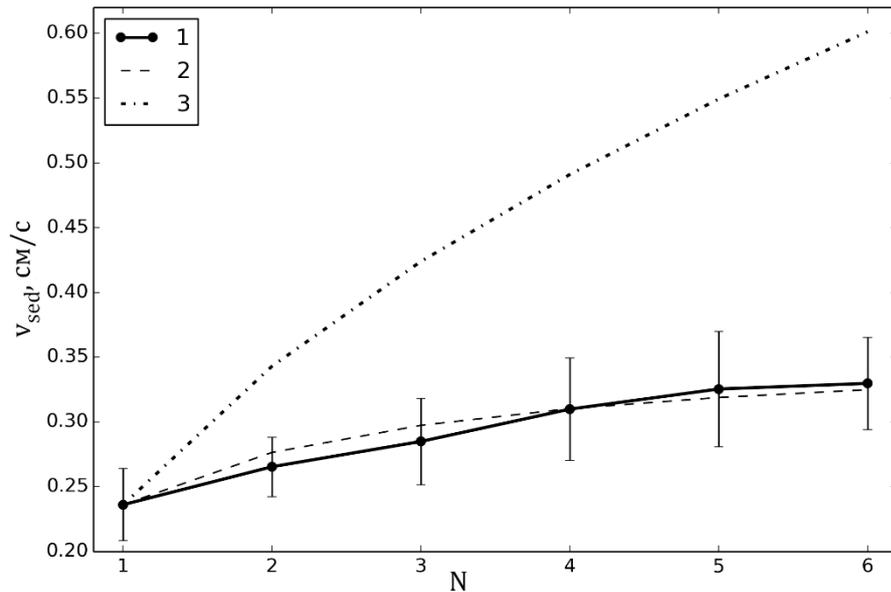


Рисунок 3.18. Зависимость скорости седиментации группы реальных шаров $v_{sed}(N)$ от их количества N ; график 1 – экспериментальная зависимость $v_{sed}(N)$ для эквивалентного транспарентного шара ($\alpha \neq 1$, аналог Рис.2); график 2 – то же, что и график 1, но теоретическая, модельная кривая (формула (9)); график 3 – то же что и график 1, но для эквивалентного не транспарентного шара (формула (9) при $\alpha=1$).

Рассмотрим случай, когда в выражении (3.52) $\alpha=1$ и $N=1$, что соответствует эквивалентному шару, не содержащему жидкости встречного потока и состоящему из одного реального шара. При этом встречный поток жидкости существует, он омывает единственный реальный шар, притормаживая его седиментацию, при этом формула (3.52) с точностью до коэффициента k трансформируется в хорошо известное выражение (3.45).

Если положить в эквивалентном шаре $\alpha=1$, но $N>1$, то (3.52) также трансформируется в (3.45), но при этом виртуальный эквивалентный шар представляет собой некий шар объемом равным совокупности объемов несколько реальных шаров. Увеличение N приводит к увеличению массы эквивалентного шара, а, следовательно, силы, приводящей (в сочетании с силой Архимеда) к оседанию шара, и, как результат, скорости его седиментации (рис. 3.18, кривая 3). Важно отметить, что в такой шар жидкость встречного потока

по-прежнему не входит, поток лишь омывает этот эквивалентный шар, а увеличение N не приводит к изменению его плотности ρ_{eq} .

В общем случае, когда $\alpha > 1$ и $N > 1$, возрастание N в числителе (3.52) увеличивает суммарную массу шаров и, следовательно, увеличивает силу тяжести эквивалентного шара, что должно приводить к росту скорости седиментации такого шара. В то же время, увеличение числа реальных шаров в группе должно приводить к уменьшению расстояния между ними, и, следовательно, к увеличению скорости встречного потока относительно шаров. Тогда должна возрастать сила трения «шары - встречный поток» и, как результат, скорость оседания шаров должна уменьшаться.

Однако, в эксперименте устойчиво наблюдается обратный эффект – с возрастанием числа шаров скорость группы шаров продолжает возрастать (рис. 3.15). Это объясняется следующим образом. С ростом числа шаров N объем эквивалентного шара не остается постоянным, он возрастает даже без учета его прозрачности для потока жидкости $V_{eq} = (4/3)\pi R_{eq}^3 = (4/3)\pi r_b^3 (\alpha N)^{3/2}$. Более того, объем эквивалентного шара V_{eq} испытывает дополнительное увеличение $V_{eq} \sim \alpha(N)$ вследствие его прозрачности для встречного потока (выражение (3.53), рис. 3.18). Как результат, несмотря на увеличение числа реальных шаров N происходит снижение плотности эквивалентного шара ρ_{eq} (3.47) и, соответственно, концентрации реальных шаров в эквивалентном шаре C_b :

$$C_b = \frac{N}{V_{eq}} = \frac{3}{4\pi r_b^3 \sqrt{\alpha^3 N}} \quad (3.54)$$

Последнее эквивалентно увеличению расстояния между реальными шарами, скорость встречного потока относительно этих шаров снижается, уменьшается и сила трения «встречный поток - реальные шары», а скорость седиментации эквивалентного шара, а, следовательно, и реальных шаров, возрастает.

Таким образом, мы приходим к следующему выводу: скорость седиментации частиц зависит не только и не столько от их количества, но и, что

важно, от их концентрации во взвеси (рис. 3.18); или иначе, от расстояния между частицами, сквозь которое протекает встречный поток жидкости.

И, наконец, сделаем два дополнительных замечания:

Кривые 1 и 2 (рис. 3.18) естественно почти совпадают друг с другом, а также с экспериментальной кривой на рисунке 3.15; это обусловлено тем, что аппроксимация $v_{\text{sed}}(N)$ (рис. 3.18, кривая 2) получена с использованием экспериментальных результатов (кривая 1, рис. 3.17 или рис. 3.15).

В то же время сравнение кривых 1 и 2 с кривой 3 на рисунке 3.18 позволяет сделать вывод: присутствие подвижной относительно реальных шаров жидкости в эквивалентном шаре и наличие трения "эквивалентный шар - встречный поток вовне и внутри эквивалентного шара", не смотря на общий рост $v_{\text{sed}}(N)$, в целом приводит к снижению скорости седиментации шаров. Действительно, например, для $N=6$ из кривых 1 и 3 видно, что несмотря на общий рост $v_{\text{sed}}(N)$, за счет вышеперечисленных факторов скорость седиментации шаров снижается примерно вдвое.

Подводя итоги данного раздела, можно сделать следующие выводы:

- 1) модель оседания эритроцитов может быть построена в форме коллективного процесса седиментации совокупности RBC-клеток; при этом приближенно можно представлять эритроцит в виде шара соответствующей плотности с диаметром, при котором RBC-шар имеет объем, равный объему реального эритроцита;
- 2) в данной гематологической задаче совокупность эритроцитов подобно рассмотренным механическим шарам можно рассматривать как монодисперсную среду;
- 3) в отличие от рассмотренного оседания механических шаров при построении модели седиментации эритроцитов чрезвычайно интересно исследовать влияние процесса RBC агрегации на седиментацию крови, то есть тот процесс, который принципиально отсутствует в рассмотренной задаче с механическими шарами;
- 4) при рассмотрении седиментации эритроцитарных агрегатов их приближенно можно представлять также в виде шара определенного диаметра, а

их совокупность подобно рассмотренным механическим шарам можно моделировать как монодисперсную среду;

5) в отличие от рассмотренной модели совокупности механических шаров в виде эквивалентного виртуального шара применительно к эритроцитам или их агрегатам следует рассматривать не эквивалентный шар, а некий эффективный слой (диск), заполненный плазмой (или ее раствором), и содержащий соответствующее количество эритроцитов или/и их агрегатов;

б) межэритроцитарное пространство можно рассматривать как аналог пространства между реальными механическими шарами рассмотренной здесь задачи; при этом встречный поток будет представлять собой раствор плазмы.

3.4.2 Механическая модель седиментации слоя крови

В данном разделе подробно описано создание и апробация механической модели седиментации крови. Цель этой модели – показать и доказать теорию о том, что седиментация крови является коллективным процессом.

В рамках данного раздела также проводился ряд экспериментов, объектом исследования которых были механические пористые диски. Их оседание в растворе глицерина символизировало поведение слоя крови при седиментации. Они изготавливались из композитного материала, в который была добавлена алюминиевая крошка для повышения их плотности, которая подбиралась под условия опытов: диски должны тонуть (оседать) в жидкости, но их скорость не должна быть высокой [76].

Изображение механической модели седиментации (диска) представлено на рисунке 3.19.

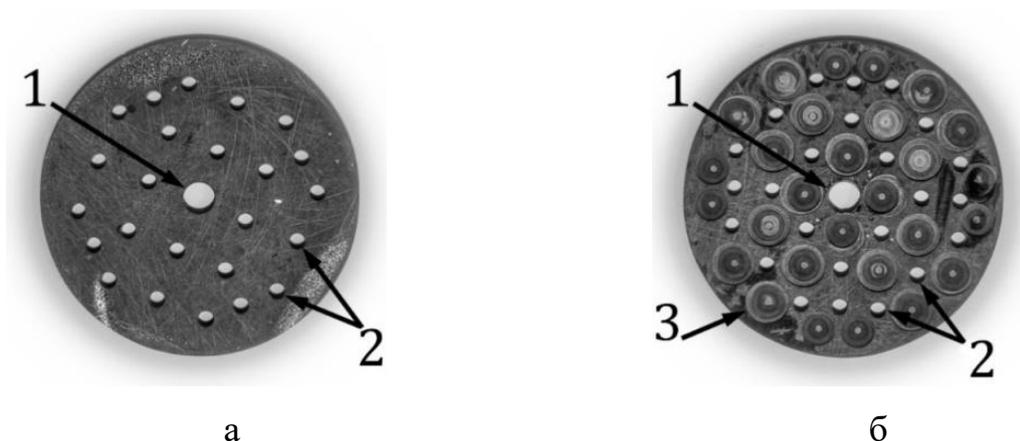


Рисунок 3.19. Изображение механической модели седиментации (диск).
 а – лицевая, (нижняя) сторона; б – обратная (верхняя) сторона.
 1 – техническое отверстие; 2 – сквозные отверстия; 3 – несквозные отверстия.

Наличие сквозных отверстий в диске (не технического) символизирует поры в слое крови. Несквозные отверстия были проделаны с целью сохранения массы дисков при изменении количества или размеров отверстий, то есть процесс изготовления дисков с разными конфигурациями являлся аналогом перераспределения клеток в слое крови. В таблице 3.2 приводятся основные параметры изготовленных дисков, которые принимали участие в экспериментах.

Таблица 3.2.

Характеристики механических дисков.

№	1	2	3	4	5	6	7	8
Масса M , г	24.03	24.02	24.03	24.01	24	24	24.02	24.02
Диаметр D , мм	59.80	59.75	59.70	59.65	59.90	59.85	59.80	59.80
Высота h , мм	8.4	8.5	8.5	8.5	8.60	8.75	8.75	8.85
Диаметр отверстий $d_{оме}$, мм	3.0	3.5	4.0	4.5	3.0	3.0	3.0	3.0
Количество отверстий $N_{оме}$	24	24	24	24	24	44	64	84

По данным, приведённым в таблице 3.2, видно, что в рамках эксперимента есть возможность получить зависимости седиментации как от количества отверстий, так и от их размера – для каждого узкого исследования было изготовлено по 4 диска с соответствующими параметрами. Помимо этого, стоит отметить, что общие параметры (масса, диаметр и высота диска) имеют примерно одинаковые значения для всех дисков.

В рамках данного исследования проводились две серии экспериментов с дисками:

- зависимость седиментации от размера отверстий $d_{\text{отв}}$, при их одинаковом количестве (Таблица 3.2. Диски № 1 – 4);
- зависимость седиментации от количества отверстий $N_{\text{отв}}$, при их одинаковом размере (Таблица 3.2. Диски № 5 – 8).

Стоит отметить, что диски, в которых не было дополнительных несквозных отверстий являлись *базовыми*. Это были диски с максимальным размером отверстий или количеством отверстий.

Регистрация видеороликов оседания дисков происходила с помощью цифровой камеры *Logitech Quick Cam*. Но, в отличие от экспериментов по исследованию седиментации крови, здесь не требовалось дополнительных источников излучения. Запись роликов проводилась в обычном свете, а для анализа кадров использовался чёрно-белый формат так же с целью повышения контрастности.

На рисунке 3.20 представлены кадры, на которых изображены диски с разным количеством отверстий: 24 и 84 соответственно, при их одинаковом диаметре. Время наблюдения на обоих кадрах 9,45 секунды. Разница в положении дисков свидетельствует о значительном отличие в скорости оседания.

С целью повышения достоверности с каждым диском проводились серии по 20 измерений. Как итог, общее количество экспериментов составило 160.

Примеры результатов обработки экспериментальных данных представлены на рисунке 3.21.

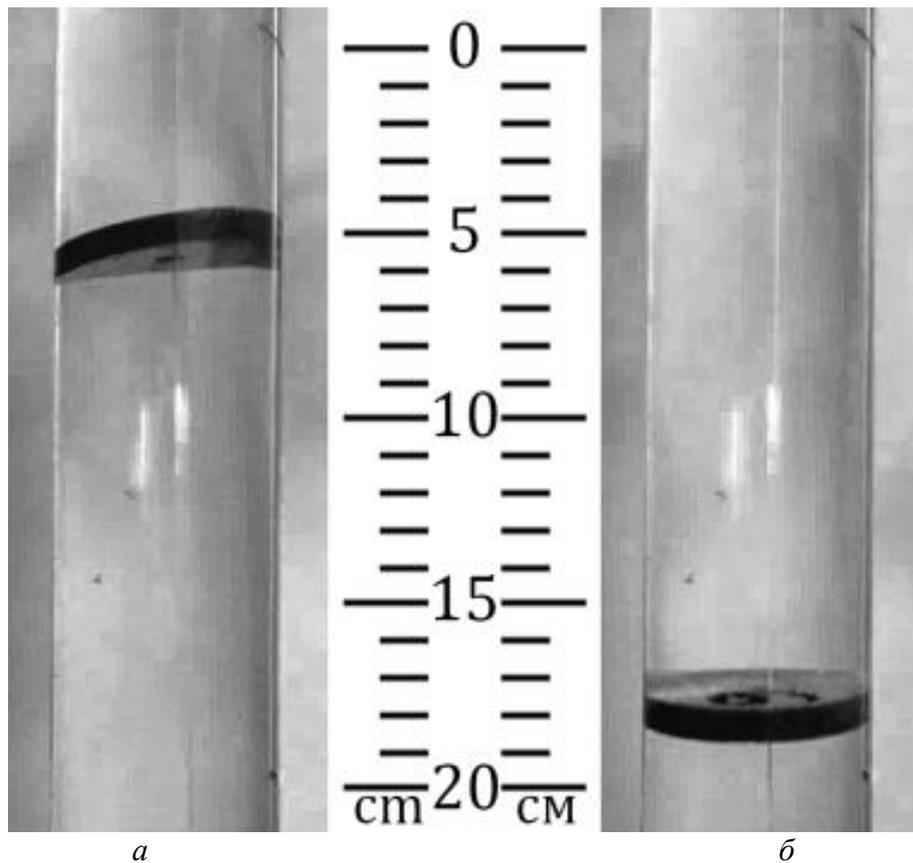


Рисунок 3.20. Результаты экспериментов по определению скорости оседания механического диска
а) $N_{отв} = 24$, б) $N_{отв} = 84$.

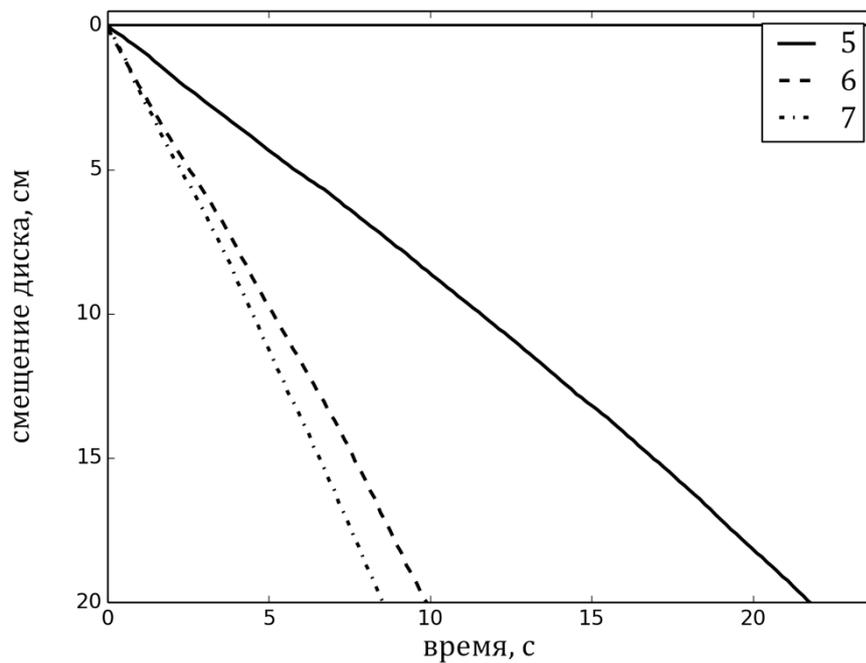


Рисунок 3.21. Графики зависимости смещения механического диска от времени.
5 – $d = 3$ мм, $N = 24$; 6 – $d = 4.5$ мм, $N = 24$; 7 – $d = 3$ мм, $N = 84$.

На рисунке 3.21 отчётливо виден линейный характер движения диска вне зависимости от его конфигурации, так же, как и для слоя крови (рис. 3.2), их оседание равномерно. Однако, сравнивая данные кинетические кривые с аналогичными для растворов крови, этот линейный характер наблюдается на протяжении всего сосуда, то есть закономерно не наблюдается насыщение. По этой причине во время разработки математической модели седиментации дисков скорость их движения условно была постоянной.

Помимо этого, на рисунке 3.21 показано, что при увеличении количества отверстий $N_{отв}$ (рисунок 3.20) или увеличении их размеров $d_{отв}$ повышается скорость оседания. При этом скорости отличались примерно в 3 раза в сравнении с движением диска на рисунке 3.20. Это обусловлено тем, что при возрастании количества или размеров отверстий в диске снижается сила трения встречного потока, что приводит к увеличению скорости оседания.

Рассмотрим теперь математические модели оседания пористых дисков.

В разделе 3.1 настоящей работы было экспериментально показано, что при седиментации крови верхняя граница эритроцитарной массы (граница раздела "седимент-супернатант") смещается равномерно и сохраняет свою горизонтальную ориентацию достаточно длительное время. Именно это являлось одним из ключевых свойств крови при разработке математических моделей в разделе 3.3, а также при создании механической модели. Стоит дополнить уже имеющийся набор физической моделью седиментации. Здесь в качестве объекта будет выступать некий пористый диск, движение которого символизирует движение слоя крови.

Данная модель имеет в своей основе тот же принцип – уравнение баланса сил.

$$Ma = Mg - F_{Арх} - F_{тр}, \quad (3.55)$$

где M – масса диска, a и g – ускорение диска и ускорение свободного падения, $F_{Арх}$ – выталкивающая сила Архимеда, $F_{тр}$ – сила трения, действующая на диск при его взаимодействии с встречным потоком жидкости.

Здесь подробнее стоит рассмотреть силу трения, так как в данном случае она состоит из двух компонент: сила трения встречного потока, движущегося через отверстия и сила трения потока движущегося между стенкой сосуда и внешним краем диска, через так называемое кольцо. Условно эти силы обозначим как $F_{тр.отв}$ и $F_{тр.к}$ соответственно ("отв" – отверстия; "к" - кольцо). Если проводить аналогии с моделью седиментации слоя крови, то сила $F_{тр.отв}$ является прообразом силы трения встречного потока плазмы, протекающей через поры в эритроцитарном слое, а сила $F_{тр.к}$ – силы трения между эритроцитарным диском и стенкой сосуда. Очевидно, эти силы будут приводить к торможению диска во время его оседания. Для того, чтобы оценить величины данных сил введём определённые обозначения для модели диска (рисунок 3.22).

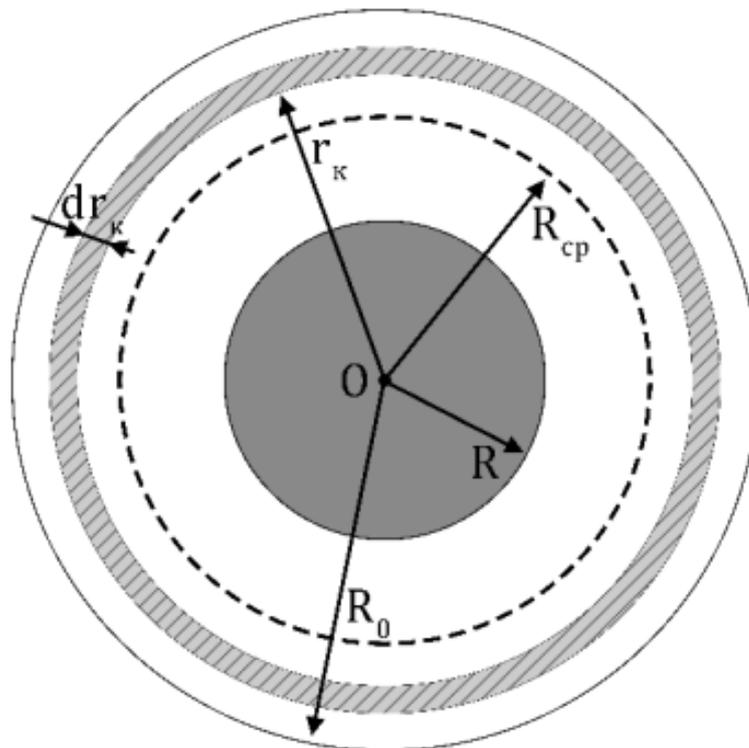


Рисунок 3.22. Схематическое изображение физической модели седиментации (диска).

На рисунке 3.22 изображены следующие составные части модели: цилиндр радиусом R_0 , содержащий жидкость и диск радиусом R , оседающий перпендикулярно плоскости рисунка. Также на данном рисунке показаны

некоторые параметры, необходимые для дальнейшего описания модели: O – центр сосуда и, следовательно, центр диска; R_{cp} – середина кольца; dr – тонкий слой жидкости, который находится между стенкой сосуда и диском; радиус кольца r_k .

Представим в следующем виде выражение для силы трения, действующей на диск со стороны встречного потока, движущегося в кольце:

$$F_{тр.к}(R) = 2\pi\eta h (R_0 - R) \left(\frac{dv_k}{dr_k} \right). \quad (3.56)$$

Здесь h – высота диска; dv_k – величина изменения скорости потока жидкости на промежутке dr_k , находящегося внутри кольца ($R < r_k < R_0$), отношение dv_k/dr_k является градиентом скорости для встречного потока, движущегося через кольцо. В рамках модели учитывается, что величина зазора, образующего кольцо, много меньше радиуса самого диска, поэтому можно полагать, что распределение скорости встречного потока имеет симметричный характер, относительно середины кольца R_{cp} (пунктирная линия на рис. 3.22), что в свою очередь означает, что скорость потока имеет максимальное значение именно в центре кольца.

Рассмотрим теперь выражение для силы трения, которая действует на диск со стороны встречного потока, движущегося через сквозные отверстия.

$$F_{тр.отв} = N_{отв} 2\pi\eta h r_{отв} \left(\frac{dv_{отв}}{dr} \right). \quad (3.57)$$

В данном выражении $N_{отв}$ и $r_{отв}$ – количество и радиус сквозных отверстий, соответственно, $dv_{отв}/dr$ – градиент скорости встречного потока через одно отверстие. Этот градиент можно представить в следующем виде:

$$\frac{dv_{отв}}{dr_{отв}} \approx \frac{v_{отв.max}}{r_{отв}} = 2 \frac{v_{отв.ср}}{r_{отв}}, \quad (3.58)$$

где $v_{отв.max}$ – величина максимальной скорости потока в середине отверстия, $v_{отв.ср}$ – средняя линейная скорость потока, проходящего через отверстие ($v_{отв.ср} \approx v_{отв.max}/2$).

Подставив выражения (3.56) – (3.58) в (3.55), получим:

$$g(\rho_d - \rho_j)(R^2 - N_0 r_0^2) = 2\eta \left[(R_0 - R) \left(\frac{dv_k}{dr_k} \right) + 2N_{\text{отв}} v_{\text{отв.ср}} \right]. \quad (3.59)$$

В правой стороне данного выражения присутствуют величины, взятые из экспериментов – это N_0 и r_0 – количество и радиус сквозных отверстий для **базового** диска. Также в выражении присутствуют величины плотности диска ρ_d и жидкости ρ_j (раствора глицерина), параметры других не базовых дисков: $N_{\text{отв}}$ и $r_{\text{отв}}$ – число отверстий и их радиус.

Это выражение можно расценивать как взаимосвязь скоростей встречного потока, движущегося через отверстия $v_{\text{отв.ср}}$ и через кольцо v_k . Логично предположить, что эти скорости связаны не только между собой, через свои средние величины, но и со скоростью оседания диска $v_{\text{сед}}$. Нахождение этой зависимости и её подстановка в (3.59) позволит получить искомого выражения для определения зависимости скорости оседания диска $v_{\text{сед}}$ от различных свойств диска и экспериментальных условий.

