

*На правах рукописи*



Марков Сергей Валерьевич

**Исследование физических принципов акустооптического метода  
определения группы крови человека по системе АВ0**

1.5.2 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Саратов – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

**Научный руководитель:** Дубровский Валерий Александрович, кандидат физико-математических наук, доцент, ведущий инженер кафедры оптики и биофотоники СГУ им. Н.Г. Чернышевского.

**Официальные оппоненты:**

1. Беликов Андрей Вячеславович, доктор физико-математических наук, профессор, профессор лаборатории биомедицинских лазерных технологий института лазерных технологий федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО» (Университет ИТМО).

2. Приезжев Александр Васильевич, кандидат физико-математических наук, доцент, доцент кафедры общей физики и волновых процессов физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»).

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева» (ФГБОУ ВО «ОГУ имени И. С. Тургенева»).

Защита состоится 19.06.2025 в 15:00 на заседании диссертационного совета 24.2.392.06, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корпус 10, ауд. 511.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. В.А. Артисевич федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» и на официальном сайте федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по электронному адресу:

<https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/24-2-392-06/kandidatskaya-dissertaciya-markova-sergeya-valerevicha>

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.2.392.06  
д. ф.-м. н., доцент



Генина Э. А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Определение групповой принадлежности крови человека по системе АВ0 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, посвящённых 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.

Для достижения данной цели авторами был решён ряд задач:

1. Обзор современных методов и аппаратуры для определения групповой принадлежности крови человека и скорости оседания эритроцитов (СОЭ), используемых как в научной, так и в медицинской практике;
2. Исследование процесса седиментации свободных эритроцитов, их агрегатов и агглютинатов, при условии наличия гемагглютинирующих агентов в образцах;
3. Теоретическая и экспериментальная демонстрация того, что процесс седиментации крови является коллективным процессом;
4. Разработка механической модели седиментации слоя крови;
5. Теоретическое и экспериментальное исследование влияния Ультразвуковой стоячей волны на протекание седиментации крови;
6. Создание экспериментальной установки АОМ, позволяющей производить определение групповой принадлежности исследуемого образца крови;
7. Создание ряда программных способов обработки экспериментальных данных, целью которых является повышение разрешающей способности АОМ.

#### **Научная новизна полученных результатов**

1. Исследованы процессы протекающие в образцах крови при их использовании в акустооптическом методе определения группы крови человека;
2. Разработаны и экспериментально апробированы механические и теоретические модели, описывающие седиментацию и группировку под действием УЗ эритроцитов и их агрегатов как коллективные процессы;
3. 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 порядка  $10^6$ .

#### **Методология и методы исследования**

Объектами исследования настоящей диссертационной работы являются образцы донорской крови человека, а точнее – ряд процессов, протекающих в них при типировании с помощью седиментационного АОМ. В связи с этим, основным методом исследования выступает эксперимент и его цифровая

видеорегистрация с целью последующей обработки различными программными способами. В качестве основной методики здесь выступает анализ изображений (отдельных кадров), в результате которого получают величины некоторых параметров, например, скорости седиментации, или же объектов для дальнейшего анализа – распределение пикселей по яркости.

Для построения моделей процессов используются математическое, имитационное моделирование для описания седиментации слоя крови и группировки эритроцитов, а также физическое моделирование для построения механической, дисковой модели оседания слоя крови.

При сопоставлении результатов моделирования и экспериментальных результатов использовался прямой метод и корреляционный анализ.

Авторами настоящей работы также был разработан и реализован на высокоуровневом языке программирования Python ряд способов обработки полученных в ходе экспериментов данных с целью определения и последующего увеличения значения разрешающей способности всего седиментационного АОМ. При этом использовались статистические методы (критерий Фишера), а также некоторые методы, предложенные авторами с учётом особенностей экспериментальных данных.

#### **Практическая значимость полученных результатов**

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  $2,5 \times 10^6$ .