Следующее выражение можно достаточно просто получить из уравнения для баланса потоков:

$$(R^2 - N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2) v_{\text{сед}} = (R_0^2 - R^2) v_{\text{ср.к}} + N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2 v_{\text{ср.отв}}. \quad (3.60)$$

Далее следует найти дополнительное выражение, показывающее связь скоростей $v_{\text{ср.к}}$ и $v_{\text{ср.отв}}$. Его можно получить используя такую величину как гидравлическое сопротивление:

$$\frac{v_{\text{ср.к}}}{v_{\text{ср.отв}}} = \frac{R_0^2 - R^2}{r_{\text{отв}}^2}. \quad (3.61)$$

Выражение градиента dv_k/dr_k из (3.59) можно переопределить следующим образом:

$$\frac{dv_k}{dr_k} = \frac{2v_{\text{ср.к}}}{\sqrt{R_0^2 - R^2}} \quad (3.62)$$

Таким образом, решение вышеупомянутых уравнений (3.59), (3.60) и (3.61) с учётом (3.62) позволяет получить итоговое выражение для описания зависимости скорости оседания диска:

$$v_{\text{сед}} = \frac{g(\rho_{\text{д}} - \rho_{\text{ж}})}{4\eta} \cdot \frac{R^2 - N_0 r_0^2}{R^2 - N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2} \cdot \frac{\frac{(R_0^2 - R^2)^2}{r_{\text{отв}}^2} + N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2}{\left(\frac{(R_0^2 - R^2)(R_0 - R)}{r_{\text{отв}}^2 \sqrt{R_0^2 - R^2}} \right) + N_{\text{отв}}} \quad (3.63)$$

Учитывая условие того, что размер кольца много мал по сравнению с размерами самого диска и сосуда, выражение (3.63) можно упростить и переписать в виде:

$$v_{\text{сед}} = \frac{g(\rho_{\text{д}} - \rho_{\text{ж}})}{4\eta} \cdot \frac{R^2 - N_0 r_0^2}{R^2 - N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2} \cdot \frac{4R_0^2 \Delta R^2 + N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^4}{\Delta R \sqrt{2R_0 \Delta R} + N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2} \quad (3.64)$$

Рассмотрим теперь данную зависимость более подробно, а также сравним результаты моделирования с экспериментальными результатами.

В создании данной модели учитывалась и была реализована взаимосвязь между количеством и размером сквозных отверстий: увеличение количества отверстий приводило к уменьшению их размеров, и наоборот. Она была введена через понятия предельное максимально возможное значение для данных параметров. Такая зависимость является аналогом перераспределения кровяных клеток в монослое, так как их количество в нём не меняется. Но, стоит отметить, что при создании механических дисков она принципиально отсутствовала. В связи с этим математическая модель для оседания дисков имеет две вариации: без наличия связи между величинами $N_{\text{отв}}$ и $r_{\text{отв}}$, и с учётом этой зависимости. Результаты сопоставления моделей и экспериментальных данных представлены на рисунке 3.23.

Рассмотрим теперь отдельно зависимость скорости оседания от размера отверстий. На рисунке 3.23 а видно, что с ростом количества отверстий скорость движения диска увеличивается. Причём этот эффект наблюдается для обеих вариаций данной зависимости и с учётом связи размеров пор с их количеством, и без неё.

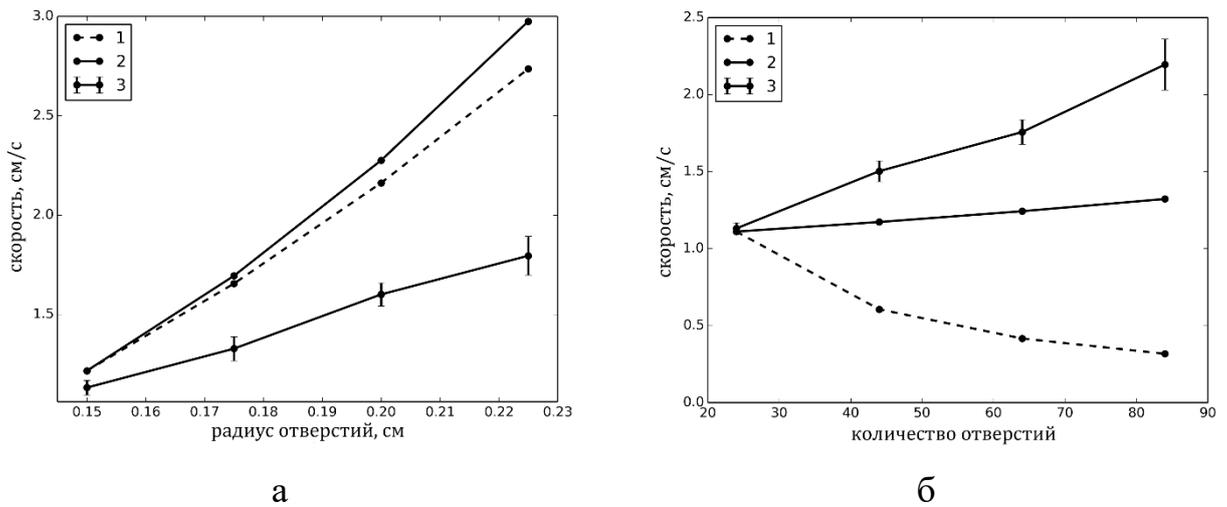


Рисунок 3.23. Сопоставление результатов экспериментов и моделирования оседания механического диска.

а) Зависимость от радиуса отверстия $r_{отв}$.

б) Зависимость от количества отверстий $N_{отв}$.

1 – наличие связи; 2 – отсутствие связи; 3 – экспериментальные данные.

При отсутствии данной взаимосвязи прирост скорости оседания является следствием увеличения площади каждого сквозного отверстия ($S_{отв} = \pi r_{отв}^2$). Это, в свою очередь приводит к снижению в них линейной скорости встречного потока, наличие которого является одним из факторов, тормозящих процесс оседания. Как следствие, присутствует снижение силы трения, что, естественно, приводит к росту скорости оседания (рис. 3.23 а. график 1).

В другом случае, когда взаимосвязь величин $N_{отв}$ и $r_{отв}$ присутствует, то наблюдаются два конкурирующих эффекта. Первый, описанный выше, приводит к снижению силы трения в отверстиях и к увеличению скорости. Другой эффект заключается в том, что количество отверстий $N_{отв}$ уменьшается из-за постоянства общей площади всех отверстий. Данный эффект напротив приводит к увеличению объёмной скорости встречного потока в каждом отдельно взятом отверстии и, как следствие, к увеличению там линейной скорости, что приводит к росту силы трения и снижению скорости оседания. Но, если взглянуть на эти эффекты с точки зрения математических расчётов, то видно следующее: зависимость площади отверстия от его радиуса носит квадратичный характер, а зависимость количества отверстий, так же от их радиуса, – линейный. Как итог,

эффект, связанный с увеличением размеров отверстий, “выигрывает”, что приводит в общем к увеличению скорости оседания диска, хоть и не так интенсивно, как при другой вариации данной модели (рис. 3.23 а, график 2).

Теперь рассмотрим другой вид зависимости скорости оседания – от количества отверстий. На рисунке 3.23 б, в отличие от предыдущей зависимости, наблюдается явное и принципиальное различие между двумя вариациями модели. Без взаимосвязи $N_{омв}$ и $r_{омв}$ увеличение количества отверстий приводит к увеличению суммарной площади всех отверстий, тем самым приводя к снижению объёмной скорости через каждое отдельное отверстие, а, следовательно, к снижению линейной скорости встречного потока в них. Как итог, снижается сила трения внутри каждого отверстия, и возрастает скорость оседания диска (рис. 3.23 б, график 1).

В случае наличия взаимосвязи между $N_{омв}$ и $r_{омв}$ увеличение количества отверстий приводит к уменьшению площади каждого отдельно взятого отверстия, учитывая, что суммарная площадь должна быть постоянной. Это приводит к увеличению линейной скорости встречного потока, проходящего через каждое отверстие, что ведёт к увеличению силы трения и, как итог, к снижению скорости оседания (рис. 3.23 б, график 2).

Для сопоставления результатов моделирования оседания механических дисков и седиментации крови в модель последней были внесены соответствующие изменения. Было также реализовано две вариации: с зависимостью между количеством и радиусом пор и без неё. Логично предположить, что вторая вариация модели является неестественной, так как в действительности связь между этими величинами присутствует. Тем не менее, на рисунке 3.24 изображены зависимости для седиментации крови.

Трактовка поведения кривых на рисунке 3.24 а аналогична тому, что было указано для механических дисков. При увеличении радиуса пор снижается линейная скорость встречного потока, что приводит к снижению силы трения и увеличению скорости седиментации. Вместе с этим при наличии взаимосвязи

между N_p и r_p снижение количества пор не оказывает достаточно влияния на снижение скорости седиментации.

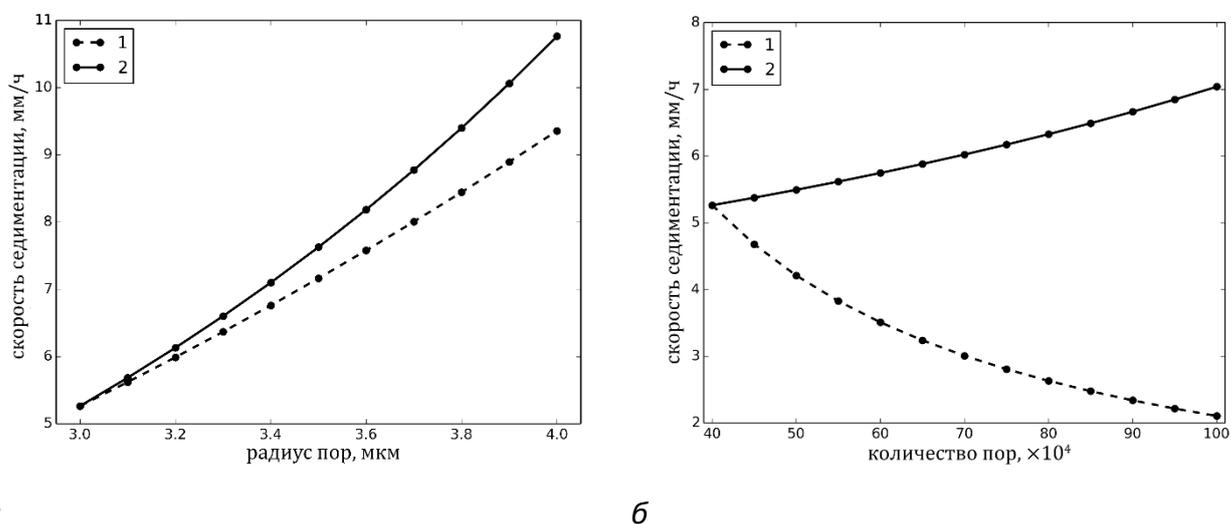


Рисунок 3.24. Сопоставление результатов моделирования седиментации крови. а – зависимость от размера пор; б – зависимость от количества пор. 1 – наличие связи, 2 – отсутствие связи между количеством и радиусом пор (N_p и r_p).

Точно так же, как и для дисков, выглядит трактовка зависимости скорости седиментации от количества пор для кривых на рисунке 3.24б. При наличии связи N_p и r_p имеет место снижение площади каждой отдельной поры, что приводит к резкому возрастанию линейной скорости встречного потока в них. Как следствие – скорость седиментации снижается. Когда связи между данными величинами нет, то увеличение количества пор приводит к увеличению их суммарной площади, что снижает величину объёмного потока в каждой отдельной поре, что также приводит к снижению линейной скорости потока. Результат – повышение скорости седиментации.

Если сравнить попарно графики на рисунках 3.23 и 3.24, то очевидно, что характер соответствующих кривых для седиментации крови и оседания механических дисков совпадает. Из чего можно сделать вывод о правомочности утверждения о том, что монослой крови оседает подобно диску, что является признаком коллективного процесса.

В заключении к данному разделу можно сказать следующее.

Подробно описан процесс создания и апробации механической модели седиментации крови в качестве коллективного процесса. Построена математическая модель для описания оседания пористых дисков. При рассмотрении зависимостей оседания дисков от таких параметров как количество отверстий $N_{отв}$ и их размер $r_{отв}$ стоит отметить вторую. Данная зависимость является более приближенной к седиментации крови, так как при изменении своей структуры в монослое первично меняется именно размер пор, а точнее размер клеточных структур. Количество пор является здесь вторичной характеристикой. Если же рассматривать вариации данной модели, то, естественно, ближе к описанию седиментации крови была модель, которая учитывала взаимосвязь между $N_{отв}$ и $r_{отв}$.

3.5 Выводы

В настоящей главе данной работы был подробно исследован такой процесс как седиментация крови. Были проведены эксперименты, требуемые для более глубокого изучения данной проблемы: седиментация свободных эритроцитов и их агрегатов (раздел 3.1); агглютинатов (раздел 3.2). А также построены и подтверждены математические (раздел 3.3) и механические модели седиментации: как группы клеток в виде эквивалентного шара (раздел 3.4.1), так и для коллективного процесса оседания – механические пористые диски (3.4.2).

Если рассматривать каждый аспект здесь подробно, то:

- построена теоретическая модель седиментации крови в форме коллективного оседания эритроцитов и их агрегатов;
- построены механические модели седиментации крови;
- проведены соответствующие экспериментальные работы, их результаты удовлетворительно совпадают с модельными расчетами;
- показано, что при слабых разведениях крови скорость ее седиментации возрастает с увеличением содержания крови в физиологическом растворе;

- предложено рассмотрение капиллярных эффектов в качестве пусковых основ для старта седиментации крови, показана роль явления агрегации эритроцитов в этом процессе;
- рассмотрение капиллярных эффектов и соответствующие эксперименты позволили описать кинетику оседания крови и ранее обнаруженное движение во встречном потоке эритроцитов, их агрегатов и газовых пузырьков против направления седиментации крови;
- показано, что величина скорости седиментации крови зависит от агрегационной способности эритроцитов – при ее росте возрастает и значение скорости седиментации.

Как итог – экспериментально и с помощью моделирования было доказано, что седиментация крови – коллективный процесс, а скорость седиментации (СОЭ) является многофакторным параметром.

ГЛАВА 4. ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА ОБРАЗЦЫ КРОВИ

В современной клинической медицине ультразвуковые волны применяются во многих сферах [77]: ультразвуковое исследование внутренних органов (УЗИ); доплеровская спектроскопия; ультразвуковая терапия и хирургия. Также актуальны различные исследования, касающиеся применения ультразвука в биомедицине и лабораторной диагностике. Например, для фильтрации бактериальных клеток и их разделения [78 – 82], для управления клетками [83 – 86] и частицами в суспензиях [87, 88]. Одним из таких перспективных направлений является применение ультразвука в биомедицинских иммунологических исследованиях [13, 34, 35, 65, 89 – 91].

Стоит также отметить, что в основе многих тестов медицинской лабораторной диагностики лежат иммунологические методы, главной особенностью которых является применение антител и антигенов *in vitro*. Это справедливо и для АОМ типирования крови. В настоящей главе будет подробно описан механизм воздействия УЗ стоячей волны на исследуемые образцы крови, то есть группировка эритроцитов.

4.1 Экспериментальное исследование влияния ультразвука на процесс группировки эритроцитов

В рамках настоящей диссертационной работы проводились две серии экспериментов. Первая серия была направлена на исследование влияния УЗ стоячей волны на агрегацию и скорость седиментации крови, вторая – на исследование влияния УЗ на процесс агглютинации эритроцитов и их последующую седиментацию, а также сравнение двух случаев исхода реакции агглютинации.

Для начала стоит рассмотреть само понятие ультразвуковой стоячей волны и её специфических характеристик. Стоячая волна представляет собой процесс, возникающий при взаимодействии нескольких когерентных волн характеризующийся почти полным отсутствием переноса энергии и наличием

специфических областей: узлов и пучностей. Эти области характеризуются тем, что в одних случаях (пучности) они являются местом с максимальной амплитудой стоячей волны, а в других случаях (узлы) наоборот – амплитуда стоячей волны в них равна нулю. В экспериментах в данной работе создаётся вертикально ориентированная стоячая волна внутри образца крови. Создание такой волны происходило следующим образом. Сами эксперименты проводились на установке, представленной в главе 2. Кювета с образцом устанавливалась на источник УЗ колебаний (пьезопреобразователь, рис 2.1), между ними находилась водная прослойка для нивелирования потерь при передаче. Сама стоячая волна складывалась из двух волн: прямой, созданной пьезопреобразователем и ориентированной вверх, и обратной, отражённой от верхней границы образца и воздуха и ориентированной вниз. В данном случае потери интенсивности при отражении практически отсутствовали, так как коэффициент отражения близок к единице. Это можно показать следующим образом. Акустическое сопротивление воздуха $Z_{возд} = 417 \text{ Па} \times \text{с/м}$, а для образца данное значение близко к значению для воды, то есть $Z_{обр} = 15 \times 10^5 \text{ Па} \times \text{с/м}$. Коэффициент отражения можно определить по следующей формуле:

$$R = \frac{(Z_{обр} - Z_{возд})}{(Z_{обр} + Z_{возд})} = \frac{I_{отр}}{I_{пад}}, \quad (4.1)$$

где $I_{отр}$ и $I_{пад}$ – интенсивности падающей и отражённой волны на границе раздела образец-воздух. Из расчёта следует, что $R \approx 0,9994$, то есть интенсивности $I_{отр}$ и $I_{пад}$ можно считать равными.

Процесс группировки эритроцитов происходит за счёт действия на них радиационной силы, порождаемой стоячей волной, – эритроциты вытесняются из области пучностей, перемещаются и скапливаются в области узлов. Радиационная сила, или сила радиационного давления, – это сила, действующая на взвешенные частицы среды в направлении распространения ультразвуковой волны [92]. В зависимости от состава образца в узлах происходит индуцированная агрегация или агглютинация эритроцитов. На цифровых фото

рисунка 4.1 показано расслоение образца с течением действия на него УЗ стоячей волны.

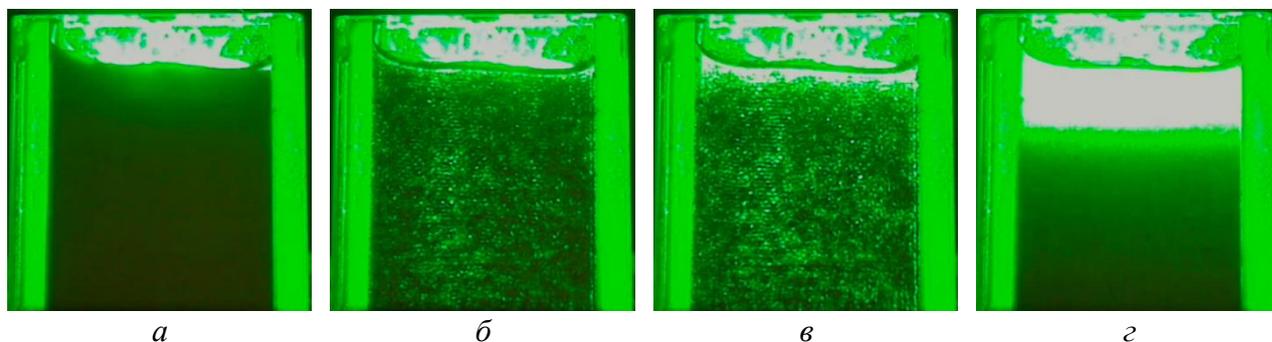


Рисунок 4.1. Динамика группировки эритроцитов стоячей ультразвуковой волной для случая отсутствия реакции агглютинации.

Временные отметки относительно момента включения ультразвука:

а) $t = 0$ с, б) $t = 10$ с, в) $t = 20$ с, г) $t = 120$ с

На рисунке 4.1б можно видеть расслоение образца: появление периодических светлых полос, соответствующих зонам пучностей, и означающих наступление оптимальной группировки, а рисунок 4.1 в демонстрирует наличие крупных агрегатов в узлах стоячей волны. Данный момент времени соответствует избыточной для группировки длительности воздействия ультразвуком – наблюдается также нарушение периодической структуры, перегруппировка. Стоит отметить, что после прекращения УЗ воздействия такие агрегаты начинают достаточно быстро оседать, в следствие чего рассыпаются, происходит дезагрегация, взвесь образца перемешивается за счёт этих процессов, становится однородной, как и до включения УЗ, что легко видеть по сравнению рисунков 4.1а и 4.1г. Этот комплекс процессов является в свою очередь причиной того, что при УЗ воздействии увеличивается скорость седиментации, но только в моменты после отключения этого воздействия.

Во время изучения влияния УЗ на седиментацию эритроцитов и их ассоциатов (агрегатов, агглютинатов) было выявлено следующее. Возникает достаточно чёткая граница между седиментом и супернатантом для первой серии экспериментов без агглютинирующих агентов. На рисунке 4.2 показано

расположение границы седиментации при УЗ воздействии различной длительности для образца с цельной кровью.

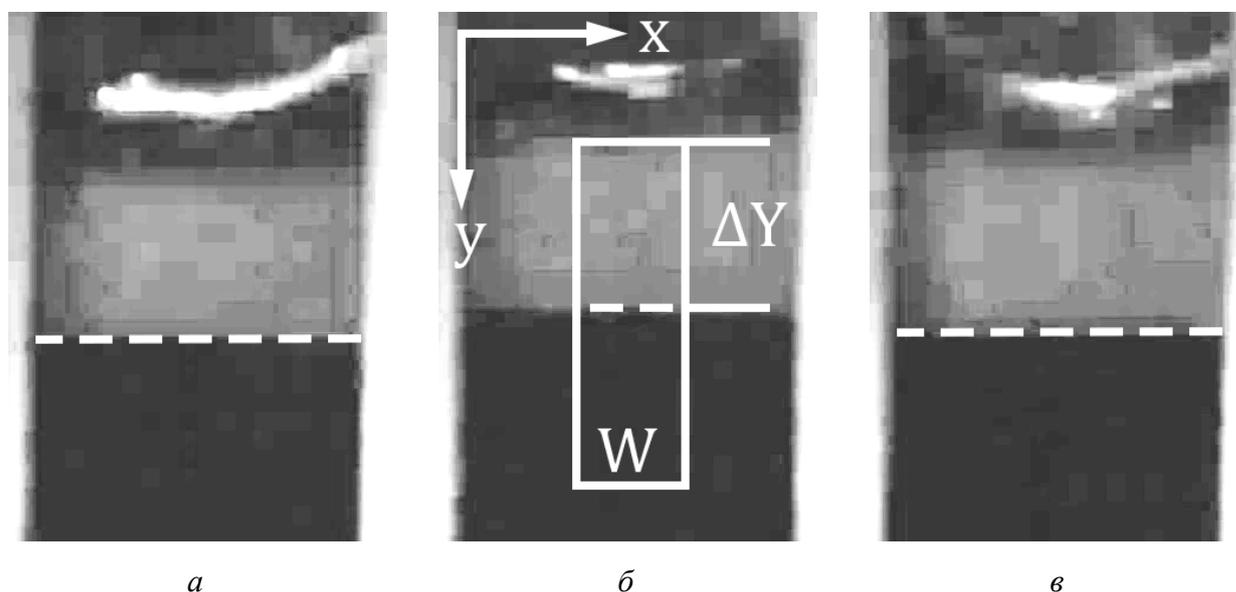


Рисунок 4.2. Изображения образцов с цельной кровью после воздействия стоячей УЗ волной при изменении времени действия (а – 30 с, б – 60, в – 90 с). Все изображения соответствуют моменту времени в 60 с после отключения УЗ.

Граница раздела сред показана пунктирной линией на фото рисунка 4.2. Заметим, что во второй серии экспериментов (влияние УЗ на агглютинацию) такая граница отсутствует принципиально, что в свою очередь затрудняет анализ седиментации. Также на рисунке 4.2 показана зона обработки W и уровень надосадочной жидкости ΔY , по которому определялась скорость седиментации.

На рисунке 4.3 показаны другие вариации экспериментальных результатов – зависимость седиментации от концентрации крови в образцах при одинаковом времени УЗ воздействия длительность 60 секунд.

В ходе проведения экспериментов были получены кадры, подобные рисункам 4.2 и 4.3. В ходе их обработки были получены зависимости скорости седиментации от концентрации.

Как было доказано и показано в главе 3 настоящей работы, процесс седиментации эритроцитов и их агрегатов является коллективным, а само

движение слоя клеток и их комплексов – равномерным, поэтому скорость седиментации была рассчитана по формуле:

$$v_{\text{сед}} = \Delta Y / t \quad (4.1.1)$$

Результат обработки представлен на рисунке 4.4.

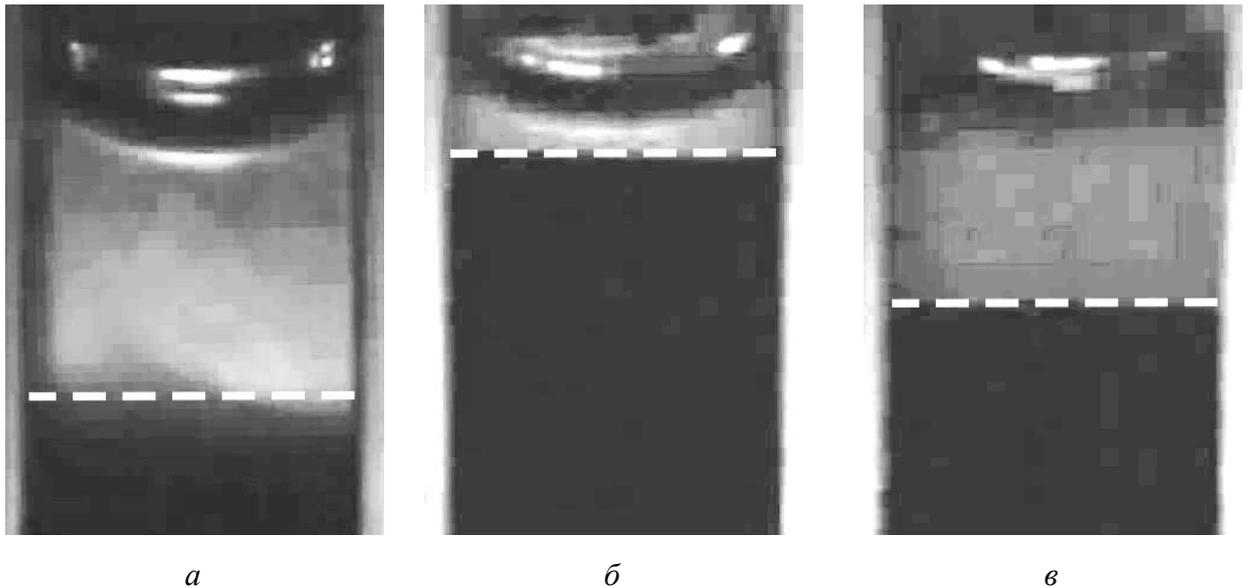


Рисунок .4.3 Изображения образцов после воздействия стоячей УЗ волной при изменении содержания крови.

a – 1%, б – 30%, в – 100%.

Все изображения соответствуют моменту времени в 60 с после отключения ультразвука.

Стоит отметить, что при низких значениях концентрации крови в образцах разница между случаями отсутствия и наличия УЗ воздействия не столь велика. Это обусловлено тем, что клеточная среда сильно разрежена, что препятствует образованию как спонтанных, так и индуцированных агрегатов.

Скорость седиментации так же увеличивается и в противоположной ситуации – при приближении концентрации крови в образцах к её нормальному значению для цельной крови (рис. 4.4 кривая 1), но здесь причина увеличения скорости седиментации иная – спонтанное формирование эритроцитарных агрегатов приводит к увеличению расстояния между ними.

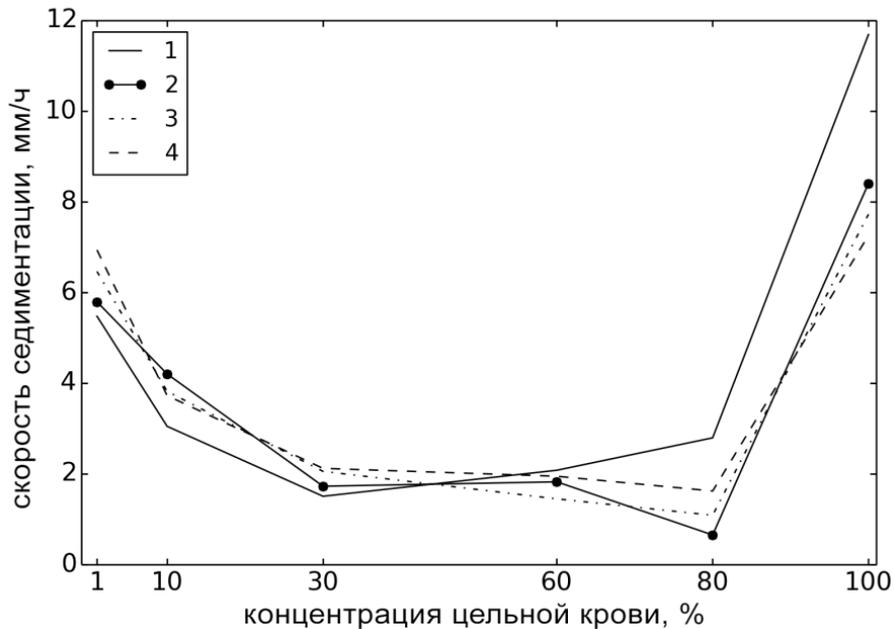


Рисунок 4.4. Иллюстрация зависимостей скорости седиментации крови от ее содержания в образцах при разных временах УЗ воздействия t .
 1 – $t=0$ (без УЗ действия); 2 – $t=30$ с; 3 – $t=60$ с; 4 – $t=90$ с.

Концентрация крови в образце выше 80% приводит к возрастанию вероятности образования крупных агрегатов. Чем выше концентрация крови, тем выше вероятность образования и размеры агрегатов. Образование агрегатов приводит к увеличению расстояния между ними, так как эритроциты, находящиеся в составе агрегата, примыкают друг к другу более плотно, чем, если бы это были свободные, не агрегирующие друг с другом, эритроциты, расположенные в том же объёме. Как следствие – снижение линейной скорости встречного потока плазмы и увеличение седиментации крови [74]. Влияние УЗ на кровь здесь также более заметно: в присутствии стоячей волны процесс агрегации происходит индуцировано. Скорость седиментации так же возрастает в сравнении с более низкими значениями концентрации от 30 до 80 %.

Однако, при сравнении образцов с одинаковой концентрацией в диапазоне 80 – 100 % при различных режимах УЗ воздействиях и без него, было выявлено, что глобально ультразвук приводит к снижению скорости седиментации. Многочисленные наблюдения за процессом группировки эритроцитов в поле

стоячей волны и последующей седиментацией показали, что сразу после прекращения воздействия ультразвуком происходит резкое, кратковременное оседание крупных агрегатов, что создаёт встречный поток, одновременно с этим происходит дезагрегация этих крупных клеточных комплексов. Как следствие, взвесь крови в образцах перемешивается, движение свободных эритроцитов становится неупорядоченным, так как наличие встречного потока приводит к появлению турбулентности. Для того, чтобы равномерная седиментация началась вновь, требуется определённый интервал времени, в течении которого будет нивелирована турбулентность, а также будет заново происходить весь комплекс процессов (глава 3), который приводит к началу седиментации: наличие капиллярных эффектов в зазоре между образцом и стенками кюветы и спонтанная агрегация эритроцитов. При этом образец будет вести себя так же как образец с той же концентрацией крови без УЗ воздействия. На графиках рисунка 4.4 в области 80 – 100% проиллюстрирован этот эффект с точки зрения скорости седиментации. Движение эритроцитов и их агрегатов равномерное, из-за этого скорость седиментации определялась по изменению положения границы раздела седимент-супернатант в начале наблюдения и в конце. Скорости седиментации при УЗ воздействиях (графики 2 – 4) по значению ниже, но их характер схож с графиком 1, где УЗ воздействие отсутствовало. Это означает, что при расчётах скорости седиментации расстояние, на которое сместилась граница раздела относительно было примерно одним и тем же, тогда как интервал времени был увеличен из-за эффекта "перемешивания" образцов после УЗ воздействия. То есть при малых разведениях образца ультразвук выступает в качестве некоего тормозящего фактора. Но на графиках 2 – 4 видно, что итоговая скорость седиментации становится выше с возрастанием времени воздействия стоячей волной. Этот эффект можно трактовать так: индуцированные агрегаты могут седиментировать ещё до отключения УЗ из-за своих размеров и массы, соответственно, чем дольше воздействие, тем больше образуется таких крупных агрегатов.

Рассмотрим теперь влияние стоячей УЗ волны на протекание реакции агглютинации в образцах с цоликлонами. В последующих экспериментах на седиментацию крови влияют уже два внешних фактора: ультразвуковая стоячая волна, индуцирующая агрегацию, и наличие гемагглютинирующих агентов, приводящих к образованию агглютинатов при соответствии между цоликлоном и группой крови образца (Таблица 1.2). Эксперименты проводились на установке, описанной в главе 2. Их отличием от предыдущих, описанных выше, является пробоподготовка – часть физраствора была заменена необходимым объёмом цоликлона, который добавлялся к образцу непосредственно перед началом регистрации. Объёмы компонент определялись следующим образом: соотношение между объёмами цельной крови и цоликлоном должно составлять 1 : 10; концентрация цельной крови в образце – 2%; оставшаяся часть объёма – физиологический раствор. Кюветы, используемые в данных экспериментах, имели размеры 5×18×32 мм, зондирующий луч от светодиода падал на большую грань (18×32 мм). Процесс цифровой видеорегистрации начинался спустя 10 секунд после добавления цоликлона в образец, спустя ещё 10 секунд – только для случаев с УЗ – на протяжении 50 секунд производилось ультразвуковое воздействие на образец.

Во время действия стоячей волны на образцы наблюдалось расслоение, описанное выше, для обоих случаев (положительная и отрицательная реакция агглютинации). Значительные отличия между такими образцами начинали проявляться во второй половине временного интервала УЗ воздействия. При положительной реакции образуются эритроцитарные комплексы (агглютинаты) намного крупнее и устойчивее индуцированных агрегатов, что приводит к их преждевременному и значительно более быстрому оседанию. В то время как при отрицательной реакции весь процесс практически не отличается от случая, когда в образце отсутствуют гемагглютинирующие агенты. Это приводит к тому, что в значительной степени отличаются скорости седиментации и, следовательно, скорости просветления образцов. На рисунке 4.5 продемонстрированы исходы

всех 4 возможных комбинации факторов: наличие положительной реакции и УЗ воздействия.

По изображениям на рисунке 4.5 можно сделать следующие выводы касемо процессов группировки и седиментации.

Рассмотрим сначала изображения для отрицательной реакции агглютинации.

Наличие в исследуемых образцах границы раздела "седимент-супернатант" не зависит от того, было ли УЗ воздействие. Она является тем объектом, по смещению которого возможно судить о скорости седиментации.

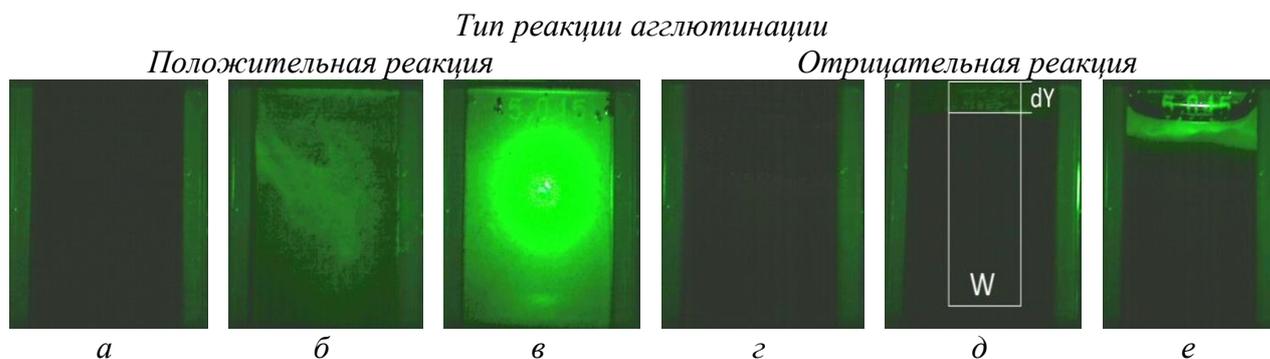


Рисунок 4.5. Изображения образцов крови для положительной и отрицательной реакции агглютинации без ультразвукового действия на биообъект и при участии ультразвука. а) и г) – начальные изображения. Фото б) и д) – отсутствие УЗ воздействия, время 14 и 54 мин. соответственно. Фото в) и е) – присутствие УЗ воздействия, время 4 и 31 мин. соответственно.

W – зона компьютерной обработки фотоизображений; ΔY – смещение границы «супернатант - седимент».

Сравнение рисунков 4.5д и 4.5е показывает, что в данных случаях УЗ воздействие способно увеличить скорость седиментации. Наблюдения показали, что частичное оседание достаточно крупных агрегатов начиналось ещё до отключения ультразвукового воздействия. Стоит так же отметить, что это ускорение седиментации имело место быть только во время воздействия на образец. В остальном седиментация в таких парах образцов не отличалась.

В дополнение к этому можно так же отнести и задержку перед началом седиментации в образцах, не находящихся под ультразвуковым воздействием. В

среднем время задержки составляло порядка 700 секунд. Такой эффект можно объяснить, основываясь на экспериментальных наблюдениях: формирование границы "седимент-супернатант" и ее движение начинается только тогда, когда порция раствора плазмы встречным потоком поступит вверх вдоль стеклянных стенок кюветы по отношению к направлению движения эритроцитов и их агрегатов и расположится над слоем эритроцитарной массы.

Теперь рассмотрим изображения для положительной реакции агглютинации.

В силу наличия достаточно крупных агглютинатов граница раздела "седимент-супернатант" отсутствует для образцов аналогичных тому, что показан на рисунке 4.5в. Данные изображения необходимо обрабатывать иным способом, который будет описан далее.

Сравнивая рисунки 4.5в и 4.5г можно сделать некоторые выводы, основываясь не на положении границы раздела, а на степени просветления образцов. Очевидно, что присутствие обоих факторов – УЗ воздействия и наличия в образце соответствующего цоликлона – в значительной степени ускоряет седиментацию крови (рис. 4.5 в). Группировка эритроцитов приводит к тому, что практически все клетки оказываются в составе агглютинатов, и, как показали наблюдения за образцами после экспериментов, после оседания клеточных комплексов образец становится прозрачным.

Методика цифровой обработки изображений для случаев, в которых присутствует граница раздела "седимент-супернатант" такая же, как и описанная в разделе 3.1. Вкратце напомним, в чём она заключалась.

На цифровых изображениях (кадрах) выделялась зона W размером 5×20 мм (рис. 4.5 д), в рамках которой оно преобразовывалось в двумерный массив яркости каждого пикселя B (brightness; $0 < B < 255$ ед. яркости) только для зелёной компоненты. После этого полученный массив подвергался преобразованию и обработке (раздел 3.1). Результатом обработки каждого кадра являлось значение Y в миллиметрах положения границы раздела "седимент-

супернатант". Наблюдение в динамике за положением этой границы при покадровом анализе видеоролика позволяет определить скорость седиментации крови в исследуемом образце $v = \Delta Y / \Delta t$ (мм/мин).

Естественно, что такой способ не подходит для обработки экспериментальных видеороликов для образцов, в которых отсутствовала граница раздела – случаи, когда сочетались положительная реакция агглютинации и УЗ воздействие. Стоит отметить, что формирование и седиментация крупных агглютинатов происходит на 10 – 20 секунде после включения ультразвукового воздействия, в результате чего взвесь в образце представляет собой не однородную массу с чётко выделенной границей сверху, а дискретную структуру. Для таких роликов был использован дополнительный способ обработки. Учитывая также, что клеточные комплексы разной конфигурации оседают с разной скоростью, определение скорости седиментации предложено определять как скорость изменения интегральной площади S , которую занимают все клеточные структуры внутри зоны обработки W . Очевидно, что по мере оседания крови её площадь внутри зоны W будет уменьшаться, поэтому её изменение можно считать функцией, зависимой от времени t . Тогда производную такой функции $\Delta S / \Delta t$ можно принять за скорость седиментации. Такое заключение является основой для разработки алгоритма преобразования кадров, который будет описан далее по тексту и изображен на рисунке 4.6.

Для каждого кадра алгоритм преобразования представлял следующий порядок действий.

На кадре выделялась зона обработки W размером 5×20 мм по аналогии с предыдущим способом (рис. 4.6 1а). Далее происходило преобразование изображения в зоне W в двумерный массив, состоящий из значений величины яркости B каждого пикселя в зелёной компоненте.

Экспериментально определялось значение средней яркости для клеточных структур B_{cp} и среднее значение яркости для фона, то есть области свободной от

клеточных комплексов B_{ϕ} . После этого создавалось вспомогательное изображение с размером равным зоне W и значением яркости всех пикселей равным B_{ϕ} .

Далее к каждому кадру строилось искусственное эквивалентное изображение, фоном и основой которого является вспомогательное изображение. Построение проводилось следующим образом.

Задавалось некоторое пороговое значение $B_{\text{пор}}$ так, что $B_{\text{эр}} < B_{\text{пор}} < B_{\phi}$, после чего подсчитывалось количество пикселей $N_{\text{эр}}$, соответствующих клеточным комплексам, то есть их яркость $B < B_{\text{пор}}$. Отдельные эритроциты не могли быть распознаны из-за сравнительно малых размеров и недостаточного разрешения экспериментальной установки. От кадра к кадру величина $N_{\text{эр}}$, естественно, последовательно становилась меньше (рис. 4.6 1а – 4а).

Далее происходил "перенос" пикселей соответствующих клеточным комплексам на вспомогательное изображение. Отметим, что по отношению к изображению процесс переноса происходил снизу вверх, а каждому перенесённому пикселю присваивалось минимальное значение яркости. В результате этого процесса в нижней части вспомогательного изображения формировалась область, обозначающая седимент, а в верхней части фон – супернатант (рис. 4.6 1б).

Следуя тому же алгоритму создавались искусственные пары (рис. 4.6 1б – 4б) ко всем остальным кадрам видеоролика, содержащим дискретную хаотичную структуру из эритроцитарных комплексов (рис. 4.6 1а – 4а), при учёте того, что площадь тёмной нижней части искусственных изображений соответствует площади всех клеточных комплексов на реальных кадрах.

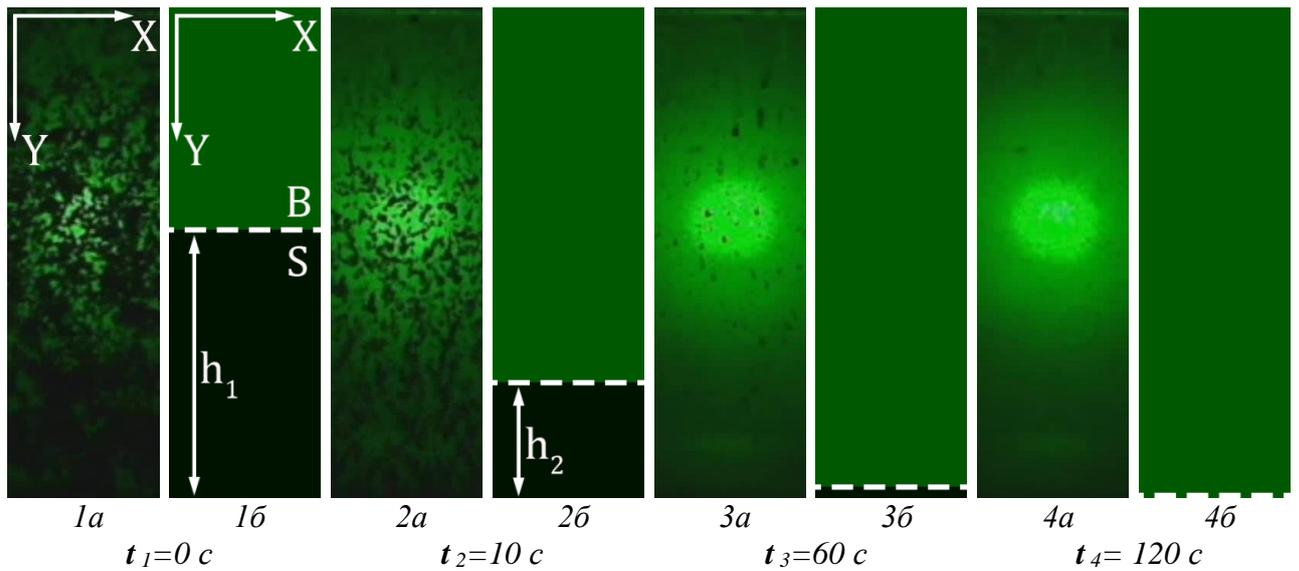


Рисунок 4.6. Изображения зоны W на кадрах регистрации после ультразвукового облучения для положительной реакции агглютинации.

a – фото дискретных структур эритроцитарных комплексов; $б$ – искусственные изображения.

Время t отсчитывается от момента выключения ультразвука.

В результате преобразования кадров, на которых отсутствовала чёткая граница раздела "седимент-супернатант" были получены искусственные изображения с чёткой границей. После чего искусственные изображения подвергались обработке способом, описанном ранее, по аналогии с реальными кадрами с выраженной границей раздела сред.

Результатом обработки кадров являются графики, изображённые на рисунке 4.7. Графики a , $б$, $в$ соответствуют случаям, когда граница раздела имела место быть, а график $г$ – результат анализа искусственных изображений. Тем не менее все они позволяют оценить и определить скорость седиментации во всех случаях.

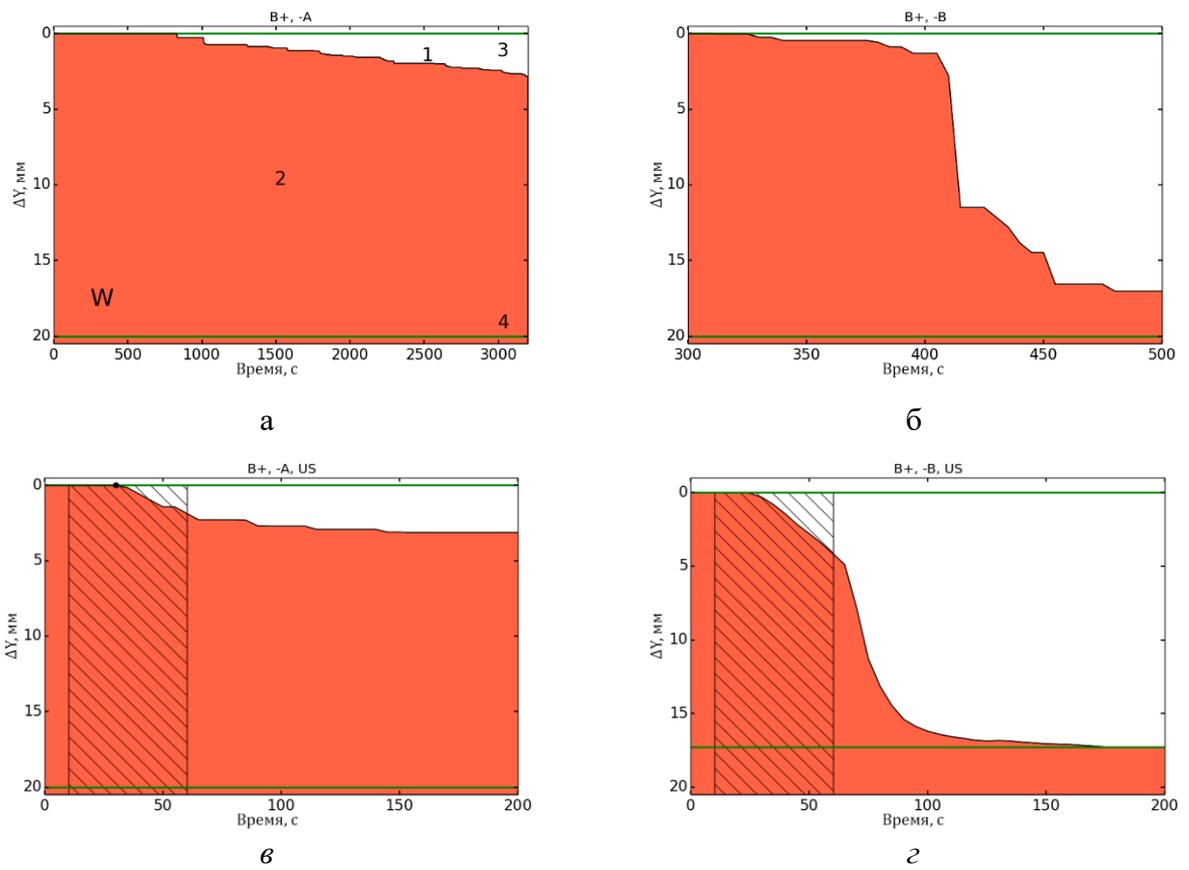


Рисунок 4.7. Зависимость смещения границы "седимент-супернатант" от времени. а – без УЗ, отрицательная реакция; б – без УЗ, положительная реакция; в – с УЗ, отрицательная реакция; г – с УЗ, положительная реакция агглютинации. 1 – супернатант (раствор плазмы); 2 – седимент (эритроцитарная масса), 3 – линия, соответствующая мениску жидкости в кювете – начало отсчета уровня седиментации крови, 4 – линия, соответствующая нижнему краю зоны W. Заштрихованная область – интервал времени УЗ воздействия.

Из рисунка 4.7 видно, что минимальные величины смещения границы "седимент-супернатант" показывают случаи, в которых реакция агглютинации имела отрицательный характер (рис. 4.7 а, в). На значительное увеличение скорости седиментации не повлияло ультразвуковое воздействие. Рисунок 4.7 в свою очередь отображает возрастание скорости седиментации, но только во время воздействия: происходит оседание крупных индуцированных агрегатов, образовавшихся во время группировки эритроцитов. В сравнении рисунков 4.7 а и в можно заметить, что после прекращения воздействия на образец скорость смещения границы снижается (рис. 4.7 в) и её характер становится схожим со случаем без ультразвукового воздействия (рис. 4.7 а). Это говорит о том, что в

этих случаях отсутствовали факторы, являющиеся причинами образования крупных эритроцитарных ассоциатов, более быстрое движение которых определяло бы скорость седиментации.

При рассмотрении графика смещения границы для случая с положительной реакцией агглютинации, но без воздействия ультразвука, так же, как и для случая с отрицательной реакцией, наблюдается некоторая задержка перед началом седиментации (рис. 4.7б) примерно равная 350 секундам, что вдвое быстрее, чем в случае с отрицательной реакцией. Это можно описать следующим образом. При концентрации содержания цельной крови в образце равной 2% расстояние между эритроцитами в среднем превышает их размеры в 2 – 3 раза, что в значительной степени снижает вероятность того, что эритроциты окажутся в непосредственной близости для осуществления взаимодействия антиген-антитело, то есть для образования агглютинатов. Тем не менее спонтанное движение клеток во взвеси образца приводит к образованию сначала небольших агглютинатов, а затем и более крупных. Образование последних в свою очередь является началом седиментации. Схожее явление наблюдалось на рисунке 4.7в – седиментация началась ещё во время действия ультразвука, то есть начали оседать сформированные крупные агрегаты.

Лавинообразный вид смещения границы на рисунке 4.7 б объясняется тем, что во время седиментации агглютинаты сталкиваются с другими комплексами и клетками, что приводит к их объединению, как следствие к образованию более крупных ассоциатов и значительному увеличению их скорости седиментации. В то же время, снижение скорости движения границы через некоторое время означает, что во взвеси присутствуют ассоциаты меньших размеров, которые не были увлечены другими, быстро оседающими комплексами, а их скорость седиментации выше, чем у отдельных, свободных эритроцитов.

Как было отмечено ранее по тексту, для случая положительной реакции агглютинации с воздействием ультразвука потребовалось дополнительное преобразование кадров из экспериментальных роликов. в силу отсутствия на них

чёткой границы раздела "седимент-супернатант". В следствие чего на рисунке 4.7г на оси ординат так же отложена величина смещения границы, но в данном случае – это величина относительная, так как график зависимости был построен по данным обработки искусственных изображений.

На рисунке 4.7г так же присутствует лавинообразный вид смещения границы. Здесь происходит комбинированное действие стоячей волны и наличия в образце соответствующего типа цоликлона. Сгруппированные под действие ультразвука эритроциты агглютинируют друг с другом, в результате чего образуются особо крупные клеточные комплексы, размер которых по площади может доходить до размеров среза кюветы. Естественно, что такие крупные агглютинаты не могут быть удержаны в состоянии левитации стоячей волной и начинают оседать с высокой скоростью. Также не исключено присутствие эффекта, который был описан при объяснении смещения границы для рисунка 4.7 б – объединение агглютинатов во время седиментации.