#### **Достоверность полученных результатов**

Подтверждается воспроизводимостью полученных результатов, их соответствием тем данным, которые были получены другими авторами, работающими в том же направлении. Также это подтверждается фактом прохождения этих результатов через критическое рассмотрение рецензентами. Достоверность экспериментальных результатов была обеспечена использованием современной цифровой аппаратуры. Все выявленные и сформулированные закономерности, формулы и описания моделей и процессов были получены в результате строгого анализа полученных в ходе исследования данных с помощью принятых современных методик обработки.

#### **На защиту выносятся следующие результаты и положения:**

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  $10^4 - 2,5 \times 10^6$ .

#### **Апробация работы**

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих международных и российских конференциях: Saratov Fall Meeting - 2017, - 2018, - 2019, - 2020, - 2021 г. (Саратов, Россия); Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2017, -2018 (Саратов, Россия).

#### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 9 работ в отечественных и зарубежных изданиях, из них 4 статей в журналах из перечня, рекомендованного ВАК.

#### **Личный вклад автора**

Личный вклад автора состоит в самостоятельном выполнении представленный в настоящей диссертации экспериментальных исследований, анализа данных и расчётов. А именно, проведение экспериментов по изучению седиментации крови в зависимости от ряда факторов; пробоподготовка, настройка экспериментальной установки, проведение опытов, сбор полученных экспериментальных данных, их предварительный анализ, расчёты искомых величин и эмпирических зависимостей: смещение границы "седимент-супернатант" от времени; скорость седиментации крови от концентрации цельной крови в образце; оптимальное содержание крови в образце; оптимальная длительность ультразвукового воздействия на образец при опытах по типированию образцов. Выполнение основных расчётов как по моделированию, так и по обработке экспериментальных данных, а также разработка программных способов анализа, с точки зрения написания программного кода, также были выполнены автором работы.

#### **Объём и структура диссертации**

Работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка использованных источников и приложения. Основное содержание работы представлено на 148 страницах, в 46 рисунках и в 7 таблицах. Список используемой литературы включает в себя 95 наименования.

#### **Основное содержание диссертационной работы**

Во **введении** дано обоснование актуальности темы исследования, сформулированы цель и основные задачи исследования. Сформулированы пункты научной новизны и практической значимости полученных результатов, представлены основные положения, выносимые на защиту.

**Первая глава** содержит краткое описание ключевых для АОМ процессов, связанных с эритроцитами: агрегация и агглютинация. Также представлен обзор современных научных работ по теме настоящего исследования.

**Раздел 1.1** посвящён описанию и сопоставлению двух процессов: агрегации и агглютинации эритроцитов. Оба процесса своим результатом имеют образование клеточных комплексов – ассоциатов: агрегатов и агглютинатов, соответственно. В силу обратимости агрегации наличие первых является нормальным, регулярным, как *in vivo*, так и *in vitro*, в то время как вторые образуются только *in vitro* при наличии в образце крови соответствующего агглютинирующего агента (сыворотки или цоликлона). Оба процесса являются фундаментальными для АОМ: агрегация эритроцитов играет ключевую роль в седиментации, а агглютинация выступает в качестве маркёра при типировании исследуемого образца крови. Помимо этого, в данном разделе изложены основные принципы, на которых построена система групповой принадлежности крови человека АВ0. С практической точки зрения ценность представляет таблица 1, в которой приведены случаи наличия и отсутствия реакции агглютинации при добавлении цоликлона определённого типа в образец крови в зависимости от его групповой принадлежности.

Таблица 1  
Исход реакции агглютинации в зависимости от группы крови и цоликлона

Тип реакции агглютинации		Группа крови образца
анти-А	анти-В	
–	–	0(I)
+	–	А(II)
–	+	В(III)
+	+	АВ(IV)

**В разделе 1.2** приводятся примеры использования некоторых современных методов анализа крови и их обзор. Во внимание брались методы как связанные с анализом крови, так и с исследованием седиментации (СОЭ). В частности, те методы, которые являются предшествующими для седиментационного АОМ: фотометрический, проточный и микроскопический методы.