Результаты расчёта скорости седиментации, усреднённые по всем образцам, приведены в таблице 4.1. Заметим, что для случаев, когда была явно различима граница раздела "седимент-супернатант", величина скорости седиментации определялась по формуле $v = \Delta Y / \Delta t$, в которой использовались данные, полученные после обработки экспериментальных результатов. Величина Δt определялась как время от начала седиментации до её завершения. То есть налом отсчёта было отделение границы от мениска. Как было показано, этот процесс может начаться с достаточной задержкой в несколько минут (рисунок 4.7 а, б), или же ещё во время ультразвукового воздействия на образец (рисунок 4.7 в).

В тех случаях, когда граница отсутствовала, скорость седиментации определялась по той же формуле, но являлась эквивалентом $v_{\text{ЭКВ}}$, в силу того, что для её нахождения использовались не действительные кадры, а их искусственные аналоги.

Стоит отметить, что приведённые в таблице 4.1 усреднённые значения скорости седиментации крови в образцах дают лишь качественную, сравнительную оценку данной величины. Это связано с влиянием множества индивидуальных свойств образцов на значения скорости оседания, а также экспериментальных факторов и подхода к её оцениванию.

Таблица 4.1

Сведения о скорости седиментации для различных условий пробоподготовки и эксперимента

Объект	Характер объекта	Содержание объекта в образце (%)	Время действия ультразвука (с)	Средняя скорость седиментации объекта (мм/мин)	
				v	v _{экв}
Цельная кровь	Разведение физраствором	0.25	-	v	0.09
			30-90		0.12
		30-50	-		0.03
			30-90		
		100	-		0.2
			30-90		0.14
Цельная кровь + Цоликлон	Отрицательная реакция агглютинации	2 + 20	-	v _{экв}	0.07
		2 + 20	50		0.8
	Положительная реакция агглютинации	2 + 20	-		6
		2 + 20	50		14

По значениям из таблицы 4.1 можно сделать следующие выводы.

При отсутствии в образцах гемагглютинирующих агентов ультразвуковое воздействие достаточно слабо влияет на величину скорости седиментации. В большей степени эта величина зависит от концентрации цельной крови в образце. Минимальное значение приходится на интервал концентраций 30 – 50 % и составляет 0,03 мм/мин. Изменение концентрации в большую или меньшую сторону приводит к увеличению значения данной величины. Оценки для крайних значений концентрации составляют 0,12 мм/мин для концентрации 0.25% и 0,14 мм/мин – для 100% (цельная кровь).

Для случаев с образцами, в которых присутствуют гемагглютинирующие агенты, влияние ультразвука более значительно. При отрицательной реакции

скорость седиментации в присутствии стоячей волны возрастает более, чем на порядок – с 0,07 мм/мин до 0,8 мм/мин. Как было описано выше в текущем разделе, такой эффект является результатом образования крупных индуцированных агрегатов.

Что касается случаев с положительной реакцией агглютинации, то здесь наблюдается увеличение скорости более, чем в два раза – с 6 мм/мин до 14 мм/мин ($v_{\text{экв}}$).

Но, с точки зрения принципов, на которых основан АОМ, более важным будет сравнение скорости седиментации при ультразвуковом воздействии двух случаев с различным исходом реакции агглютинации. Таким образом получим соотношение величин скоростей седиментации $v_{\text{экв}}/v \approx 18$.

Данное обстоятельство обуславливает достаточно высокий уровень разрешающей способности АОМ и, как следствие, достоверности результатов типирования крови.

4.2 Теоретическое моделирование процесса группировки эритроцитов в поле УЗ стоячей волны на основе принципа коллективного процесса

В предыдущем разделе было описано влияние стоячей ультразвуковой волны на скорость седиментации крови в образцах с её различной концентрацией. Теперь рассмотрим более подробно сам механизм группировки эритроцитов в поле стоячей волны. Основной задачей здесь является прояснение механизма протекания группировки эритроцитов и определение оптимального времени для наступления данного эффекта. Естественно, он будет описан с точки зрения коллективного процесса (глава 3, раздел 4.1).

Как было описано в предыдущем разделе, по отношению к образцу стоячая волна представляет собой чередование зон (узлов и пучностей) которые поочерёдно располагаются поперёк направления распространения этой волны. На рисунке 4.8 представлено схематичное строение стоячей волны и радиационной силы внутри образца.

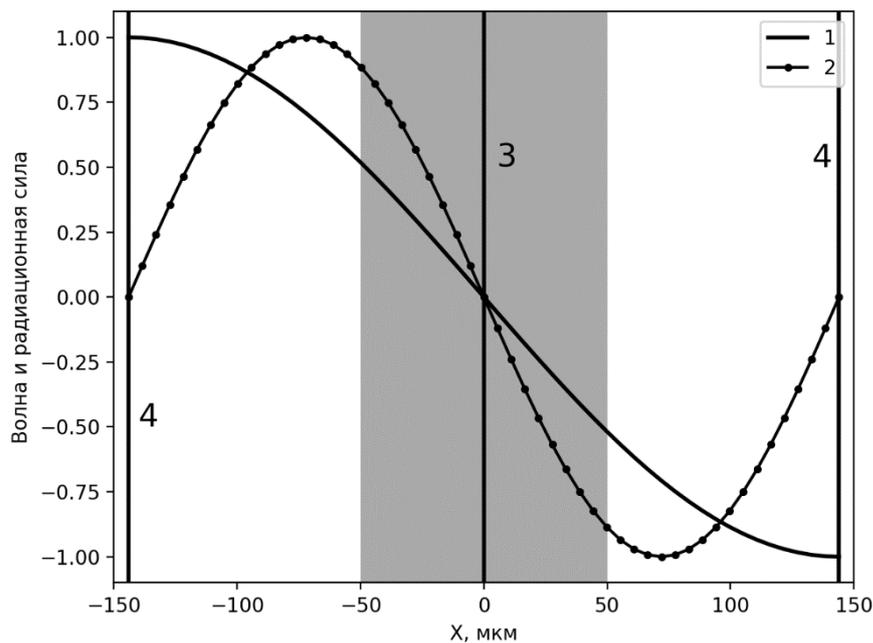


Рисунок 4.8. Схематичная иллюстрация стоячей волны внутри образца.

1 – стоячая волна; 2 – радиационная сила; 3 – узел (0); 4 – пучности.

Выделенная область – примерное место скопления клеток при группировке.

Напомним, что наличие узлов и пучностей обусловлено интерференцией волны со своим отражением, в данном случае от границы образца и воздуха. Это справедливо, так как коэффициент отражения от данной границы $R \approx 0,9994$ (раздел 4.1). Области, в которых происходит сложение абсолютных максимумов волны с абсолютными максимумами её отражения – пучности, а области, в которых обе волны проходят через нуль – узлы. В результате сложения этих двух волн возникает радиационная сила, которая зависит не только от амплитуды и частоты волны, но и от того, в какой части волны рассматривается действие данной силы на эритроциты. Как показано на рисунке 4.8 радиационная сила изменяет свои значения периодически, так как она была порождена периодическим процессом. Она принимает максимальные значения в области пучностей и равна нулю в области узлов.

В ходе описания и моделирования процесса группировки будем следовать принципу коллективного подхода по аналогии с главой 3 настоящей работы. Монослой или система эритроцитов в нём моделируется как квазисплошной

«эритроцитарный» диск с цилиндрическими отверстиями внутри, радиусы которых одинаковы, они определяются размерами межклеточных расстояний, а, следовательно, концентрацией эритроцитов в растворе. Для расчёта величины радиационной силы, действующей на единичный свободный эритроцит, используем следующее выражение:

$$F_p = - \left[\frac{P_0^2 V \beta_0}{2\lambda} \right] \cdot \left[\frac{5\rho - 2\rho_0}{2\rho + \rho_0} - \frac{\beta}{\beta_0} \right] \cdot \sin\left(\frac{4\pi X}{\lambda}\right), \quad (4.2)$$

где P_0 – амплитуда акустического давления, V – объём движущейся частицы (эритроцита), λ – длина УЗ волны, ρ и ρ_0 – плотности клетки и окружающей среды, β и β_0 – их сжимаемости, X – расстояние между частицей и узлом давления УЗ волны. Как видно из этого выражения – максимум величины радиационной силы приходится на ту часть между узлом и пучностью, в которой производная волны также принимает максимальные значения. Выделим узкий слой жидкости $\Delta X \ll \lambda$, в котором эритроциты расположены горизонтально в виде монослоя. Заметим, что эквивалентный размер эритроцита (шар) имеет диаметр примерно 5.5 мкм, а длина волны ультразвука составляет 577 мкм. Предположим, что на монослой эритроцитов действует сила, равная сумме радиационных сил, действующих на каждую клетку в этом слое:

$$F_\Sigma = \sum F_p = -N_{\text{эр}} \left[\frac{P_0^2 V \beta_0}{2\lambda} \right] \cdot \left[\frac{5\rho - 2\rho_0}{2\rho + \rho_0} - \frac{\beta}{\beta_0} \right] \cdot \sin\left(\frac{4\pi X}{\lambda}\right), \quad (4.3)$$

где $N_{\text{эр}}$ – количество эритроцитов, содержащихся в монослое.

Запишем уравнение баланса сил, действующих на эритроцитарный монослой:

$$M_d a = F_\Sigma + M_d g - F_{\text{Арх}} - F_{\text{тр}}, \quad (4.4)$$

здесь M_d – масса эритроцитарного диска, a , g – ускорение движения диска и свободного падения соответственно, F_Σ – радиационная сила, $F_{\text{Арх}}$ – сила Архимеда, $F_{\text{тр}}$ – сила трения, действующая на систему эритроцитов в диске.

Масса диска определяется как произведение его объёма V_d на плотность ρ_d , которые в свою очередь определяются следующим образом: (Приложение. Формулы 4.5; 4.6).

Здесь $r_{эр}$ – радиус модели эритроцита (шар), R – радиус диска, h – высота диска, $\rho_{эр}$ – плотность эритроцита, $\rho_{ж}$ – плотность жидкости, в которой содержатся эритроциты (раствор плазмы крови). Отметим, что в (4.6) в массе диска M_d учитывается не только плотность эритроцитов и их количество в диске, но и плотность и количество жидкости (раствор плазмы), омывающей эритроциты.

Сила Архимеда, действующая на слой клеток, выражается как: (Приложение. Формула 4.7).

Сила $F_{тр}$ – сила трения, действующая на боковые внутренние поверхности отверстий в дисках - трубок тока (следовательно, на эритроцитарный диск в целом) со стороны пристеночных слоев жидкости, движущихся против направления, седиментации крови. Здесь стоит учесть то факт, что в настоящей модели не учитывается наличие кольца (раздел 3.3.2), так как рассматриваются случаи с достаточно малым содержанием крови в образце (до 3%). Выражение для силы трения тогда можно представить в виде: (Приложение. Формула 4.8).

В (4.8) $\eta_{ж}$ – коэффициент вязкости жидкости, протекающей сквозь отверстия (поры) в диске (раствор плазмы крови); $N_{отв}$ – количество отверстий в диске, $S_{отв,бок} = 2\pi r_{отв} h$ – площадь боковой поверхности отверстия в диске (трубки тока жидкости); $r_{отв}$ – радиус отверстия в эритроцитарном диске (радиус поры) $dv/dr_{отв}$ – градиент скорости потока жидкости вблизи стенки трубки тока (канал поры); k_I – поправочный коэффициент, учитывающий отличие отверстий (пор) в диске от цилиндра (величина k_I определяется из эксперимента), $N_{отв}$ – количество отверстий в диске.

Известно, что распределение скорости течения слоев жидкости в поперечном сечении трубки тока носит квадратичный характер с максимумом скорости на оси цилиндрической трубки и практически нулевой скоростью

вблизи ее стенки. Однако, для простоты оценок полагаем, что распределение скорости в сечении трубки тока является линейным, симметричным относительно оси трубки с максимумом скорости в ее центре v_{max} . Тогда величина градиента скорости внутри поры: (Приложение. Формула 4.9).

где $v_{сред}$ – средняя скорость течения жидкости в трубке тока ($v = v_{max}/2$).

Подставим (4.9) в (4.8), получим: (Приложение. Формула 4.10).

Перепишем уравнение баланса сил (4.4) с учетом F_{Σ} и (4.10): (Приложение. Формула 4.11).

В уравнении (4.11) v – скорость движения эритроцитарного диска (эритроцитов), а $v_{сред}$ – средняя скорость встречного потока сквозь отверстия в эритроцитарном диске, создающего сопротивление движению диска (эритроцитов). В полученном выражении два неизвестных. Следует найти связь между v и $v_{сред}$.

Количество жидкости, вытесняемой реальным эритроцитарным диском (без учета пор, заполненных окружающей жидкостью) Q_1 : (Приложение. Формула 4.12).

В (4.12) $S = \pi(R^2 - N_{отв} r_{отв}^2)$ – площадь диска (без учета отверстий), выталкивающей жидкость при его движении в цилиндре. Это количество жидкости распределяется и протекает через отверстия (поры в эритроцитарном диске): (Приложение. Формула 4.13).

Полагаем, что жидкость несжимаема, тогда $Q_1 = Q_2$, получим тогда: (Приложение. Формула 4.14) или для скорости $v_{сред}$: (Приложение. Формула 4.15).

Подставим (4.15) в (4.11):

$$M_d(dv/dt) = F_{\Sigma} + M_d g - F_{Арх} - k_1 N_{отв} \eta_{ж} 4\pi h v \left[\left(R^2 / N_{отв} r_{отв}^2 \right) - 1 \right] \quad (4.16)$$

Введем следующие обозначения:

$$A = F_{\Sigma} / M_d, \quad (4.17)$$

$$B = F_{Арх} / M_d, \quad (4.18)$$

$$D = \frac{k_1 N_{\text{отв}} \eta_{\text{ж}} 4\pi h \left[\left(\frac{R^2}{N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2} \right) - 1 \right]}{M_{\text{д}}}. \quad (4.19)$$

Преобразования выражения (4.16) приведены в приложении (Формулы 4.20 – 4.31). По итогу получим:

$$\frac{A + g - B}{D} - v = 0 \quad (4.32)$$

С учетом (4.22) получаем: $v = v_0$. Тогда смысл v_0 – это скорость "стационарного" движения эритроцитарного слоя после экспоненциального временного набора скорости (кинетики движения диска на малом участке ΔX). Однако, надо понимать, что скорость v_0 имеет определенное достигнутое значение лишь на участке ΔX . На другом соседнем подобном участке скорость v_0 будет другой, то есть $v_0(X)$ – функция X . Покажем это:

$$v_0 = \frac{A + g - B}{D} \quad (4.33)$$

Подставим в (4.33) A , B и D :

$$v_0 = \frac{-N_{\text{эр}} \left[\frac{P_0^2 V \beta_0}{2\lambda} \right] \cdot \left[\frac{5\rho - 2\rho_0}{2\rho + \rho_0} - \frac{\beta}{\beta_0} \right] \cdot \sin\left(\frac{4\pi X}{\lambda}\right) + g - \pi\rho_{\text{ж}} g R^2 h}{k_1 N_{\text{отв}} \eta_{\text{ж}} 4\pi h \left[\left(\frac{R^2}{N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2} \right) - 1 \right]} \quad (4.34)$$

Из (4.34) видно, что на каждом малом отрезке ΔX скорость v_0 своя, она определяется в соответствии с гармоническим законом, по которому изменяется величина радиационной силы.

Итак, имеем соотношения (4.18) B и (4.19) D , а, следовательно, (4.33) для v_0 , в которых $N_{\text{отв}}$ и $r_{\text{отв}}$ – взаимосвязанные неизвестные величины. Если найти соотношение между ними, например, $N_{\text{отв}}(r_{\text{отв}})$ и одну из величин, например, $r_{\text{отв}}$ задать, то, подставив результат в соотношения (4.17, 4.18 и 4.19) можно найти скорость v_0 . Для рассматриваемого монослоя (диска) площадь, занимаемая жидкостью, составляет:

$$S_{\text{ж}} = S_{\text{д}} - S_{\text{эр}} = \pi(R^2 - N_{\text{эр}} r_{\text{эр}}^2) \quad (4.35)$$

где $S_{\text{эр}}$ – сумма максимальных площадей поперечных сечений сферических моделей эритроцитов. Поделим найденную площадь монослоя $S_{\text{ж}}$ на число

отверстий модели $N_{\text{отв}}$, результат будет означать максимальную площадь, приходящуюся на одну пору в монослой модели. Тогда можно записать:

$$\pi(R^2 - N_{\text{эп}}r_{\text{эп}}^2)/N_{\text{отв}} = \pi r_{\text{отв}}^2 \quad (4.36)$$

Откуда $N_{\text{отв}}$ оказывается равным:

$$N_{\text{отв}} = \left(\frac{R}{r_{\text{отв}}}\right)^2 \times (1 - k_2 2\pi c r_{\text{эп}}^3) \quad (4.37)$$

здесь $c = N_{\text{эп}}/\pi R^2 h$ – концентрация эритроцитов в растворе крови. При получении (4.37) полагалось, что высота слоя $h = k_2 2r_{\text{эп}}$, а коэффициент $k_2 \gg 1$, учитывая, что высота (толщина) монослоя значительно превышала диаметр эритроцита, т.е. $h \approx \Delta X \gg 2r_{\text{эп}}$. Оценим величину $r_{\text{отв}}$. Можно полагать, что $2r_{\text{отв}} = L = \sqrt[3]{c^{-1}}$, где L – среднее межклеточное расстояние (для раствора крови считаем, что $r_{\text{RBC}} \ll L$). Тогда (4.37) можно переписать:

$$N_{\text{отв}} = (2R\sqrt[3]{c})^2 \times (1 - k_2 2\pi c r_{\text{эп}}^3) \quad (4.38)$$

Подставляя (4.38) и $r_{\text{отв}} = \frac{1}{2} \cdot \sqrt[3]{c^{-1}}$ в формулы (4.17, 4.18 и 4.19) можно рассчитать скорость $v_0(X)$. В то же время для расчета потребуются следующие величины: $P_0 = 27$ КПа; $\lambda = 0,576 \cdot 10^{-3}$ м; $\rho \approx 1,092 \cdot 10^3$ кг/м³; $\rho_0 = 1,0045 \cdot 10^3$ кг/м³; $\beta_0 = 4,58 \cdot 10^{-10}$ Па⁻¹; $\beta = 3,48 \cdot 10^{-10}$ Па⁻¹.

Данная модель имеет набор выходных зависимостей. Начнём с представления о том, как движутся под действием радиационной силы слои образца с разной начальной координатой, то есть при различном удалении от узла стоячей волны. Такие результаты представлены на рисунке 4.9.

На данном рисунке изображены кинетические кривые движения слоёв. По ним отчётливо виден периодический характер зависимости смещения, а, следовательно, и скорости, от координаты X : чем ближе слой к координате с максимальной величиной радиационной силы, тем быстрее он движется. Здесь также доказывается для модели следующее условие: движущийся монослой не смешивается с другими монослоями, то есть его движение можно рассматривать,

как коллективный процесс, в котором участвуют только те клетки, которые входят в его состав согласно его структуре и геометрии (раздел 3.3).

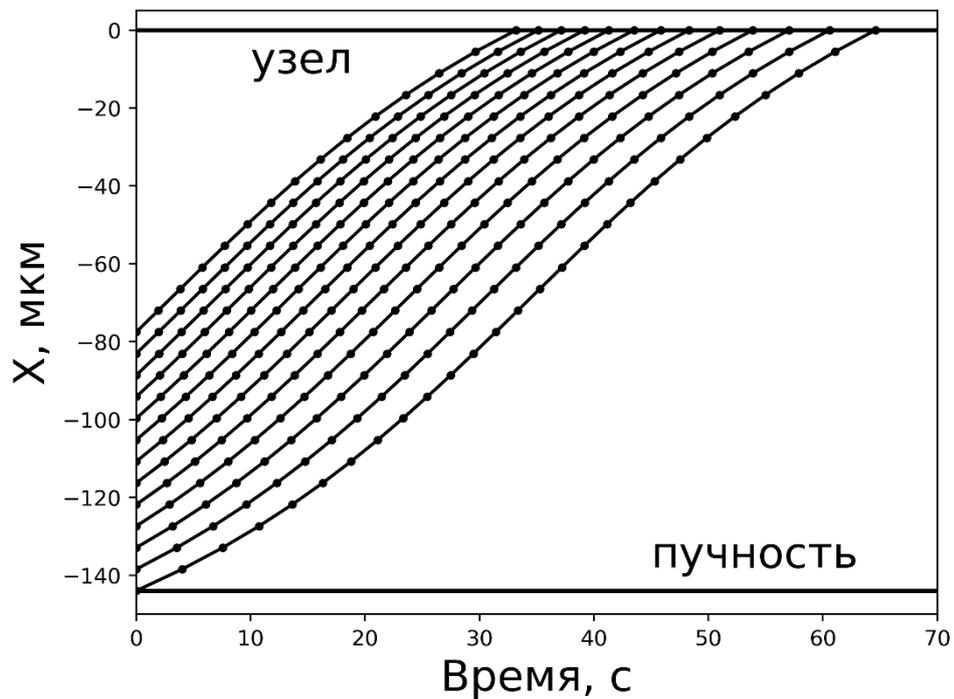


Рисунок 4.9. Зависимость координаты положения монослоя от времени при различных начальных координатах.

Промежуток между начальными координатами (между слоями) примерно 2 радиуса шаровой модели эритроцита. По графикам видно, что слои не обгоняют друг друга. В [74] указано, что такое межклеточное расстояние наблюдается у образцов крови с концентрацией 30 - 50%. Следовательно, чем меньше концентрация, тем больше расстояние между слоями эритроцитов. Из этого можно сделать выводы, что слои расположены дальше, чем в настоящих расчётах и, следуя из предыдущего вывода и графиков, ясно, что слои точно не будут обгонять друг друга.

Далее оценим оптимальное время группировки. Зависимость между временем группировки и концентрацией крови в образце представлена на рисунке 4.10.

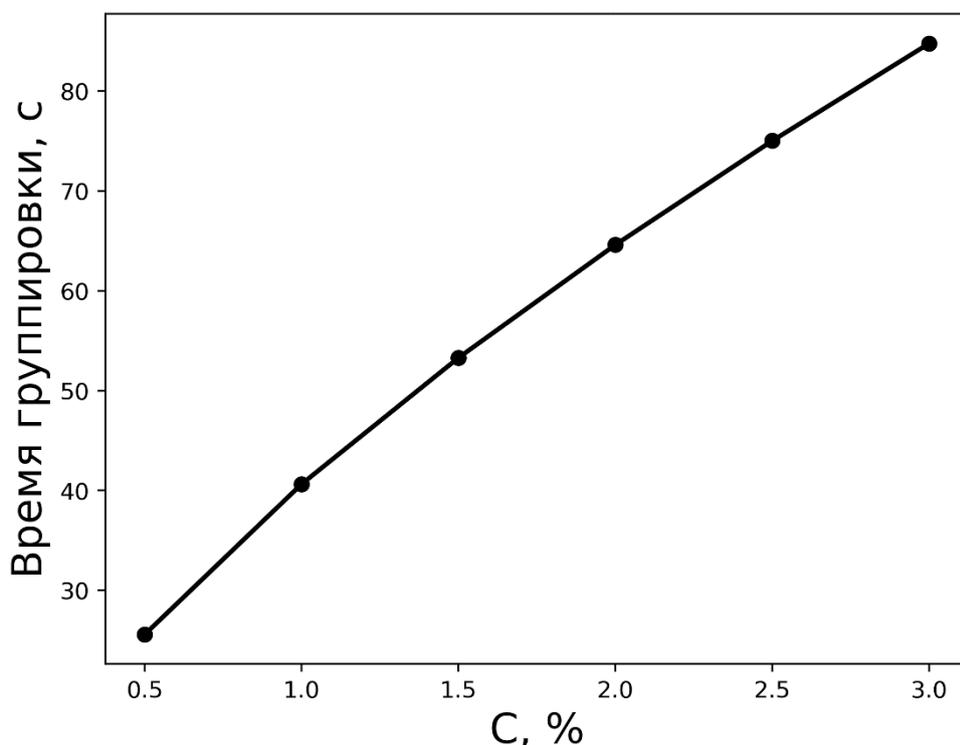


Рисунок 4.10. Зависимость времени полного перемещения слоя из пучности ($x = -\lambda/4$) в узел ($x = 0$) от концентрации крови в образце.

Напомним, что в экспериментах использовались растворы с концентрацией крови $c = 2\%$. Такая концентрация является оптимальной, согласно [35]. Время, необходимое для группировки эритроцитов в таких образцах составляет $\approx 10 - 20$ секунд. Это также было показано в предыдущем разделе 4.1 на рисунке 4.1 б. Из этого можно сделать вывод, что общее время эксперимента по типированию крови может быть тесно связано с данной величиной. Как было показано в разделе 4.1, индуцированная агглютинация приводит к быстрой седиментации крови, что в свою очередь является одним из основных факторов, на которых основан принцип действия АОМ.

Помимо модели движения эритроцитарного монослоя в рамках данной модели были проведены некоторые изменения. Она была скорректирована под описание движения монослоя, состоящего из агрегатов. Условия перехода были

следующие: все эритроциты входят в состав агрегатов, размеры монослоя пропорционально увеличились $h = 2 R_{ag}$. С учётом данных преобразований были получены следующие результаты, проиллюстрированные на рисунке 4.11.

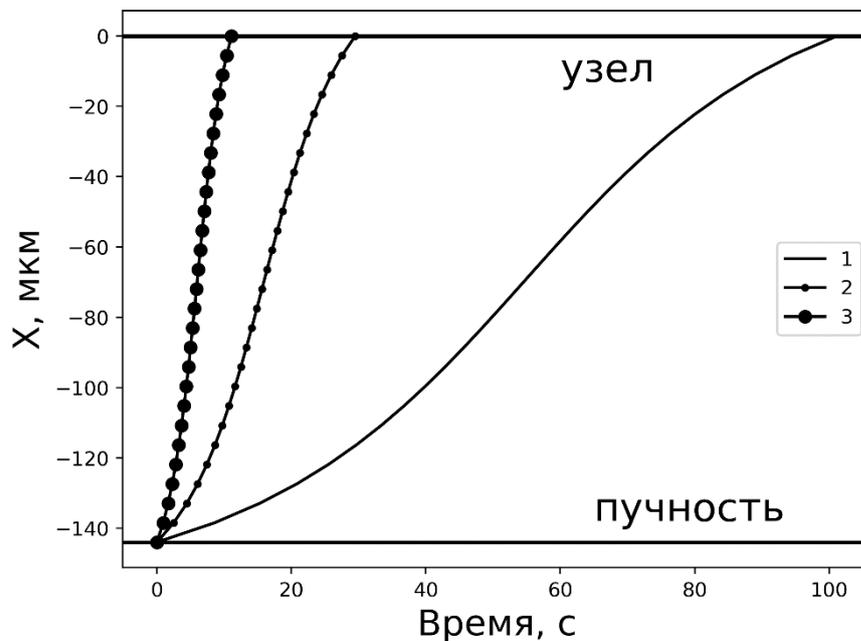


Рисунок 4.11. Зависимость смещения слоёв крови от количества эритроцитов в составе агрегата q .

Значения q : 1 – 1; 2 – 4; 3 – 12.

На данном рисунке заметна явная связь между скоростью движения слоя агрегатов и количеством эритроцитов в их составе. Повышение скорости движения здесь обусловлено двумя факторами: при таком строении монослоя площадь пор выше, чем при отсутствии агрегации, что приводит к снижению линейной скорости потока через них, что приводит к снижению силы трения; с другой стороны, радиационная сила действует сильнее на частицы большего размера.

И наконец, последний в данном разделе тип полученных результатов – сравнение построенной модели с экспериментальными данными. Считаем, что построенная модель является периодической функцией (4.34). При учёте

данного факта можно создать изображение, которое соответствует модели с точки зрения распределения яркости по аналогии с экспериментальными фото (рисунок 4.1 б). Тогда получим следующую пару изображений, которые представлены на рисунке 4.12 а, б.

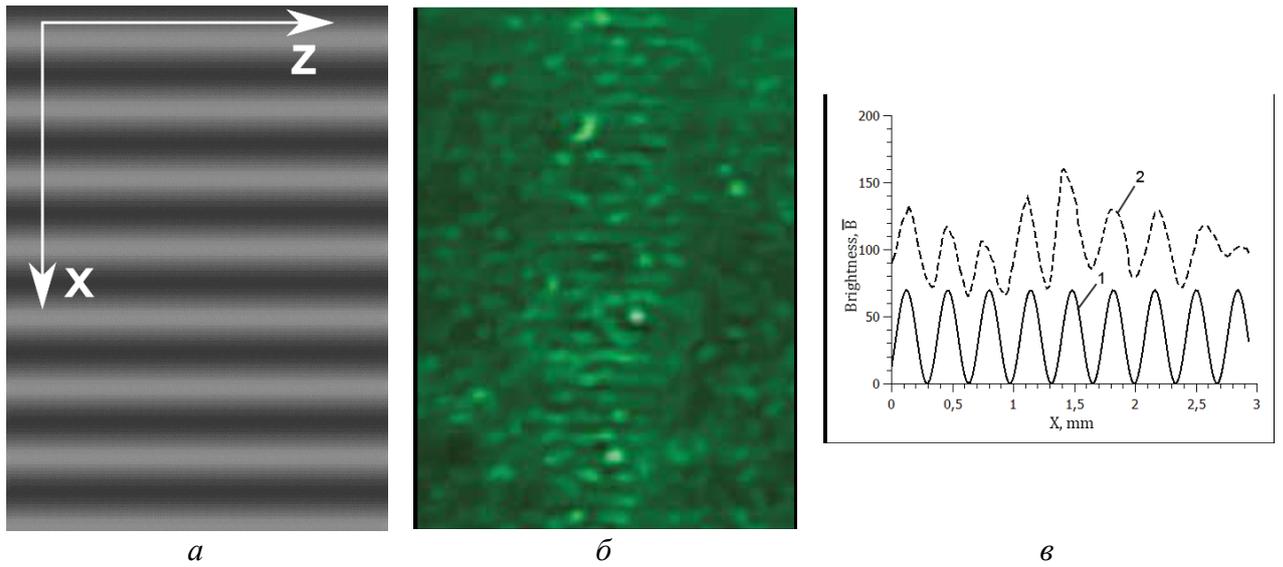


Рисунок 4.12. Сравнение модели и эксперимента по группировке эритроцитов. а – визуализация модели; б – экспериментальное изображение расслоения образца; в - сравнение "яркости" модели и эксперимента.

На рисунке 4.12 в представлено сравнение величин яркости для двух приведённых изображений (а, б). Для подтверждения достоверности соответствия модели и экспериментальных данных был проведён корреляционный анализ подобных зависимостей для модели и экспериментальных изображений.

При учёте того, что данный раздел является описанием одного из базовых принципов АОМ, то для корреляционного анализа, с точки зрения эксперимента, для каждой исследуемой пробы крови были подготовлены по три типа образцов по аналогии с теми, что были описаны в главе 2. Это два образца с цоликлонами *анти-А* и *анти-В* и третий "чистый" образец. Естественно, при проведении экспериментов был известен состав каждого образца, поэтому на рисунке 4.13 не

значится наличие определённого цоликлона, а сразу указывается на результат (тип) реакции агглютинации.

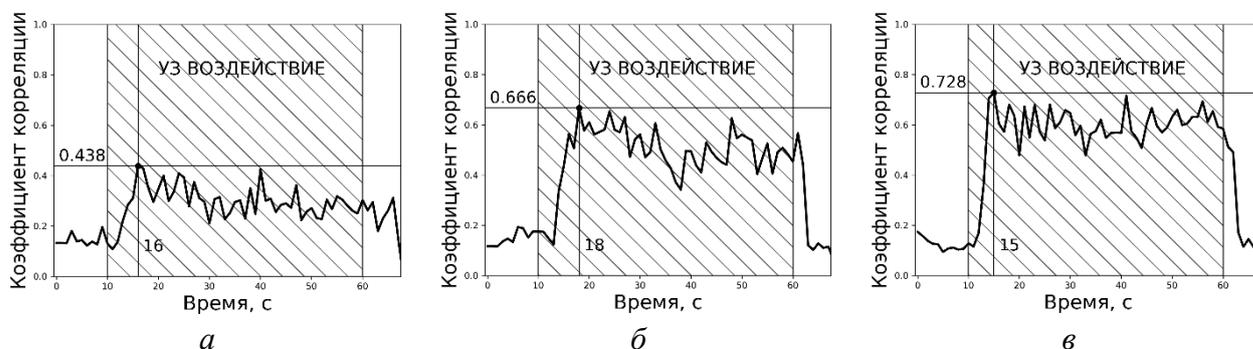


Рисунок 4.13. Корреляционный анализ модели и эксперимента.

а – образец с положительной реакцией; *б* – образец с отрицательной реакцией; *в* – "чистый" образец.

На данных графиках выделена зона "озвучивания" образца, а также момент времени и величина максимального значения коэффициента корреляции. Заметим, что для чистого образца и образца с отрицательной реакцией не наблюдается явных отличий. Там в обоих случаях значение коэффициента корреляции достигает достаточно достоверных величин, что означает соответствие экспериментального изображения периодической модели группировки. С другой стороны – образец с положительной реакцией имеет меньшее значение коэффициента корреляции, причём с течением времени он в общем становится меньше. Такой вид анализа, в свою очередь. Также может являться одним из способов обработки экспериментальных данных. Но он требует специфической подготовки изображения для каждого отдельного случая. Основные способы обработки экспериментальных данных АОМ будут подробно описаны в главе 5 настоящей работы.

4.3 Выводы

Подводя итоги к данной главе можно сделать вывод о том, что, безусловно, воздействие ультразвуковой стоячей волной на исследуемые образцы крови является достаточно значительным внешним фактором, влияющим на седиментацию крови. Кроме того, при условии наличия в образцах

гемагглютинирующих агентов – цоликлонов – это влияние становится решающим в определении групповой принадлежности образца.

В рамках данной главы также были реализованы следующие задачи:

Экспериментально показано влияние УЗ воздействия на образцы крови при различных условиях проведения опытов и пробоподготовки;

Построена математическая модель, описывающая механику процесса группировки эритроцитов под действием УЗ стоячей волны, а также расширение этой модели до рассмотрения монослоя из агрегатов;

Определено оптимальное время для наступления полной, нормальной группировки, а также проведено сопоставление этой величины из расчётов и экспериментов;

Предыдущая задача напрямую связана с понятием времени, требуемого на практике, для типирования таким способом одной пробы крови.

ГЛАВА 5. ЦИФРОВЫЕ СПОСОБЫ ОБРАБОТКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ АОМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Глава 2 содержала общие понятия о цифровых способах обработки экспериментальных результатов в рамках АОМ типирования крови человека. В текущей главе более подробно будут рассмотрены каждый из этих способов, которые использовались для обработки экспериментальных данных в рамках настоящей диссертационной работы: фотометрия; дисперсионный анализ; расчёт распределения количества пикселей по яркости; расчёт суммарной яркости пикселей; определение средней плотности распределения пикселей по их яркости. Напомним, что результатами эксперимента являлись видеоролики длительностью 2 минуты, которые в последствии раскладывались на кадры. Важно отметить, что для всех способов обработки кадров алгоритм определения разрешения был общим: после отключения УЗ действия 30 секунд отводилось на инкубацию образца (время, предназначенное для седиментации агглютинатов, свободных эритроцитов и их агрегатов), затем реализуется обработка – также в течение 30 секунд. Стоит отметить, что каждый рассматриваемый в текущей главе способ имеет свои особенности в плане обработки экспериментальных данных. Также напомним об особенностях определения величины разрешения – для всех способов обработки порядок определения разрешения одинаковый и заключается в том, что при наличии трёх образцов (с цоликлонами *анти-А*, *анти-В* и "чистый" образец) для определения групповой принадлежности образца получают два значения R_A и R_B , а после определения выбирают одно из этих значений как итоговое. Этот порядок подробно разобран на примере в разделе 2.3 настоящей диссертационной работы и будет показан в разделе 5.3.

5.1 Фотометрический подход

В данной работе, как и в [93] фотометрический способ обработки цифрового изображения трактуется как определение средней яркости пикселей \bar{B} , находящихся в области интереса W (Рис 2.2) с течением времени наблюдения

за образцом и его последующей обработке (рис. 5.1). На рисунке 5.1 представлены кривые зависимости величин средней яркости пикселей \bar{V} от времени наблюдения для трех образцов одной конкретной пробы крови. На рисунке указаны две временные зоны: инкубация образцов – с 60 по 90 секунды и обработка – с 90 по 120 секунды. Значения на оси времени соответствуют времени от начала записи ролика.

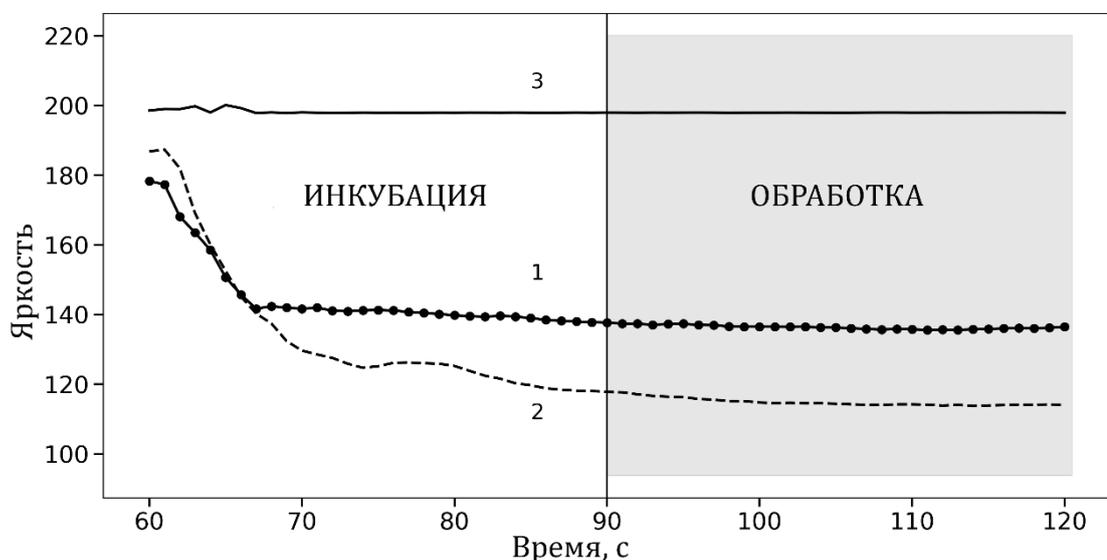


Рисунок 5.1. Зависимости величин средней яркости пикселей V в зоне W от времени наблюдения для различных образцов крови.
 1 – «чистый» образец без цоликлона, 2 – образец крови с цоликлоном анти-А, 3 – образец крови с цоликлоном анти-В.
 Групповая принадлежность данной пробы крови – В(III).

Из рисунка 5.1 видно, что для фотометрического способа обработки результатов величины разрешений составляют $R_B = V_B/V_0 \approx 1.43$ и $R_A = V_A/V_0 \approx 0.86$. Отсюда следует, что $R_B > R_A$ или иначе $V_B > V_A$ – образец с цоликлоном анти-В претерпел просветление более значительно в сравнении с другим образцом с цоликлоном анти-А. Из этого следует, что исследуемая проба крови принадлежит к группе В(III) (Таблица 1.2). Стоит также отметить, что интегрально разрешающая способность фотометрического способа составляет всего лишь $R_{ph} = R_+/R_- = R_b/R_a \approx 1.7$ (индекс *ph* – *photometry*). На таком же уровне

оказались значения R_{ph} для других 34 исследованных проб крови. Максимальное значение R_{ph} по всем пробам составило примерно 2.9.

По результатам анализа образцов с помощью фотометрического способа и по величинам полученного разрешения нельзя считать, что данный способ обработки обладает достаточным разрешением в определении группы крови, тем более для проб крови с низкой агглютинационной способностью.

5.2 Статистические способы анализы

Данный способ обработки основан на анализе распределения пикселей по яркости в области исследования W . Графически эти распределения представлены на рисунке 5.2.

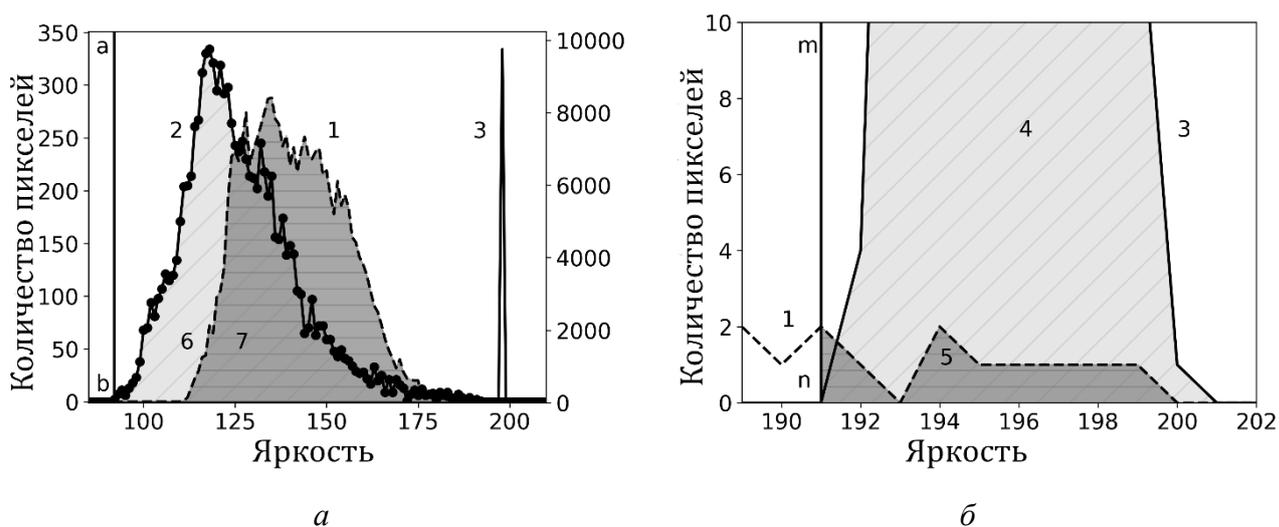


Рисунок 5.2. а) Распределение пикселей по яркости:

1 – чистый образец, 2 – отрицательная реакция, 3 – положительная реакция агглютинации. Графики 1,2 – левая ось ординат, 3 – правая ось ординат; ab – линия граничного значения (V_{bound}) для пары чистый образец – отрицательная реакция; 6 и 7 – части площадей распределений пикселей для отрицательной реакции агглютинации S_- и чистого образца S_0 соответственно при условии $V \geq V_{bound}$ для обоих случаев.

б) Увеличенные фрагменты распределения для чистого образца – 1 и положительной реакции – 3; mn – линия граничного значения (V_{bound}) для пары чистый образец – положительная реакция; 4 и 5 – части площадей распределений пикселей для положительной реакции агглютинации S_+ и чистого образца S_0 соответственно при условии $V \geq V_{bound}$ для обоих случаев.

Распределения пикселей на рисунке 5.2 а соответствуют моменту времени спустя 45 секунд после отключения УЗ воздействия на образец. Результаты

построения таких распределений для 35 проб показали, что, как правило, распределение для "чистого" образца располагается в области большей яркости, справа по отношению к распределению пикселей для отрицательной реакции. Такой эффект можно объяснить тем, что золиклоны имеют специфическую окраску с целью их детерминирования в клинической практике: золиклон *анти-А* имеет в составе красный краситель, *анти-В* – синий. Эта особенность определяет повышенную степень поглощения света зондирующего излучения, в сравнении с чистым образцом. Однако, в некоторых случаях вариабельность параметров различных проб крови иногда приводит к иному, обратному, взаимному расположению распределений. Оценки показывают, что это не оказывает значительного влияния на величины разрешений R_A и R_B при анализе отрицательных реакций агглютинации.

При протекании положительной реакции агглютинации в образце просветление в зоне W наступает практически сразу после выключения ультразвука (рис. 2.2 в, рис 5.2): почти все 10000 пикселей, находящиеся в зоне W , имеют одно и тоже предельное значение яркости примерно равное 200 *br. un.* Стоит также отметить, как было и в [40], что процесс седиментации агглютинатов, как следствие и просветление образца, начинает происходить ещё до выключения УЗ. Это экспериментально подтверждает утверждение о том, что стоячая волна формирует в узлах настолько крупные клеточные комплексы, что под действием собственной силы тяжести они оседают вопреки действию на них радиационной силы. В двух других случаях, при отрицательной реакции и в случае чистого образца, в тот же момент времени в зоне W находится значительное количество свободных эритроцитов и малых эритроцитарных агрегатов, оставшихся от более крупных комплексов в результате их дезагрегации после отключения УЗ воздействия и поглощающих значительную часть зондирующего светового потока.

Отметим, что для проведения дальнейших количественных оценок величин разрешений (разделы 3 и 4 текущей главы) вертикальные линии *ab* и *mn*

на рисунках 5.2 а и б проведены из точек на оси *Brightness* в следующих значениях: для линии *ab* – это минимальная граничная яркость для распределения относящегося к отрицательной реакции агглютинации $V_{bound} = 98 \text{ br. un.}$; аналогично *ab* линия *mn* по значению яркости соответствует нижней границе распределения для положительной реакции $V_{bound} = 191 \text{ br. un.}$ Естественно, выше указанные числа приведены лишь для примера распределений, приведённых на рисунке 5.2, то есть только для одного определённого кадра.

В заключении здесь стоит заметить, что анализ распределения для всех 35 проб в различные моменты из области анализа (90 – 120 секунд) показал, что распределение пикселей для положительной реакции (график 3) всегда располагается в области большой яркости, справа по отношению к чистому образцу и случаю отрицательной реакции агглютинации.

5.2.1 Дисперсионный анализ

На рисунке 5.2 а показано, что ширина распределений для чистого образца и образца с отрицательной реакцией агглютинации значительно больше ширины распределения для образца с положительной реакцией. Считая, что эти распределения подчиняются закону нормального распределения, введём параметр, по величине которого будет возможно отличить положительную реакцию агглютинации от отрицательной. С учётом вышесказанного, таким параметром может выступать дисперсия.

За величину разрешения можно взять отношение $R_{D+} = D_0/D_+$ И $R_{D-} = D_0/D_-$ (D – *dispersion*). Здесь, в отличие от фотометрического подхода, величина дисперсии, относящаяся к чистому образцу, стоит в числителе. Это обусловлено тем, что данная величина заведомо будет достаточно большой, а эта же величина дисперсии для случая с положительной реакцией значительно меньше (в некоторых случаях эта величина становилась меньше единицы). Данный подход позволяет получать большее значение величины разрешающей способности по сравнению с предыдущим фотометрическим подходом. Действительно, как

показано в разделе 1 настоящей главы, величина R_{ph} ограничена несколькими единицами, в то время как величины R_D для положительной и отрицательной реакций агглютинации могут отличаться в более широких пределах.

5.2.2 Распределение количества пикселей по яркости

Для описания данного способа обработки рассмотрим следующий пример: три кадра, которые соответствуют трём образцам одной пробы крови (чистый, с цоликлоном *анти-A*, с цоликлоном *анти-B*) и относятся к одному и тому же моменту времени наблюдения.

Как отмечалось в разделе 5.2 положения распределений пикселей по яркости, а точнее их взаимное расположение, позволяет определить групповую принадлежность исследуемой пробы крови. Но для автоматизации этого процесса программа анализа должна иметь некие данные, величины разрешения R_N (N – number of pixels), чтобы сделать итоговый вывод.

Для начала выберем граничные значения яркости так, как это было указано в разделе 5.2 и на рисунке 5.2. Далее идёт подсчёт количества пикселей в распределениях по следующим критериям:

- подсчёт проводится попарно с чистым образцом;
- учитываются пиксели, яркость которых выше или равна граничному значению $B \geq B_{bound}$.

Рассмотрим подсчёт пикселей для пары отрицательная реакция - чистый образец. В качестве граничного значения яркости B_{bound} выбрана точка b , тогда площади 6 и 7 на рисунке 5.2 а соответствуют количеству пикселей N_- и N_0 . Очевидно, что эти площади близки по величине, следовательно близки и значения количества пикселей N_- и N_0 , то есть $R_- = N_- / N_0 \approx 1$.

Рассмотрим теперь тот же процесс, но для пары положительная реакция - чистый образец. Аналогично предыдущему случаю в качестве граничного значения было выбрано значение яркости B_{bound} в точке n . На рисунке 5.2 б количеству пикселей N_+ и N_0 соответствуют площади 4 и 5. Хорошо заметна колоссальная разница между данными площадями, с учётом чего можно сделать

следующие выводы: N_+ не только не равно N_0 , но и значительно его превосходит. Следовательно, значение разрешения $R_+ = N_+/N_0$ будет много больше единицы, а значит и много больше разрешения R_- .

Зная состав образцов и сравнивая значения R_N для них, возможно с достаточно высокой достоверностью определить группу крови пробы.

Теперь рассмотрим изменение параметров N_- , N_+ и N_0 с течением времени. Данные зависимости показаны на рисунке 5.3.

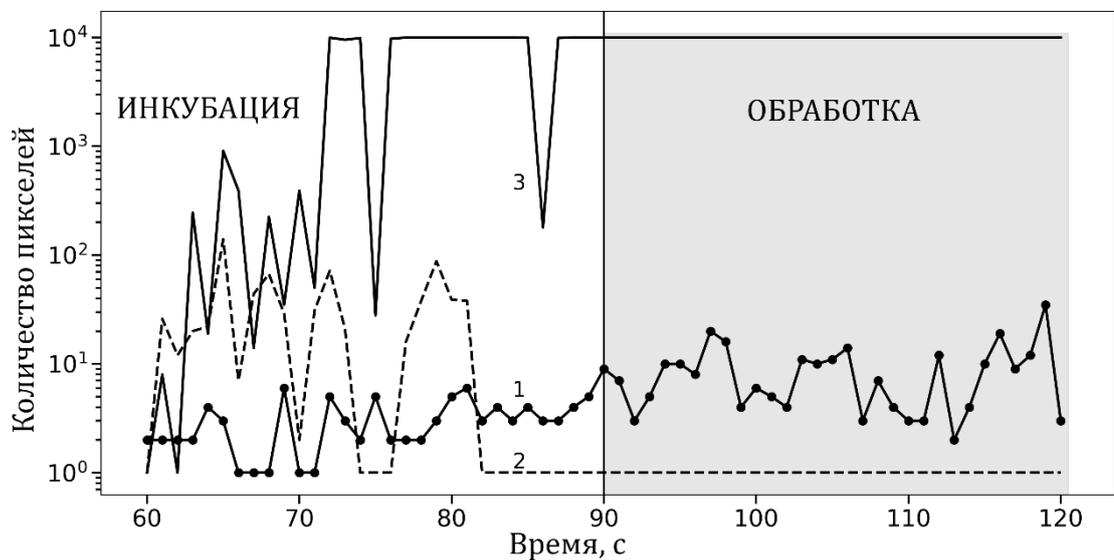


Рисунок 5.3. Зависимости N_- , N_+ и N_0 от времени наблюдения: 1 - N_0 , 2 - N_- , 3 - N_+ .

Определение величин N для каждого момента времени каждого образца осуществлялось по алгоритму, описанному выше с учётом того, что для каждого кадра данный процесс был индивидуальным. Величина разрешения для данного способа обработки рассчитывалась по усреднённым по времени величинам для трёх образцов. Усреднение проводилось по временному интервалу обработки 90 – 120 секунд. Так были получены следующие величины количества пикселей для образцов: $\overline{N_-}$, $\overline{N_+}$, $\overline{N_0}$, а также величины разрешений $R_{N_-} = \overline{N_-}/\overline{N_0}$ и $R_{N_+} = \overline{N_+}/\overline{N_0}$. Таким образом величина разрешения варьируется в пределах $0 \leq R_N \leq 1$ для отрицательной реакции агглютинации и вплоть до $R_N \approx 10000$ для положительной реакции. Это значение соответствует, в некотором смысле, насыщению кривой 3 на рисунке 5.3. Оно обусловлено размерами зоны

обработки W . Сам эффект насыщения означает, что на данном временном участке для данного образца все пиксели в зоне обработки имели яркость равную или выше граничной яркости V_{bound} .

5.2.3 Расчёт суммарной яркости пикселей

Способ расчёта суммарной яркости пикселей является усовершенствованием предыдущего способа обработки. Основная идея состоит в том, что значение разрешения возможно значительно увеличить, если взять во внимание не только количество пикселей, подходящих под критерии подсчёта, но и их значение яркости. Введём обозначение для данной величины: S – *summary brightness*. Из рисунка 5.2 видно, что для распределения образца с отрицательной реакцией агглютинации мало не только количество пикселей, подходящих под условие счёта, но и мала их яркость, а, следовательно, мала и их суммарная яркость S_- . С физической точки зрения это означает, что взвесь образца равномерно поглощает световой поток зондирующего излучения. Обратная картина наблюдается для образца с положительной реакцией. В этом случае велико и количество, и яркость подсчитываемых пикселей, что обусловлено значительным уровнем просветления образца за счёт интенсивной седиментации клеточных комплексов. Как итог, величина S_+ сравнительно будет значительно выше. На рисунке 5.4 отображены кривые зависимости данных величин от времени.

Разрешение данного способа рассчитывается аналогично предыдущему – по отношению величин усреднённых по интервалу времени обработки: $\bar{S}_-, \bar{S}_+, \bar{S}_0$. Таим образом получим значения $R_{S-} = \bar{S}_- / \bar{S}_0$ и $R_{S+} = \bar{S}_+ / \bar{S}_0$.

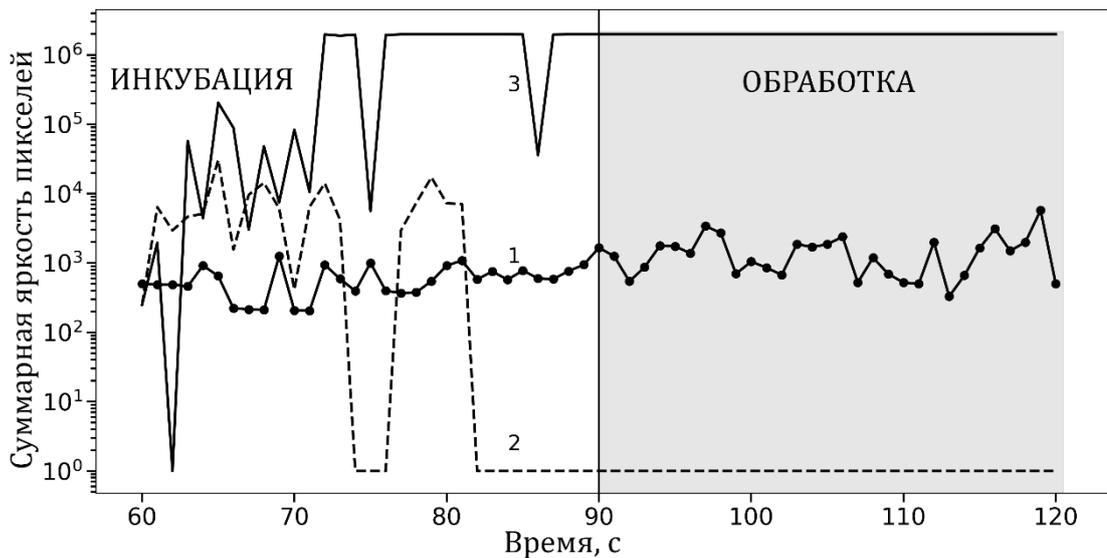


Рисунок 5.4. Зависимости суммарной яркости пикселей от времени наблюдения:
1 - S_0 , 2 - S_- , 3 - S_+ .

Характер соответствующих кривых на рисунках 5.3 и 5.4 довольно схож, но в случае с суммарной яркостью пикселей значения на несколько порядков выше. Как следствие значения разрешения для образцов с положительной реакцией будут также выше. Это является доказательством того, что данный способ действительно имеет преимущество в сравнении с предыдущим. Причина появления предельного значения для кривой 3 ($S_+ \approx 2550000$) на рисунке 5.4 здесь дополняется предельным значением яркости пикселей – 255 br. un.

5.2.4 Определение средней плотности распределения пикселей по их яркости

Этот способ обработки так же основывается на анализе распределений пикселей в зоне интереса W по их яркости. На рисунке 5.2 отчётливо видно, что распределения отличаются не только по взаимному расположению, но и по форме. Так, распределения для чистого образца и образца без реакции агглютинации можно считать близкими к нормальному. В то же время распределение для образца с положительной реакцией узкое, не подчиняющееся законам нормального распределения. Это объясняется тем, что в данном случае практически все пиксели зоны W имеют одинаковое значение яркости близкое к предельному. Иными словами, для всех трёх распределений наблюдается

различие в разбросе пикселей по величине их яркости. Именно это легло в основу данного способа обработки. Для определения разрешения были введены параметры плотности распределения пикселей по яркости для каждого образца – величины $PDDB_-$, $PDDB_+$ и $PDDB_0$ – *pixels density distribution by brightness* – или же в сокращённом виде ρ_- , ρ_+ , ρ_0 . Численно эти величины равны отношению максимума распределения N_{max} к его ширине ΔB на полувысоте: $\rho = N_{max}/\Delta B$. Очевидно, что значения $\rho_- = N_{-,max}/\Delta B_-$, $\rho_0 = N_{0,max}/\Delta B_0$ и $\rho_+ = N_{+,max}/\Delta B_+$ будут иметь принципиально разные значения.

На рисунке 5.5 изображены кривые зависимостей величины плотности распределения пикселей по яркости от времени. Напомним, что для каждого момента времени соответствует свой кадр, то есть для получения одной кинетической кривой на рисунке 5.5 потребовалось обработать порядка 60 кадров.

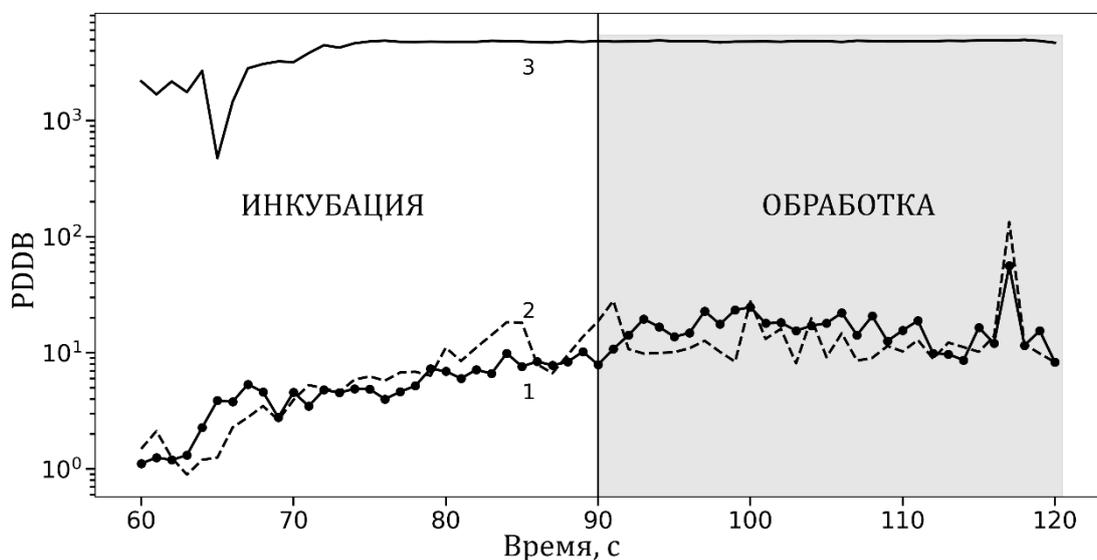


Рисунок 5.5. Зависимость плотности распределения пикселей по яркости $PDDB$ в зоне W от времени наблюдения: 1 – $PDDB_0$, 2 – $PDDB_-$, 3 – $PDDB_+$.

Очевидна явная схожесть в поведении кривых 1 и 2 на рисунке 5.5, чего не наблюдалось во всех предыдущих способах (рис. 5.3 и 5.4). Средние значения величин плотности распределения пикселей по яркости для данных образцов

составляют 10 единиц, в то время как для образца с положительной реакцией агглютинации эта величина достаточно быстро, ещё во временном интервале инкубации, достигает "насыщения" и оказывается равной нескольким тысячам единиц.

По аналогии с предыдущими способами, разрешение здесь так же считается по отношению усреднённых по временному интервалу обработки величин $\overline{\rho_-}$, $\overline{\rho_+}$, $\overline{\rho_0}$ следующим образом: $R_{\rho^-} = \overline{\rho_-} / \overline{\rho_0}$, $R_{\rho^+} = \overline{\rho_+} / \overline{\rho_0}$.

5.3 Обсуждение результатов: влияние различных цифровых способов обработки на величину разрешающей способности АОМ

В рамках экспериментов текущей работы в качестве исследуемых объектов выступали пробы донорской крови в количестве 35 штук, из которых 12 относились к 0(I) группе, 7 – к А(II) группе, 9 – к В(III) группе и 7 – к АВ(IV)группе крови. Пол и возраст доноров варьировался. Выбор именно донорской крови для исследования продиктован отсутствием патологий крови, которые могут влиять на агрегацию, агглютинацию и седиментацию. Так как априори была известна групповая принадлежность каждой пробы, задача сводилась к их типированию с помощью АОМ и последующему сравнению (проверке) полученных данных с клиническими. Все пробы крови проходили этап эксперимента в соответствии с описанием в главе 2, а последующая цифровая обработка проводилась способами, описанными в предыдущих разделах текущей главы. Полученные результаты показали, что величины разрешений, полученные разными способами для одних и тех же проб, принципиально отличаются друг от друга. Поэтому было решено ввести некие понятия критериев, или же пороговых значений разрешения, для каждого из способов, основываясь на полученных данных. Таблица 5.1, содержащая числовые значения этих критериев представлена ниже.

В первом столбце таблицы 2 указано обозначение величины, по которой определялось разрешение АОМ, и номер раздела, в котором был описан соответствующий способ обработки. Во втором столбце приводятся значения

разрешения, которые являются максимумом для отрицательной реакции по всем анализируемым пробам $(R_-)_{max}$. С учётом данных значений, в программе были заданы критерии отбора R_{cr} (*cr* – *criterion*, критерий) для каждого способа обработки с некоторым запасом: $R_{cr} > (R_-)_{max}$. Сами критерии указаны в третьем столбце таблицы 5.1. Данные значения можно трактовать следующим образом: сравнивая величины R_A и R_B с R_{cr} можно установить наличие или отсутствие реакции агглютинации в соответствующих образцах, а следовательно – определить группу крови исследуемой пробы. Если рассмотрим все возможные варианты групповой принадлежности пробы, то получим следующий алгоритм, основанный на значениях из таблицы 5.1.

Таблица 5.1
Таблица критериев определения групповой принадлежности проб крови.

Способ обработки	Максимальное значение разрешения для отрицательной реакции $(R_-)_{max}$	Критерий, заданный в компьютерной программе (R_{cr})
1	2	3
<i>D</i> (раздел 5.2.1)	13	15
<i>N</i> (раздел 5.2.2)	64.9	100
<i>S</i> (раздел 5.2.3)	77.2	100
<i>PDDB</i> (раздел 5.2.4)	5.5	10

- $R_A > R_{cr}; R_B < R_{cr}$, то проба принадлежит к группе крови *A(II)*; за величину разрешения АОМ принимается значение R_A .
- $R_B > R_{cr}; R_A < R_{cr}$, то проба принадлежит к группе крови *B(III)*; за величину разрешения АОМ принимается значение R_B .
- Оба значения R_A и $R_B > R_{cr}$, то проба принадлежит к группе крови *AB(IV)*; за величину разрешения АОМ принимается минимальное между R_A и R_B .
- Оба значения R_A и $R_B < R_{cr}$, проба принадлежит к группе крови *O(I)*; за величину разрешения АОМ принимается минимальное между R_A и R_B .

Данные, полученные после экспериментов со всеми пробами крови, были обработаны пятью способами – были получены соответствующие величины разрешений, а для определения групповой принадлежности использовалась таблица 5.1. В таблице 5.2 приведена часть результатов для демонстрации полученных значений разрешения – по две пробы для каждой группы крови. Полная таблица для 35 проб представлена в Приложении настоящей диссертационной работы.

По данным, приведённым в таблице 5.2 можно сделать следующие выводы.

1. Фотометрия как способ не даёт необходимого уровня отличия между значениями разрешения R_A и R_B для групп крови $A(II)$ и $B(III)$. Они оказались близкими по величине, а для достоверного определения группы крови пробы данные значения должны отличаться хотя бы на порядок. Помимо этого, в другом случае, сравнивая эти же значения для проб крови групп $O(I)$ и $AB(IV)$, наблюдается аналогичная картина. Попарно величины разрешений должны значительно отличаться, так как для $O(I)$ группы крови реакция агглютинации принципиально отсутствует в обоих случаях, в то время как для $AB(IV)$ группы крови наоборот – реакция агглютинации имеет место быть и в образце с цоликлоном *анти-A*, и *анти-B*.

2. Другие четыре статистических способа обработки, в отличие от фотометрического, дают в целом положительный результат в плане соответствия реакции агглютинации (наличие или отсутствие) и величин разрешения R_A и R_B . Как и предполагалось значения разрешения, соответствующие отсутствию реакции агглютинации, численно не превышают несколько единиц, а в большинстве случаев примерно равны или ниже единицы. В то время как для наличия реакции агглютинации в зависимости от способа обработки значения разрешения в основном составляли от нескольких сотен до нескольких миллионов. Исключением здесь является лишь последний способ – расчёт

средней плотности распределения пикселей по яркости – значения разрешения составили несколько десятков.

Таблица 5.2
Пример определения групповой принадлежности проб крови.

Способ обработки		Группа крови							
		$O(I)$	$O(I)$	$A(II)$	$A(II)$	$B(III)$	$B(III)$	$AB(IV)$	$AB(IV)$
Ph (Раздел 5.1)	R_A	0,41	0,80	1,77	2,74	0,84	0,87	2,20	2,54
	R_B	0,43	0,92	1,14	1,05	1,67	1,55	2,20	2,53
D (раздел 5.2.1)	R_A	0.2	1.2	412.6	320.5	3.0	1.5	652.0	390.8
	R_B	0.2	1.2	0.9	1.1	790.8	355.0	652.0	390.8
N (раздел 5.2.2)	R_A	1.0	1.0	10000.0	10000.0	1.0	1.0	10000.0	10000.0
	R_B	1.0	1.0	1.2	1.0	10000.0	8378.4	10000.0	10000.0
S (раздел 5.2.3)	R_A	0.4	0.8	1980000.0	2539924.2	0.8	0.9	2540000.0	2539886.7
	R_B	0.4	0.9	1.4	1.1	1980000.0	33836.8	2539971.4	2532801.8
PDDb (раздел 5.2.4)	R_A	0.2	0.9	33.7	46.6	1.4	1.1	53.7	47.0
	R_B	0.2	1.0	1.2	1.1	44.6	28.2	53.7	46.9

3. Отметим, что точное определение группы крови исследуемых проб с помощью АОМ стало возможным благодаря введению критериев разрешения R_{cr} для каждого способа обработки. Данные величины были определены по имеющимся результатам для всех 35 проб. Стоит учесть, что при увеличении числа проб в выборке, значения критериев могут незначительно меняться. Если же при анализе проб проявится сильная вариабельность параметров разрешения, то, как следствие, будут появляться ошибки при определении группы крови.

4. Однако, корректировка критериев является вполне естественной и логичной процедурой. Изготовители диагностических приборов прибегают к практике "отслеживания" надёжности. Эта в некотором роде обратная связь

необходима для дальнейшего совершенствования прибора и повышения его точности.

Как пример можно привести прибор, разработанный авторами [94], который определяет групповую принадлежность проб по системам АВ0 и резус. В рамках исследования эксперименты проводились параллельно тремя методами: на разработанном приборе, на приборе клинической диагностики *Technicon Auto Analyzer* и ручным методом. Сравнение результатов анализа показало, что из 10042 проб крови 97,3% были определены одинаково обоими инструментальными методами. Ручной метод выступал в качестве контрольного в некоторых случаях.

В другом примере авторы [95], по аналогии с [94] проводили тестирование прибора *Inverness Blood Grouping System (IBGSystem)*. В этом случае отличие в показаниях было выявлено лишь в 3 случаях из 2051.

Как заключение стоит подчеркнуть, что седиментационный АОМ типирования крови, с точки зрения технических действий, может сводиться к анализу трёх кадров соответствующих образцов в определённый момент времени, например, середина интервала обработки – примерно 105 секунда. С другой стороны, эти кадры подвергаются обработке пятью способами, из которых предпочтительнее статистические. Если все эти способы дают единый ответ о групповой принадлежности пробы, то с высокой степенью вероятности можно считать, что определение группы крови состоялось успешно. Но, если хотя бы один из способов даёт отличный от других результат, то, как следствие, требуется проведение дополнительных, уточняющих исследований данной пробы крови.

5.4 Выводы

В данной главе были рассмотрены пять способов цифровой обработки экспериментальных результатов АОМ типирования крови по системе АВ0. Цель разработки и создания этих способов – повышение разрешения АОМ и, как следствие, повышение достоверности результатов при определении группы

крови проб. Одной из ключевых особенностей здесь является введение так называемого чистого образца, в котором отсутствуют гемагглютинирующие агенты (цоликлоны). Этот образец являлся опорным при определении наличия / отсутствия реакции агглютинации в двух других образцах, содержащих цоликлоны *анти-А* и *анти-В*, так как в нём реакция отсутствовала априори.

Также было показано, что разрешение АОМ зависит не только от особенностей пробоподготовки и условий эксперимента, но и от способов обработки полученных результатов. Был впервые введён параметр "средняя плотность распределения пикселей по яркости" для АОМ. Введено понятие критериев для каждого из представленных способов обработки и алгоритм их применения. Это позволило с высокой долей вероятности однозначно отличать наличие / отсутствие реакции агглютинации в образцах по значениям разрешений каждого из способов соответственно. Результаты разработанных статистических способов сопоставлялись с истинными результатами, полученными на медицинском оборудовании в клинических условиях. Как результат – у 100% проб была корректно определена группа крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги настоящей диссертационной работы, сделаем обобщённые выводы по ключевым принципам, на которых основан АОМ.

Понятию седиментации и рассмотрению данного процесса со стороны коллективного подхода полностью посвящена глава 3 настоящей работы. В рамках этой главы экспериментально и с использованием построенных математических и механических моделей седиментации крови было доказано, что имеет место не микроскопический, а также и макроскопический подход к описанию седиментации крови. Также в этой же главе было указано, что с клинической и практической точки зрения значение и трактовка такой величины, как СОЭ, является не односторонней. Само значение этого параметра крови тесно связано не только с физическими величинами, но и с иммунологическими характеристиками, которые в равной мере по-своему влияют на седиментацию.

При рассмотрении группировки эритроцитов речь шла о наличии внешнего фактора – стоячей ультразвуковой волны. В рамках работы этому явлению была посвящена глава 4. В ней изначально было показано экспериментально, насколько значительным может быть влияние такого фактора на различные условия экспериментов по исследованию седиментации: как с точки зрения пробоподготовки, так и с точки зрения условий самого опыта. На уровне экспериментальных условий имели место исследования седиментации в зависимости от времени ультразвукового воздействия. На уровне пробоподготовки факторов было больше: зависимость от концентрации крови в образце; зависимость от наличия в образце гемагглютинирующих агентов. В рамках данной главы также была построена модель процесса группировки эритроцитов, учитывающая коллективный характер движения клеток.

Как итог сравнение экспериментальных результатов с результатами моделирования показало адекватность модели. Дополнительно был определён механизм группировки, а также оптимальное время, требуемое для наступления

нормальной, оптимальной группировки. Все полученные с помощью модели величины также сопоставлялись с экспериментальными данными. Здесь же, в главе 4, был показан первичный способ анализа групповой принадлежности образца. Так как действие УЗ волны значительно отличается для двух образцов, в которых наблюдаются разные исходы реакции агглютинации.

Результатом АОМ является величина разрешающей способности. В главе 5 показаны разработанные авторами работы цифровые способы интерпретации результатов, полученных с помощью АОМ типирования крови. Они основаны на статистической обработке цифровых изображений, являющихся основным результатом для АОМ. Как итог были получены результаты разрешающей способности для каждого из способов. Отдельно стоит отметить особенность, которая является отличительной чертой данных способов от других, рассмотренных авторами при обзоре литературы. Здесь присутствуют три образца (главы 4, 5): чистый образец, условно обозначенный за "0", и образцы с разными цоликлонами, обозначенные как "a" и "b" (*анти-А* и *анти-В*, соответственно). Это даёт несколько иное представление о понятии разрешения: здесь это всегда соотношение между значением величины определяемой в каждом конкретном способе для образца с цоликлоном (*a* или *b*) и значением той же величины для чистого образца (0). Такой подход обеспечивает нивелирование ошибки при определении группы крови образца, так как полученные результаты всегда сравниваются с той величиной, которая всегда соответствует случаю без агглютинации. Здесь стоит отметить два последних рассмотренных способа.

Один из них – подсчёт суммарной яркости пикселей с использованием граничного значения. Обработка экспериментальных результатов с его помощью позволяет достигать самого высокого значения разрешения – с учётом пределов обработки это максимальное значение, численно достигающее величины в 2.5×10^6 , что свидетельствует о его достоверности.

Другой способ – определение величины плотности распределения пикселей по яркости. В ходе апробации на 35 пробах крови данный способ не

имел случаев некорректного типирования. То есть все результаты данного способа полностью соответствовали групповой принадлежности, определённой клинически в ГУЗ СОСПК.

Стоит также указать, что в перспективе находятся несколько направлений исследований, связанных как с углублённым изучением седиментации, так и с разработкой макета прибора для типирования крови человека по системе АВ0 на основе результатов настоящей работы и других работ авторов. Такой выбор продиктован актуальностью тематики диссертационной работы.

Отдельно авторы настоящей работы приносят благодарность всем тем, кто принимал участие в совместных работах и исследованиях:

Доценту кафедры Биофизики и цифровых технологий СГМУ им. В. И. Разумовского Дворецкому Константину Николаевичу;

Заведующей отделением иммунологии ГУЗ СОСПК Карпачевой Елене Петровне;

Ассистенту кафедры Биофизики и цифровых технологий СГМУ им. В. И. Разумовского Торбину Станиславу Олеговичу;

Инженеру кафедры Биофизики и цифровых технологий СГМУ им. В. И. Разумовского Ковалеву Дмитрию Григорьевичу.

А также всем сотрудникам кафедр Биофизики и цифровых технологий СГМУ им. В. И. Разумовского и Оптики и биофотоники СГУ им. Н. Г. Чернышевского.

За всестороннюю поддержку и консультирование во время подготовки настоящей работы авторы выражают особую благодарность доктору физико-математических наук, заслуженному деятелю науки Российской Федерации, профессору, заведующему кафедрой Оптики и биофотоники СГУ им. Н. Г. Чернышевского Тучину Валерию Викторовичу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Vyas G. N., Venkateswaran K. Simultaneous human ABO and RH (D) blood typing or antibody screening by flow cytometry : пат. 5776711 США. – 1998.
- 2 Blood Safety and Availability (World Health Organization, 02/06/2023) [Электронный ресурс] – www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability
- 3 Sturgeon P. Automation: its introduction to the field of blood group serology //IMMUNOHEMATOLOGY-WASHINGTON DC-. – 2001. – Т. 17. – №. 4. – С. 100-105.
- 4 Kline T. R. et al. ABO, D blood typing and subtyping using plug-based microfluidics //Analytical chemistry. – 2008. – Т. 80. – №. 16. – С. 6190-6197.
- 5 Narayanan S. et al. Ultraviolet and visible light spectrophotometric approach to blood typing: objective analysis by agglutination index //Transfusion. – 1999. – Т. 39. – №. 10. – С. 1051-1059.
- 6 Garcia-Rubio L. H. et al. Spectrophotometric method and apparatus for blood typing : пат. 6330058 США. – 2001.
- 7 Narayanan S. et al. UV-visible spectrophotometric approach to blood typing II: phenotyping of subtype A2 and weak D and whole blood analysis //Transfusion. – 2002. – Т. 42. – №. 5. – С. 619-626.
- 8 Anthony S. R. A simplified visible/near-infrared spectrophotometric approach to blood typing for automated transfusion safety. – 2005.
- 9 Lambert J. B. A miniaturized device for blood typing using a simplified spectrophotometric approach. – 2006.
- 10 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, СССР №1683760, приоритет от 04.06.1987, опубликовано Бюл. №38 от 30.10.1991.

- 11 Каландаров Р. С., Князьков Н. Н., Донсков С. И. Оптико-акустический способ регистрации реакции гемагглютинации и его применение для определения группы крови (предварительное сообщение) //Проблемы гематологии и переливания крови. – 1997. – №. 2. – С. 5-8.
- 12 Doubrovski V. A. et al. The Sedimentation Rate of Free Erythrocytes and Their Associates, the Influence of a Standing Ultrasonic Wave //Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2021. – Т. 7. – №. 4. – С. 040501.
- 13 Doubrovski V. A., Dvoretzki K. N. Ultrasonic wave action upon the red blood cell agglutination in vitro //Ultrasound in Medicine & Biology. – 2000. – Т. 26. – №. 4. – С. 655-659.
- 14 Долмашкин А. А., Дубровский В. А. Определение группы крови на основе цифровых фотографий эритроцитов и их агглютинатов //Медицинская техника. – 2012. – №. 2. – С. 272.
- 15 Семенов А. Н. и др. Использование методов диффузного рассеяния света и оптического захвата для исследования реологических свойств крови: агрегация эритроцитов при сахарном диабете //Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика. – 2017. – Т. 17. – №. 2. – С. 85-97.
- 16 Ermolinskiy P. B. et al. Forces of interaction of red blood cells and endothelial cells at different concentrations of fibrinogen: Measurements with laser tweezers in vitro //Clinical Hemorheology and Microcirculation. – 2024. – Т. 86. – №. 3. – С. 303-312.
- 17 Соколова И. А. Агрегация эритроцитов //Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – Т. 9. – №. 4. – С. 4-26.
- 18 Khokhlova M. D. et al. Peculiarities of RBC aggregation studied by double trap optical tweezers //Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care II. – SPIE, 2010. – Т. 7715. – С. 116-123.
- 19 Fahraeus R. The suspension-stability of the blood //Acta Med Scand. – 1921. – Т. 55. – С. 1-228.

- 20 Schmid-Schönbein H. et al. Pathological red cell aggregation (clump aggregation). Molecular and electrochemical factors //Bibliotheca anatomica. – 1977. – №. 16 Pt 2. – С. 484-489.
- 21 Dintenfass L., Jedrzejczyk H., Willard A. Photographic, stereological and statistical methods in evaluation of aggregation of red cells in disease: Part I: Kinetics of aggregation //Biorheology. – 1982. – Т. 19. – №. 4. – С. 567-577.
- 22 Schmid-Schönbein H., Kline K. A., Volger E. Velocity of red cell aggregation (RCA): Photometric determination of the half-time and aggregation constant //Bibliotheca anatomica. – 1975. – Т. 13. – С. 91-92.
- 23 Bronkhorst P. J. H. et al. The mechanism of red cell (dis) aggregation investigated by means of direct cell manipulation using multiple optical trapping //British Journal of Haematology. – 1997. – Т. 96. – №. 2. – С. 256-258.
- 24 Косяков П. Н.; Зотиков Е. А., Туманов А. К. (суд. мед.), Умнова М. А. (мет. иссл.) Группы крови//Большая медицинская энциклопедия.–В 30-ти том.[АМН СССР]/Гл. ред. БВ Петровский.–3-е изд //М.: Сов. энциклопедия. – 1977. – Т. 6. – С. 490-503.
- 25 Кубарко А. И., Семенович А. А., Переверзев В. А. Нормальная физиология: Учебник, в 2-х частях. Часть 1. Архивировано 13 июня 2020 года. // Минск: Вышэйшая школа. — 2013. — С. 516—517.
- 26 Инструкция по применению ЦОЛИКЛОНОВ Анти — А, Анти — В и Анти — АВ диагностических жидких для определения групп крови человека системы АВО (Утверждено Приказом № 2 МЗ РФ от 05.10.2000)
- 27 Sysmex Automated Hematology Analyzer XP series: XP-300. Руководство по эксплуатации. [Электронный ресурс] – <https://www.sysmex.com/-/media/project/sysmex/sysmex/documents/brochures/xp-300-brochure.pdf>
- 28 Sysmex Automated Hematology Analyzer XN series (Для системы XN-1000). Руководство по эксплуатации. [Электронный ресурс] – http://medservice.info/catalog/gematologiya/xn_1000_avtomaticheskiiy_gematologicheskiiy_analizator_modulnogo_tipa/

- 29 Zanishevskaya A. A. et al. Blood typing using microstructured waveguide smart cuvette //Journal of biomedical optics. – 2015. – Т. 20. – №. 4. – С. 040503-040503.
- 30 Li L. et al. A study of the transport and immobilisation mechanisms of human red blood cells in a paper-based blood typing device using confocal microscopy //Analyst. – 2013. – Т. 138. – №. 17. – С. 4933-4940.
- 31 Then W. L. et al. The detection of blood group phenotypes using paper diagnostics //Vox sanguinis. – 2015. – Т. 108. – №. 2. – С. 186-196.
- 32 Doubrovski V. A., Ganilova Y. A., Zabenkov I. V. R and G color component competition of RGB image decomposition as a criterion to register RBC agglutinates for blood group typing //Journal of Biomedical Optics. – 2014. – Т. 19. – №. 3. – С. 036012-036012.
- 33 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. – Т. 115. – №. 2. – С. 255-255.
- 34 Дубровский В. А., Забенков И. В., Торбин С. О. Определение группы крови человека по системе АВ0 методом цифровой микроскопии //Медицинская техника. – 2013. – №. 3. – С. 14-17.
- 35 Дворецкий К. Н. Увеличение разрешающей способности фотометрического метода регистрации агглютинации эритроцитов человека in vitro : дис. – Саратов : [Сарат. гос. ун-т им. НГ Чернышевского], 2005.
- 36 Hashemi R. et al. Erythrocyte sedimentation rate measurement using as a rapid alternative to the Westergren method //Emergency. – 2015. – Т. 3. – №. 2. – С. 50.
- 37 Niazi E., Fenech M. Numerical Modeling of Red Blood Cells Sedimentation Using Population Balance Modeling //CMBES Proceedings. – 2013. – Т. 36.

- 38 Moncharmont P. et al. ABO and Rh (D) blood typing on the PK 7200 with ready-to-use kits //IMMUNOHEMATOLOGY-WASHINGTON DC-. – 2003. – Т. 19. – №. 2. – С. 54-56.
- 39 Battrell C. F. et al. Microfluidic apparatus and methods for performing blood typing and crossmatching : пат. 9146246 США. – 2015.
- 40 Kim D. S., Kwon T. H. Microfluidic biochip for blood typing based on agglutination reaction : пат. 7718420 США. – 2010.
- 41 Biernacki E. Ueber die Beziehungen des Plasmas zu den r. Bl. und über den Werth verschiedener Methoden der Blutkörperchenvolumbestimmung Zeitschr. f. phys //Chemie. Bd. – 1894. – Т. 19. – С. 179.
- 42 Westergren A. Studies of the Suspension Stability of the Blood //Acta Medica Scandinavica. – 1921. – Т. 54. – С. 247.
- 43 Nisa M., Zaman S. Study of erythrocyte sedimentation rate (ESR) values and serum lipids in young cigarette smokers //Proc SZPGMI. – 2003. – Т. 17. – №. 2. – С. 71-3.
- 44 Siemons L. et al. How age and sex affect the erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in early rheumatoid arthritis //BMC musculoskeletal disorders. – 2014. – Т. 15. – С. 1-7.
- 45 Shahzad F., Tawwab S., Abbas A. Relationship of white blood cell counts, haemoglobin and ESR with IHD //Journal of Ayub Medical College Abbottabad. – 2009. – Т. 21. – №. 3. – С. 59-62.
- 46 Rührenstroth-Bauer G. et al. On the Possibility of Differential Diagnosis at Elevated Erythrocyte Sedimentation Rate by Analysis of the Concentrations of Blood Plasma Proteins A Model Study1 //J. Clin. Chem. Clin. Biochem. – 1990. – Т. 28. – №. 11. – С. 845-850.
- 47 Воейков В. Л. Физико-химические и физиологические аспекты реакции оседания эритроцитов //Успехи физиологических наук. – 1998. – Т. 29. – №. 4. – С. 55-73.

- 48 Talstad I., Haugen H. F. The relationship between the erythrocyte sedimentation rate (ESR) and plasma proteins in clinical materials and models //Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. – 1979. – Т. 39. – №. 6. – С. 519-524.
- 49 Shi X., Lin G. Modeling the sedimentation of red blood cells in flow under strong external magnetic body force using a lattice boltzmann fictitious domain method //Numerical Mathematics: Theory, Methods and Applications. – 2014. – Т. 7. – №. 4. – С. 512-523.
- 50 Hung W. T., Collings A. F., Low J. Erythrocyte sedimentation rate studies in whole human blood //Physics in Medicine & Biology. – 1994. – Т. 39. – №. 11. – С. 1855.
- 51 Fabry T. L. Mechanism of erythrocyte aggregation and sedimentation. – 1987.
- 52 V.L. Voeikov, A.I. Goncharenko, S.A. Goncharenko, and I.P. Kaganovskii, Gas microbubbles in fresh native blood and their significance for ESR measurements, EMBEC'05 Prague, Czech Republic, IFMBE Proc. 2005 11(1)
- 53 Буравлева Е. В. и др. Кровь как активный коллоид. Нелинейные эффекты, наблюдаемые при седиментации крови, разведенной физиологическим раствором //Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2012. – Т. 53. – №. 6. – С. 413-416.
- 54 Ismailov R. M., Shevchuk N. A., Khusanov H. Mathematical model describing erythrocyte sedimentation rate. Implications for blood viscosity changes in traumatic shock and crush syndrome //BioMedical Engineering OnLine. – 2005. – Т. 4. – С. 1-16.
- 55 Bürger R., Wendland W. L. Sedimentation and suspension flows: Historical perspective and some recent developments //Journal of Engineering Mathematics. – 2001. – Т. 41. – С. 101-116.
- 56 Лосев Е. С, Физическая модель гравитационного оседания эритроцитов, Биофизика. – 1992. – Т. 37. – №. 6.

57 Pribush A., Meyerstein D., Meyerstein N. The mechanism of erythrocyte sedimentation. Part 1: Channeling in sedimenting blood //Colloids and surfaces B: Biointerfaces. – 2010. – Т. 75. – №. 1. – С. 214-223.

58 Fenech M. et al. A particle dynamic model of red blood cell aggregation kinetics //Annals of biomedical engineering. – 2009. – Т. 37. – С. 2299-2309.

59 Дубровский В. А., Дворецкий К. Н., Марков С. В. РЕГИСТРАЦИЯ СЕДИМЕНТАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ И ЕЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ В ФОРМЕ КОЛЛЕКТИВНОГО ПРОЦЕССА //Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине-2017. – 2017. – С. 180-183.

60 Zlonis M. The mystique of the erythrocyte sedimentation rate: a reappraisal of one of the oldest laboratory tests still in use //Clinics in laboratory medicine. – 1993. – Т. 13. – №. 4. – С. 787-800.

61 Stokes G. G. Mathematical and physical papers. – 1901. – Т. 3.

62 Oka S. A physical theory of erythrocyte sedimentation //Biorheology. – 1985. – Т. 22. – №. 4. – С. 315-321.

63 Normatov T. D., Khusanov I. N. Determination of constraint coefficients and viscosity of mixture in dependence on volume fraction of particles //Nauka. – 2001. – Т. 5. – С. 35-38.

64 Балаховский С. Д. Реакция оседания эритроцитов //М.-Л.: ГИЗ. – 1928.

65 Дубровский В. А., Дворецкий К. Н., Балаев А. Э. Исследование механизма усиления агрегации эритроцитов ультразвуковым полем //Акустический журнал. – 2004. – Т. 50. – №. 2. – С. 184-184.

66 Долмашкин А. А., Дубровский В. А. Определение группы крови на основе цифровых фотографий эритроцитов и их агглютинатов //Медицинская техника. – 2012. – №. 2. – С. 272.

67 Doubrovski V. A., Ganilova Y. A., Zabenkov I. V. R and G color component competition of RGB image decomposition as a criterion to register RBC

agglutinates for blood group typing //Journal of Biomedical Optics. – 2014. – Т. 19. – №. 3. – С. 036012-036012.

68 Doubrovski V.A., Markov S.V., Kovalev D.G. Experimental and mathematical modeling of sedimentation of donor blood erythrocytes in the form of a collective process // Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Physics. – 2021. - Т. 21. - №. 2, С. 165–177.

69 Newton I. Mathematical principles of natural philosophy. – Encyclopaedia Britannica, 1990.

70 Ladenberg R. Viscosity of liquids //Ann. Phys. – 1907. – Т. 22. – С. 287.

71 Фабелинский И. Л. О макроскопической и молекулярной сдвиговой вязкости //Успехи физических наук. – 1997. – Т. 167. – №. 7. – С. 721-733.

72 Bishop J. J. et al. Relationship between erythrocyte aggregate size and flow rate in skeletal muscle venules //American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2004. – Т. 286. – №. 1. – С. H113-H120.

73 Boynard M., Lelievre J. C. Size determination of red blood cell aggregates induced by dextran using ultrasound backscattering phenomenon //Biorheology. – 1990. – Т. 27. – №. 1. – С. 39-46.

74 Doubrovski V. A. et al. Optical digital registration of erythrocyte sedimentation and its modeling in the form of the collective process //Optics and Spectroscopy. – 2019. – Т. 126. – С. 595-606.

75 Yuan P., Lin B. Y. Measurement of viscosity in a vertical falling ball viscometer //American Laboratory. – 2008. – Т. 40. – №. 18. – С. 32-35.

76 Дубровский В. А., Марков С. В., Ковалев Д. Г. Механическая модель седиментации эритроцитов и их агрегатов – экспериментальное и математическое описание процесса // Проблемы оптической физики и биофотоники SFM-2019. Саратов. Изд-во "Новый ветер". – 2019. С. 18.

77 Nyborg W.L. Ultrasound: Its application in medicine and biology. New York: Elsevier. – 1978. P. 375.

- 78 Doblhoff-Dier O. et al. A novel ultrasonic resonance field device for the retention of animal cells //Biotechnology progress. – 1994. – T. 10. – №. 4. – C. 428-432.
- 79 Hawkes J. J., Coakley W. T. A continuous flow ultrasonic cell-filtering method //Enzyme and microbial technology. – 1996. – T. 19. – №. 1. – C. 57-62.
- 80 Hawkes J. J., Limaye M. S., Coakley W. T. Filtration of bacteria and yeast by ultrasound-enhanced sedimentation //Journal of applied microbiology. – 1997. – T. 82. – №. 1. – C. 39-47.
- 81 Trampler F. et al. Acoustic cell filter for high density perfusion culture of hybridoma cells //Bio/technology. – 1994. – T. 12. – №. 3. – C. 281-284.
- 82 Miles C. A. et al. Principles of separating micro-organisms from suspensions using ultrasound //Journal of Applied Microbiology. – 1995. – T. 78. – №. 1. – C. 47-54.
- 83 Coakley W. T. et al. Ultrasonic manipulation of particles and cells. Ultrasonic separation of cells //Bioseparation. – 1994. – T. 4. – №. 2. – C. 73-83.
- 84 Coakley W. T. et al. Cell manipulation in ultrasonic standing wave fields //Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 1989. – T. 44. – №. 1. – C. 43-62.
- 85 Limaye M. S., Hawkes J. J., Coakley W. T. Ultrasonic standing wave removal of microorganisms from suspension in small batch systems //Journal of microbiological methods. – 1996. – T. 27. – №. 2-3. – C. 211-220.
- 86 Kilburn D. G. et al. Enhanced sedimentation of mammalian cells following acoustic aggregation //Biotechnology and bioengineering. – 1989. – T. 34. – №. 4. – C. 559-562.
- 87 Whitworth G., Grundy M. A., Coakley W. T. Transport and harvesting of suspended particles using modulated ultrasound //Ultrasonics. – 1991. – T. 29. – №. 6. – C. 439-444.
- 88 Schram C. J. Manipulation of particles in an acoustic field //Advances in Sonochemistry. – 1991. – T. 2. – C. 293-322.

- 89 Grundy M. A. et al. Rapid agglutination testing in an ultrasonic standing wave //Journal of immunological methods. – 1993. – Т. 165. – №. 1. – С. 47-57.
- 90 Grundy M. A., Moore K., Coakley W. T. Increased sensitivity of diagnostic latex agglutination tests in an ultrasonic standing wave field //Journal of immunological methods. – 1994. – Т. 176. – №. 2. – С. 169-177.
- 91 Thomas N. E., Coakley W. T. Measurement of antigen concentration by an ultrasound-enhanced latex immunoagglutination assay //Ultrasound in medicine & biology. – 1996. – Т. 22. – №. 9. – С. 1277-1284.
- 92 Шутилов В. А. Основы физики ультразвука. – 1980.
- 93 Дубровский В. А., Медведева М. Ф. Акусто-оптический метод определения группы крови на основе дискретной обработки фотоизображений //Медицинская техника. – 2016. – №. 2. – С. 3-7.
- 94 Chung A., Birch P., Ilagan K. A microplate system for ABO and Rh (D) blood grouping //Transfusion. – 1993. – Т. 33. – №. 5. – С. 384-388.
- 95 Mintz P. D. et al. Application of the inverness blood grouping system for semiautomated ABO and D testing of patents' samples //Immunohematology. – 1994. – Т. 10. – №. 2. – С. 60-63.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Математические формулы, используемые в работе.

3.3.1 Модель коллективной седиментации эритроцитов

$$\rho_d = \rho_l + \frac{4N_{RBC}r_{RBC}^3(\rho_{RBC} - \rho_l)}{3hR^2}, \quad (3.1)$$

$$M_d a = M_d g - F_{\text{Апх}} - F_{\text{тр}}. \quad (3.2)$$

$$F_{\text{тр}} = k_1 N_p \eta_l S_{p.lat} \left(\frac{dv}{dr_p} \right) = k_1 N_p \eta_l 2\pi r_p h \left(\frac{dv}{dr_p} \right). \quad (3.3)$$

$$\frac{dv}{dr_p} = v_{\text{max}}/r_p = 2v_{\text{mean}}/r_p. \quad (3.4)$$

$$Q_1 = v_{\text{sed}} S_{RBC} = v_{\text{sed}} \pi (R^2 - N_p r_p^2), \quad (3.5)$$

$$Q_2 = N_p v_{\text{mean}} \pi r_p^2. \quad (3.6)$$

$$v_{\text{sed}} \pi (R^2 - N_p r_p^2) = N_p v_{\text{mean}} \pi r_p^2, \quad (3.7)$$

$$v_{\text{mean}} = v_{\text{sed}} \left[\left(\frac{R^2}{N_p r_p^2} \right) - 1 \right]. \quad (3.8)$$

$$\frac{dv}{dr_p} = 2v_{\text{mean}}/r_p = 2 \left(\frac{v_{\text{sed}}}{r_p} \right) \left[\left(\frac{R^2}{N_p r_p^2} \right) - 1 \right]. \quad (3.9)$$

$$M_d a = M_d g - F_{\text{Апх}} - k_1 4\pi N_p \eta_l h \left[\left(\frac{R^2}{N_p r_p^2} \right) - 1 \right] v_{\text{sed}}. \quad (3.10)$$

$$M_d a = g V_d (\rho_d - \rho_l) - k_1 4\pi N_p \eta_l h \left[\left(\frac{R^2}{N_p r_p^2} \right) - 1 \right] v_{\text{sed}}. \quad (3.11)$$

$$v_{\text{sed}} = \frac{g R^2 (\rho_d - \rho_l)}{\left[4k_1 \eta_l N_p \left(\left(\frac{R^2}{N_p r_p^2} \right) - 1 \right) \right]}. \quad (3.12)$$

$$v_{\text{sed}} = \frac{[g N_{er} r_{er}^3 (\rho_{er} - \rho_l) / 3h]}{\left[k_1 \eta_l N_p \left(\left(\frac{R^2}{N_p r_p^2} \right) - 1 \right) \right]}. \quad (3.13)$$

$$N_{er} = c\pi R^2 h = 2c\pi R^2 r_{er}. \quad (3.14)$$

$$v_{sed} = \frac{\pi g R^2 r_{er}^3 c (\rho_{er} - \rho_l)}{3k_1 \eta_l \left((R^2 / r_p^2) - N_p \right)}. \quad (3.15)$$

$$S_l = S_d - S_{er} = \pi (R^2 - N_{er} r_{er}^2), \quad (3.16)$$

$$\pi (R^2 - N_{er} r_{er}^2) / N_p = k_2 \pi r_p^2, \quad (3.17)$$

$$r_p = \sqrt{R^2 - 2\pi c r_{er}^3 / k_2 N_p}. \quad (3.18)$$

$$v_{sed} = \frac{\pi g R^2 r_{er}^3 c (\rho_{er} - \rho_l) [1 - 2\pi c r_{er}^3]}{3k_1 \eta_l N_p ((k_2 - 1) + 2\pi c r_{er}^3)}. \quad (3.19)$$

$$N_p(c) = ac^b, \quad (3.20)$$

3.3.2. Модель коллективной седиментации агрегатов

$$S(C) = \frac{2}{\left(1 + e^{-\frac{C-C_0}{C}}\right)}. \quad (3.21)$$

$$q(C) = q_0 S(C) = \frac{2q_0}{\left(1 + e^{\frac{1}{k}-1}\right)}, \quad (3.22)$$

$$D_{agg} = d_{rbc} \sqrt[3]{q} = 2r_{rbc} \sqrt[3]{q} \quad (3.23)$$

$$D_p = \sqrt{2}L - d_{rbc} \sqrt[3]{q(C)} = \sqrt[3]{q(C)} \left(\sqrt{2} \sqrt[3]{1/kC_0} - d_{rbc} \right). \quad (3.24)$$

$$Q_d = Q_p + Q_r, \quad (3.25)$$

$$Q_d = S_d v_{sed} = \pi [(R_0 - \Delta R)^2 - N_p r_p^2] v_{sed}, \quad (3.26)$$

$$\Delta P = \frac{(Mg - F_{\text{ApX}})}{S_d} = gh(\rho_d - \rho_l), \quad (3.27)$$

$$\rho_d = k\rho_{rbc}HCT + k\rho_{pl}(1 - HCT) + \rho_s(1 - k), \quad (3.28)$$

$$\rho_l = k\rho_{pl}(1 - HCT) + \rho_s(1 - k) \quad (3.29)$$

$$Q_p = \Delta P / \omega_p = \Delta P / (8\eta_l h / \pi N_p r_p^4), \quad (3.30)$$

$$\pi R_{eq}^2 = 2\pi \Delta R (R_0 - \Delta R). \quad (3.31)$$

$$Q_r = \Delta P / \omega_r = \Delta P / (8\eta_l h / \pi R_{eq}^4), \quad (3.32)$$

$$Q_r = \Delta P / \left[2\eta_l h / \pi (R_0 - R)^2 \Delta R^2 \right], \quad (3.33)$$

$$v_{sed} = \frac{g(\rho_d - \rho_l)}{8\eta_l ((R_0 - \Delta R)^2 - N_p r_p^2)} \times (N_p r_p^4 + 4(R_0 - \Delta R)^2 \Delta R^2) \quad (3.34)$$

$$v_{sed} = \frac{g(\rho_d - \rho_l) \Delta R^2}{2\eta_l}. \quad (3.35)$$

$$v_{sed} = \frac{g(\rho_d - \rho_l) N_p r_p^4}{8\eta_l (R_0^2 - N_p r_p^2)}. \quad (3.36)$$

$$(\rho_d - \rho_l) = kHCT \rho_{rbc}. \quad (3.37)$$

$$N_p = S_d / S_{mc}, \quad (3.38)$$

$$\eta_l = \eta_{sal} e^{\alpha k p l}, \quad (3.39)$$

$$r_p = \sqrt[3]{q} \left[\frac{\sqrt[2]{2}}{2} \sqrt[3]{\frac{1}{kC_0}} - r_{rbc} \right] \quad (3.40)$$

$$\frac{v_{sed}(N_p \rightarrow 0)}{v_{sed}(\Delta R \rightarrow 0)} = \frac{4(R_0^2 - N_p r_p^2) \Delta R^2}{N_p r_p^4} \quad (3.41)$$

$$\frac{v_{sed}(N_p \rightarrow 0)}{v_{sed}(\Delta R \rightarrow 0)} = 4 \left[\frac{S_d}{S_{p,\varepsilon}} - 1 \right]. \quad (3.42)$$

$$F_{fr} = \eta S \frac{\Delta v}{\Delta r}, \quad (3.43)$$

3.4.1. Механическая модель седиментации эритроцитарного ассоциата

$$F_{fr} = 6\pi\eta r_b v \quad (3.44)$$

$$v_{sed} = \frac{2gr_b^2(\rho_b - \rho_l)}{9\eta \left(1 + 2.4 \frac{r_b}{R}\right) \left(1 + 3.1 \frac{r_b}{H}\right)} \quad (3.45)$$

$$\rho_{eq} = \rho_l + N \left(\frac{r_b}{R_{eq}}\right)^3 (\rho_b - \rho_l) \quad (3.46)$$

$$v_{sed} = \frac{k2gR_{eq}^2(\rho_{eq} - \rho_l)}{9\eta \left(1 + 2.4 \frac{R_{eq}}{R}\right) \left(1 + 3.1 \frac{R_{eq}}{H}\right)} \quad (3.47)$$

$$v_{sed} = \frac{k2g(Nr_b^3/R_{eq})(\rho_b - \rho_l)}{9\eta \left(1 + 2.4 \frac{R_{eq}}{R}\right) \left(1 + 3.1 \frac{R_{eq}}{H}\right)} \quad (3.48)$$

$$F_{fr} = \eta S \frac{\Delta v}{\Delta r} \quad (3.49)$$

$$F_{fr} = \eta S_{eq} \frac{\Delta v}{\Delta r} \quad (3.50)$$

$$R_{eq} = r_b \sqrt{\alpha N} \quad (3.51)$$

$$v_{sed} = \frac{k2gr_b^2 \sqrt{\alpha N} (\rho_b - \rho_l)}{9\eta \sqrt{\alpha} \left(1 + 2.4 \frac{r_b \sqrt{\alpha N}}{R}\right) \left(1 + 3.1 \frac{r_b \sqrt{\alpha N}}{H}\right)} \quad (3.52)$$

$$\alpha(N) = N^\beta, \quad (3.53)$$

$$C_b = \frac{N}{V_{eq}} = \frac{3}{4\pi r_b^3 \sqrt{\alpha^3 N}} \quad (3.54)$$

3.4.2. Механическая модель седиментации слоя крови

$Ma = Mg - F_{\text{Арх}} - F_{\text{тр}},$	(3.55)
$F_{\text{тр.к}}(R) = 2\pi\eta h(R_0 - R) \left(\frac{dv_{\text{к}}}{dr_{\text{к}}} \right).$	(3.56)
$F_{\text{тр.отв}} = N_{\text{отв}} 2\eta\pi h r_{\text{отв}} \left(\frac{dv_{\text{отв}}}{dr} \right).$	(3.57)
$\frac{dv_{\text{отв}}}{dr_{\text{отв}}} \approx \frac{v_{\text{отв.max}}}{r_{\text{отв}}} = 2 \frac{v_{\text{отв.ср}}}{r_{\text{отв}}},$	(3.58)
$g(\rho_{\text{д}} - \rho_{\text{ж}})(R^2 - N_0 r_0^2) = 2\eta \left[(R_0 - R) \left(\frac{dv_{\text{к}}}{dr_{\text{к}}} \right) + 2N_{\text{отв}} v_{\text{отв.ср}} \right].$	(3.59)
$(R^2 - N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2) v_{\text{сед}} = (R_0^2 - R^2) v_{\text{ср.к}} + N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2 v_{\text{ср.отв}}.$	(3.60)
$\frac{v_{\text{ср.к}}}{v_{\text{ср.отв}}} = \frac{R_0^2 - R^2}{r_{\text{отв}}^2}.$	(3.61)
$\frac{dv_{\text{к}}}{dr_{\text{к}}} = \frac{2v_{\text{ср.к}}}{\sqrt{R_0^2 - R^2}}.$	(3.62)
$v_{\text{сед}} = \frac{g(\rho_{\text{д}} - \rho_{\text{ж}})}{4\eta} \cdot \frac{R^2 - N_0 r_0^2}{R^2 - N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2} \cdot \frac{\frac{(R_0^2 - R^2)^2}{r_{\text{отв}}^2} + N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2}{\left(\frac{(R_0^2 - R^2)(R_0 - R)}{r_{\text{отв}}^2 \sqrt{R_0^2 - R^2}} \right) + N_{\text{отв}}}$	(3.63)
$v_{\text{сед}} = \frac{g(\rho_{\text{д}} - \rho_{\text{ж}})}{4\eta} \cdot \frac{R^2 - N_0 r_0^2}{R^2 - N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2} \cdot \frac{4R_0^2 \Delta R^2 + N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^4}{\Delta R \sqrt{2R_0 \Delta R} + N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2}.$	(3.64)

4.1. Влияние ультразвука (УЗ) на процесс группировки эритроцитов

$R = \frac{(Z_{\text{обр}} - Z_{\text{возд}})}{(Z_{\text{обр}} + Z_{\text{возд}})} = \frac{I_{\text{отр}}}{I_{\text{пад}}},$	(4.1)
$v_{\text{сед}} = \Delta Y / t$	(4.1.1)

4.2 Теоретическое моделирование процесса группировки эритроцитов в поле УЗ стоячей волны на основе принципа коллективного процесса

$$F_p = - \left[\frac{P_0^2 V \beta_0}{2\lambda} \right] \cdot \left[\frac{5\rho - 2\rho_0}{2\rho + \rho_0} - \frac{\beta}{\beta_0} \right] \cdot \sin \left(\frac{4\pi X}{\lambda} \right), \quad (4.2)$$

$$F_\Sigma = \sum F_p = -N_{\text{эп}} \left[\frac{P_0^2 V \beta_0}{2\lambda} \right] \cdot \left[\frac{5\rho - 2\rho_0}{2\rho + \rho_0} - \frac{\beta}{\beta_0} \right] \cdot \sin \left(\frac{4\pi X}{\lambda} \right), \quad (4.3)$$

$$M_d a = F_\Sigma + M_d g - F_{\text{Арх}} - F_{\text{Тр}}, \quad (4.4)$$

$$V_d = \pi \cdot R^2 \cdot h, \quad (4.5)$$

$$\rho_d = \rho_{\text{ж}} + 4 \cdot N_{\text{эп}} \cdot r_{\text{эп}}^3 \cdot \frac{(\rho_{\text{эп}} - \rho_{\text{ж}})}{3 \cdot h \cdot R^2}. \quad (4.6)$$

$$F_{\text{Арх}} = \rho_{\text{ж}} g V_d = \pi \rho_{\text{ж}} g R^2 h \quad (4.7)$$

$$F_{\text{Тр}} = k_1 N_{\text{отв}} \eta_{\text{ж}} S_{\text{отв.бок}} \frac{dv}{dr_{\text{отв}}} = k_1 N_{\text{отв}} \eta_{\text{ж}} 2\pi h r_{\text{отв}} \frac{dv}{dr_{\text{отв}}} \quad (4.8)$$

$$\frac{dv}{dr_{\text{отв}}} = \frac{v_{\text{max}}}{r_{\text{отв}}} = \frac{2v_{\text{сред}}}{r_{\text{отв}}}, \quad (4.9)$$

$$F_{\text{Тр}} = k_1 N_{\text{отв}} \eta_{\text{ж}} 4\pi h v_{\text{сред}} \quad (4.10)$$

$$M_d (dv/dt) = F_\Sigma + M_d g - F_{\text{Арх}} - k_1 N_{\text{отв}} \eta_{\text{ж}} 4\pi h v_{\text{сред}} \quad (4.11)$$

$$Q_1 = vS = v\pi(R^2 - N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2), \quad (4.12)$$

$$Q_2 = N_{\text{отв}} v_{\text{сред}} \pi r_{\text{отв}}^2 \quad (4.13)$$

$$v\pi(R^2 - N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2) = N_{\text{отв}} v_{\text{сред}} \pi r_{\text{отв}}^2 \quad (4.14)$$

$$v_{\text{сред}} = v \left[\left(\frac{R^2}{N_{\text{отв}} r_{\text{отв}}^2} \right) - 1 \right] \quad (4.15)$$

$$M_{\text{д}}(dv/dt) = F_{\Sigma} + M_{\text{д}}g - F_{\text{Арх}} - k_1 N_{\text{отб}} \eta_{\text{ж}} 4\pi h v \left[\left(R^2 / N_{\text{отб}} r_{\text{отб}}^2 \right) - 1 \right] \quad (4.16)$$

$$A = F_{\Sigma} / M_{\text{д}}, \quad (4.17)$$

$$B = F_{\text{Арх}} / M_{\text{д}}, \quad (4.18)$$

$$D = k_1 N_{\text{отб}} \eta_{\text{ж}} 4\pi h \left[\left(R^2 / N_{\text{отб}} r_{\text{отб}}^2 \right) - 1 \right] / M_{\text{д}}. \quad (4.19)$$

$$\frac{dv}{dt} = A + g - B - Dv, \quad (4.20)$$

$$\frac{1}{D} \cdot \frac{dv}{dt} = \frac{A + g - B}{D} - v. \quad (4.21)$$

$$v_0 = \frac{A + g - B}{D}. \quad (4.22)$$

$$\frac{1}{D} \cdot \frac{dv}{(v_0 - v)} = dt, \quad (4.23)$$

$$\frac{dv}{(v_0 - v)} = D \cdot dt. \quad (4.24)$$

$$- \ln(v_0 - v) = D \cdot t + C. \quad (4.25)$$

$$\ln(v_0 - v) = -D \cdot t + \ln v_0, \quad (4.26)$$

$$\ln(v_0 - v) - \ln v_0 = -D \cdot t, \quad (4.27)$$

$$\ln \left((v_0 - v) / v_0 \right) = -D \cdot t, \quad (4.28)$$

$$(v_0 - v) / v_0 = e^{-D \cdot t}, \quad (4.29)$$

$$v_0 - v = v_0 \cdot e^{-D \cdot t}. \quad (4.30)$$

$$v = v_0 \cdot (1 - e^{-D \cdot t}). \quad (4.31)$$

$\frac{A + g - B}{D} - v = 0$	(4.32)
$v_0 = \frac{A + g - B}{D}$	(4.33)
$v_0 = \frac{-N_{\text{эп}} \left[\frac{P_0^2 V \beta_0}{2\lambda} \right] \cdot \left[\frac{5\rho - 2\rho_0}{2\rho + \rho_0} - \frac{\beta}{\beta_0} \right] \cdot \sin\left(\frac{4\pi X}{\lambda}\right) + g - \pi\rho_{\text{ж}}gR^2h}{\dots}$	(4.34)
$S_{\text{ж}} = S_{\text{д}} - S_{\text{эп}} = \pi(R^2 - N_{\text{эп}}r_{\text{эп}}^2)$	(4.35)
$\pi(R^2 - N_{\text{эп}}r_{\text{эп}}^2) / N_{\text{отв}} = \pi r_{\text{отв}}^2$	(4.36)
$N_{\text{отв}} = \left(\frac{R}{r_{\text{отв}}}\right)^2 \times (1 - k_2 2\pi c r_{\text{эп}}^3)$	(4.37)
$N_{\text{отв}} = (2R\sqrt[3]{c})^2 \times (1 - k_2 2\pi c r_{\text{эп}}^3)$	(4.38)

Таблицы

5.3 Обсуждение результатов: влияние различных цифровых способов обработки на величину разрешающей способности АОМ

Таблица 5.2.1

Результаты обработки экспериментальных данных способом цифровой фотометрии

№	Группа крови	Средняя яркость пикселей в зоне W			Значение разрешения	
		-А	-В	Clean	R _a	R _b
1	0(I)	93.73645625	99.33925	126.957565625	0.738329029771	0.782460261513
2	A(II)	198.0	127.960959375	111.94503125	1.76872521977	1.14306957572
3	B(III)	99.86934375	198.0	118.473025	0.842971163689	1.67126651826
4	AB(IV)	198.0	198.0	113.58563125	1.74317823321	1.74317823321
5	0(I)	86.8737375	89.2495875	209.35335625	0.414962239231	0.426310755646
6	0(I)	76.9556375	70.035025	82.205246875	0.936140215198	0.851953222724
7	A(II)	197.85344375	83.897684375	95.2284375	2.07767184829	0.881015026368
8	A(II)	197.8592	89.3042875	106.46955	1.85836419897	0.838777730346
9	B(III)	110.96478125	197.9998	127.584640625	0.86973463817	1.55190937585
10	B(III)	74.269246875	197.9999625	96.76984375	0.767483381154	2.04609158005
11	AB(IV)	198.1875	198.0	64.571859375	3.06925496522	3.06635122353
12	A(II)	198.0	109.09554375	104.5303625	1.89418648577	1.0436732557
13	AB(IV)	197.9988875	197.9973125	149.002415625	1.32883005064	1.32881948034
14	B(III)	206.982828125	197.9998	142.017984375	1.45744096451	1.39418821406
15	0(I)	117.166015625	119.921671875	118.762428125	0.986557933134	1.00976103106

16	B(III)	114.9797625	197.95626875	136.42251875	0.842820991384	1.45105273355
17	AB(IV)	197.997946875	197.92614375	74.08568125	2.67255350203	2.67158431171
18	0(I)	91.228003125	104.009228125	113.414690625	0.804375540966	0.917070156889
19	A(II)	253.992653125	97.6631125	92.80999375	2.73669507843	1.05229090698
20	AB(IV)	253.99468125	254.0	171.881765625	1.47772906757	1.47776001181
21	0(I)	122.36495	127.90919375	139.276371875	0.878576519137	0.918384016097
22	0(I)	123.80993125	128.239909375	145.426403125	0.851357996825	0.881819990176
23	B(III)	108.165625	253.996478125	133.800309375	0.808410873676	1.89832504358
24	AB(IV)	254.0	253.996928125	115.40473125	2.20094962528	2.200923007
25	B(III)	120.623921875	253.0	135.731190625	0.888697147056	1.86397834451
26	0(I)	184.07125625	168.77089375	140.70584375	1.30819908644	1.19945902211
27	0(I)	107.774565625	105.193721875	118.614846875	0.908609406532	0.886851221802
28	0(I)	92.023746875	117.31683125	108.002	0.85205595151	1.08624684034
29	0(I)	148.48665	147.1756125	140.6566375	1.05566756492	1.04634672857
30	A(II)	253.638746875	182.696825	145.418015625	1.74420442876	1.25635619641
31	B(III)	250.90809375	252.974559375	177.214409375	1.41584476474	1.42750558641
32	AB(IV)	253.98681875	253.274815625	100.124053125	2.53672130545	2.52961009588
33	0(I)	112.34763125	109.7913375	131.640053125	0.853445654138	0.834026839808
34	A(II)	253.967165625	163.26560625	177.845953125	1.42801768138	0.918016988192
35	B(III)	116.702884375	253.987071875	167.358375	0.697323240471	1.51762391261

Таблица 5.2.2

Результаты обработки экспериментальных данных способом подсчёта дисперсии распределения пикселей

№	Группа крови	Значение дисперсии			Значение разрешения	
		-A	-B	Clean	R _a	R _b
1	0(I)	10109.8818359	13419.7062988	6724.13989258	1.50352044982	1.99575061097
2	A(II)	389099.121094	9268.65136719	10037.3618164	38.7650787339	0.923415090212
3	B(III)	11740.4064941	389099.121094	5790.36791992	2.02757521741	67.1976507322
4	AB(IV)	389099.121094	389099.121094	5807.44555664	67.0000462852	67.0000462852
5	0(I)	16333.395752	18439.0351562	27325.5322266	0.597733856253	0.674791436938
6	0(I)	18889.1450195	23011.6262207	12660.7553711	1.49194455353	1.81755555227
7	A(II)	307260.571533	18202.7587891	19710.3630371	15.5887829643	0.923512101466
8	A(II)	145885.71582	11842.7084961	15223.4223633	9.58297762087	0.777926816552
9	B(III)	14247.9462891	388842.373291	10245.7277832	1.39062315441	37.9516596106
10	B(III)	16088.5578613	389069.859375	14646.5102539	1.09845673696	26.5639973366
11	AB(IV)	389099.121094	389099.121094	23563.3127441	16.5129209682	16.5129209682
12	A(II)	389099.121094	11578.8674316	14540.1682129	26.760290211	0.79633655279
13	AB(IV)	385309.229004	380753.132812	7824.09155273	49.2465133373	48.6641970184
14	B(III)	18434.5217285	388943.871094	9106.9309082	2.02422988758	42.7085562649
15	0(I)	12608.1098633	12478.5771484	12619.0822754	0.999130490485	0.988865662028
16	B(III)	10774.1633301	362191.512207	9286.67773438	1.16017413743	39.001193168
17	AB(IV)	376734.74707	344407.506836	21757.3405762	17.3152939235	15.8294854847
18	0(I)	11370.9521484	11217.6489258	9667.07641602	1.17625553571	1.16039725384
19	A(II)	384547.128906	11118.0471191	12467.3308105	30.8443831923	0.891774453417
20	AB(IV)	386058.02832	389099.121094	6801.4050293	56.7615112844	57.2086384236
21	0(I)	9788.40063477	10874.8522949	11912.6572266	0.821680708897	0.912882162904

22	0(I)	9497.76733398	9723.20898438	8041.81054688	1.18104838191	1.2090820752
23	B(III)	9503.12524414	387659.264404	11970.140625	0.793902556524	32.38552299
24	AB(IV)	389099.121094	387313.811523	9570.4777832	40.6561856062	40.4696421952
25	B(III)	9733.42797852	389099.121094	9671.93652344	1.00635771905	40.2297016891
26	0(I)	5834.55566406	5608.78833008	8665.83813477	0.673282326917	0.647229759298
27	0(I)	12130.6730957	10003.7763672	10630.28125	1.14114319371	0.941064129153
28	0(I)	11582.9116211	10480.9533691	13314.262207	0.869962709235	0.787197458347
29	0(I)	7483.77416992	10995.5952148	10023.2148438	0.746644094393	1.09701282336
30	A(II)	262384.606934	5225.35717773	9342.94287109	28.0837216446	0.559283862679
31	B(III)	75736.4787598	127285.108154	5252.64892578	14.4187208835	24.2325557929
32	AB(IV)	383247.962646	250688.800781	9742.2199707	39.3388738705	25.7322049323
33	0(I)	9814.67700195	11031.84375	8090.92041016	1.21304826947	1.36348439865
34	A(II)	371778.920898	6713.70898438	6080.20385742	61.1457986634	1.10419142874
35	B(III)	10775.6730957	376034.963135	8370.36889648	1.28735940183	44.9245389045

Таблица 5.2.3

Результаты обработки экспериментальных данных способом подсчёта количества пикселей с использованием граничного значения яркости

№	Группа крови	Количество пикселей, удовлетворяющих условию отбора			Значение разрешения	
		-A	-B	Clean	R _a	R _b
1	0(I)	0.0	0.0	24.78125	0.0	0.0
2	A(II)	10000.0	642.4375	4.625	2162.16216216	138.905405405
3	B(III)	0.0	10000.0	4.09375	0.0	2442.7480916
4	AB(IV)	10000.0	10000.0	3.8125	2622.95081967	2622.95081967
5	0(I)	0.0	0.0	3.5	0.0	0.0
6	0(I)	0.0	0.0	40.28125	0.0	0.0
7	A(II)	10000.0	0.15625	15.78125	633.663366337	0.00990099009901
8	A(II)	10000.0	0.0	18.46875	541.455160745	0.0
9	B(III)	0.0	10000.0	5.9375	0.0	1684.21052632
10	B(III)	0.0	10000.0	48.71875	0.0	205.259781911
11	AB(IV)	10000.0	10000.0	66.46875	150.446638458	150.446638458
12	A(II)	10000.0	454.4375	17.71875	564.373897707	25.6472663139
13	AB(IV)	8747.09375	8732.8125	4.09375	2136.69465649	2133.20610687
14	B(III)	9526.90625	8437.5	4.71875	2018.94701987	1788.0794702
15	0(I)	55.4375	51.15625	13.375	4.14485981308	3.82476635514
16	B(III)	0.0	10000.0	8.875	0.0	1126.76056338
17	AB(IV)	10000.0	10000.0	29.90625	334.378265413	334.378265413
18	0(I)	0.0	0.0	3.59375	0.0	0.0
19	A(II)	10000.0	263.40625	10.5625	946.74556213	24.9378698225
20	AB(IV)	9978.25	10000.0	3.75	2660.86666667	2666.66666667
21	0(I)	0.0	0.21875	6.59375	0.0	0.0331753554502
22	0(I)	0.1875	0.0	5.65625	0.0331491712707	0.0
23	B(III)	0.0	10000.0	8.3125	0.0	1203.0075188
24	AB(IV)	10000.0	10000.0	9.0625	1103.44827586	1103.44827586
25	B(III)	0.0	10000.0	6.875	0.0	1454.54545455
26	0(I)	6455.6875	2979.5	6.375	1012.65686275	467.37254902

27	0(I)	5.125	1.125	11.15625	0.459383753501	0.100840336134
28	0(I)	0.03125	769.5	15.03125	0.002079002079	51.1933471933
29	0(I)	637.09375	158.53125	10.34375	61.5921450151	15.3262839879
30	A(II)	10000.0	5070.71875	6.75	1481.48148148	751.217592593
31	B(III)	7817.375	8667.5625	8.4375	926.503703704	1027.26666667
32	AB(IV)	10000.0	10000.0	18.96875	527.182866557	527.182866557
33	0(I)	0.0	0.0	6.15625	0.0	0.0
34	A(II)	9958.25	0.0625	3.4375	2896.94545455	0.0181818181818
35	B(III)	0.0	9999.75	4.09375	0.0	2442.6870229

Таблица 5.2.4

Результаты обработки экспериментальных данных способом подсчёта суммарной яркости пикселей с использованием граничного значения яркости

№	Группа крови	Суммарная яркость пикселей, удовлетворяющих условию отбора			Значение разрешения	
		-A	-B	Clean	R _a	R _b
1	0(I)	0.0	0.0	4064.125	0.0	0.0
2	A(II)	1980000.0	96403.625	679.125	2915.51628934	141.952696484
3	B(III)	0.0	1980000.0	678.15625	0.0	2919.68112069
4	AB(IV)	1980000.0	1980000.0	609.6875	3247.5653511	3247.5653511
5	0(I)	0.0	0.0	791.34375	0.0	0.0
6	0(I)	0.0	0.0	4079.8125	0.0	0.0
7	A(II)	1978534.4375	17.40625	1763.09375	1122.19468619	0.00987256066219
8	A(II)	1978592.0	0.0	2283.375	866.520829912	0.0
9	B(III)	0.0	1979998.0	1080.96875	0.0	1831.68847388
10	B(III)	0.0	1979999.625	5415.1875	0.0	365.638239673
11	AB(IV)	1981875.0	1980000.0	5189.6875	381.887156019	381.525862588
12	A(II)	1980000.0	57417.5	2206.125	897.50127486	26.0264037623
13	AB(IV)	1731926.53125	1729222.53125	777.21875	2228.36431989	2224.88524788
14	B(III)	1979503.4375	1670623.0	876.53125	2258.33755214	1905.94801954
15	0(I)	7960.09375	7321.59375	1879.4375	4.23535964883	3.89563034153
16	B(III)	0.0	1979562.6875	1509.03125	0.0	1311.81026735
17	AB(IV)	1979979.46875	1979261.4375	2850.6875	694.562090285	694.310210256
18	0(I)	0.0	0.0	542.1875	0.0	0.0
19	A(II)	2539926.53125	31180.15625	1226.90625	2070.18794733	25.4136420366
20	AB(IV)	2534493.96875	2540000.0	872.65625	2904.34402865	2910.65353626
21	0(I)	0.0	37.0625	1116.40625	0.0	0.0331980405878
22	0(I)	41.03125	0.0	1049.3125	0.0391029840967	0.0
23	B(III)	0.0	2539964.78125	1306.3125	0.0	1944.37761351
24	AB(IV)	2540000.0	2539969.28125	1334.96875	1902.66626091	1902.64325008
25	B(III)	0.0	2530000.0	1142.03125	0.0	2215.3509372
26	0(I)	1235428.84375	554219.15625	1105.625	1117.40313737	501.27227247
27	0(I)	755.46875	163.875	1635.96875	0.461786785353	0.100170006304
28	0(I)	4.21875	102764.59375	1955.5	0.00215737663002	52.5515692917
29	0(I)	108846.8125	26734.28125	1753.71875	62.06628771	15.2443379248
30	A(II)	2536387.46875	987896.8125	1217.65625	2083.00780187	811.310098807
31	B(III)	1973673.09375	2195862.84375	2118.625	931.582084489	1036.45659036

32	AB(IV)	2539868.1875	2532748.15625	2456.875	1033.77997965	1030.8819766
33	0(I)	0.0	0.0	1030.1875	0.0	0.0
34	A(II)	2529311.125	14.59375	819.40625	3086.76084055	0.0178101521681
35	B(III)	0.0	2539821.34375	838.40625	0.0	3029.34447799

Таблица 5.2.5

Результаты обработки экспериментальных данных способом определения плотности распределения пикселей по яркости в зоне обработки W

№	Группа крови	Плотность распределения пикселей по яркости			Значение разрешения	
		-A	-B	Clean	R _a	R _b
1	0(I)	10.268444931	44.2194566484	25.6446652946	0.400412515159	1.72431404896
2	A(II)	5000.0	13.5197333196	12.8008938436	390.597723962	1.05615541264
3	B(III)	17.7912430588	5000.0	7.08140880885	2.51238751201	706.074191586
4	AB(IV)	5000.0	5000.0	24.8943480393	200.848802792	200.848802792
5	0(I)	38.3783246714	46.1541887149	137.461551339	0.279193158359	0.335760714653
6	0(I)	37.9894667552	37.8845413701	16.2759310287	2.33408870363	2.32764204415
7	A(II)	4437.3125	32.7036411582	35.3813026167	125.41405126	0.92431987348
8	A(II)	2846.59375	16.7727434007	22.2087615624	128.174357764	0.755230918822
9	B(III)	21.3701299251	4998.34375	14.0420926014	1.52186219901	355.954336144
10	B(III)	44.2023448973	4999.8125	21.4810875257	2.05773310334	232.754160794
11	AB(IV)	5000.0	5000.0	79.3967492577	62.974870467	62.974870467
12	A(II)	5000.0	13.6469272343	25.6613438669	194.845602239	0.531808751135
13	AB(IV)	4975.453125	4943.40625	8.73210622856	569.788433028	566.118427858
14	B(III)	73.3347532242	4999.0	10.260825393	7.1470618021	487.192775293
15	0(I)	20.7759945606	16.7175819032	19.1050647526	1.08746004422	0.875034035198
16	B(III)	16.3980340383	4823.421875	16.7485146565	0.97907392832	287.991023319
17	AB(IV)	4916.0	4702.53125	68.5511555285	71.7128684717	68.5988618827
18	0(I)	14.6437995221	13.7687993088	11.0309457892	1.32751985206	1.24819753193
19	A(II)	4970.546875	15.8156826226	16.5252919131	300.784210115	0.95705919785
20	AB(IV)	4979.890625	5000.0	6.32635751878	787.165538814	790.344204412
21	0(I)	9.77490603839	16.2383700373	16.2098130737	0.603023982692	1.00176170839
22	0(I)	10.2171149434	9.02730240691	9.31519521251	1.09682241867	0.969094281007
23	B(III)	9.66637038656	4990.65625	14.3798921745	0.672214385844	347.057974389
24	AB(IV)	5000.0	4988.484375	8.95034537968	558.637660101	557.35104774
25	B(III)	11.6552751336	5000.0	11.1839697964	1.04214114896	447.068446268
26	0(I)	6.22797617195	5.24969926946	10.8193921221	0.575630876637	0.485212035038
27	0(I)	17.7730663536	13.3241757992	13.9166232645	1.27711054727	0.95742879188
28	0(I)	15.2580519774	11.8816993029	17.1329716936	0.890566578311	0.693499033061
29	0(I)	7.3656582954	13.2021830847	14.9233888253	0.493564724584	0.884663881597
30	A(II)	4083.6875	4.36259397898	11.8193962235	345.50728504	0.369104639229
31	B(III)	2077.859375	2709.203125	4.12443093853	503.792985255	656.867132794
32	AB(IV)	4961.890625	3993.328125	13.4525184618	368.844736328	296.846136011
33	0(I)	9.59305908271	13.4372357237	7.1467463534	1.34229740477	1.88018925806
34	A(II)	4885.59375	6.11050656674	5.41974791802	901.44298663	1.1274521729
35	B(III)	13.532449692	4913.0625	7.65848856316	1.76698699493	641.518552843