**Раздел 1.3** содержит обобщённый вывод по первой главе настоящей диссертационной работы.

Во **второй главе** описываются основные характеристики и принцип работы АОМ типирования крови, его преимущества, а также результаты, получаемые с помощью данного метода.

**В разделе 2.1** приводятся процессы, протекающие в образцах при типировании с помощью АОМ, а также их принципиальное описание непосредственно в рамках эксперимента. Иными словами, описывается принцип действия седиментационного АОМ.

Пример проведения эксперимента по типированию одной пробы крови приводится в **разделе 2.2**.

Первым этапом является пробоподготовка. Заготавливаются три кюветы (образца) со следующими растворами: две кюветы – кровь+физраствор+цоликлон (*анти-А* и *анти-В*); третья кювета (чистый образец) – кровь+физраствор. Пропорции рассчитываются с учётом двух

условий: объёмная концентрация цельной крови во всех трёх образцах одинаковая и составляет 2%; соотношение кровь : цоликлон должно составлять 1 : 10. Стоит отметить, что в силу своей высокой активности цоликлон добавляется в кювету с образцом непосредственно перед началом регистрации эксперимента.

Второй этап – проведение эксперимента и регистрация группировки эритроцитов и последующей седиментации. Для этого используется установка, схема которой приведена на рисунке 1а. Она состоит из следующих частей: 1 – светодиод, 2 – конденсор, 3 – нейтральный светофильтр, 4 – кювета с образцом, 5 – ультразвуковой преобразователь, 6 – генератор, 7 – 8-разрядная цифровая камера, 8 – компьютер. 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. 1б). Такой выбор спектра зондирующего излучения был сделан с целью повышения контрастности регистрируемого изображения.

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

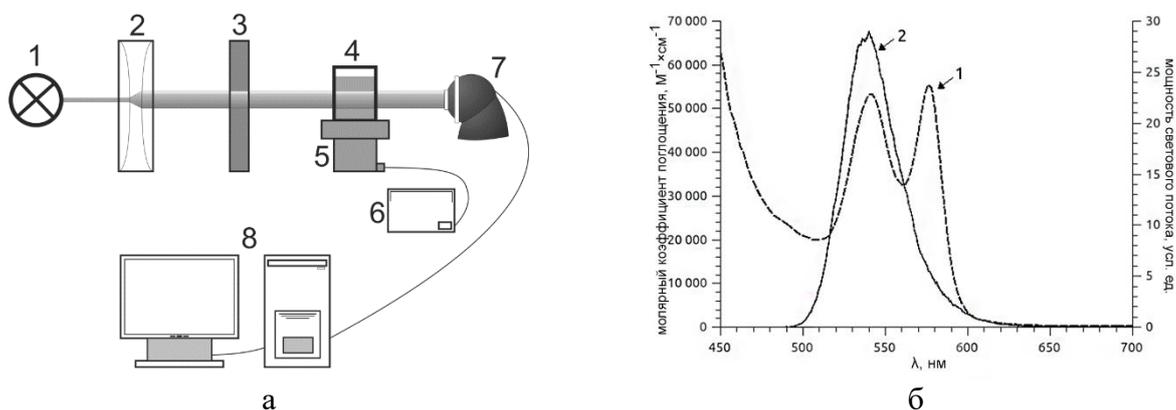


Рисунок 1. а) Схема экспериментальной установки АОМ типирования крови.  
б) Спектры: 1 – поглощение гемоглобина (левая ось ординат); 2 – излучение светодиода (правая ось ординат).

Длительность полученных в результате регистрации видеороликов составляла порядка 2 минут. Это связано с достаточно быстрым "насыщением" седиментации в случаях наличия реакции агглютинации в образце. Для дальнейшего программного цифрового анализа полученные ролики разбивались

на отдельные кадры, которые в свою очередь обрабатывались в зелёной компоненте. Такой выбор продиктован так же поглощающей способностью эритроцитов. На рисунке 2 приведены примеры таких кадров для всех трёх образцов.

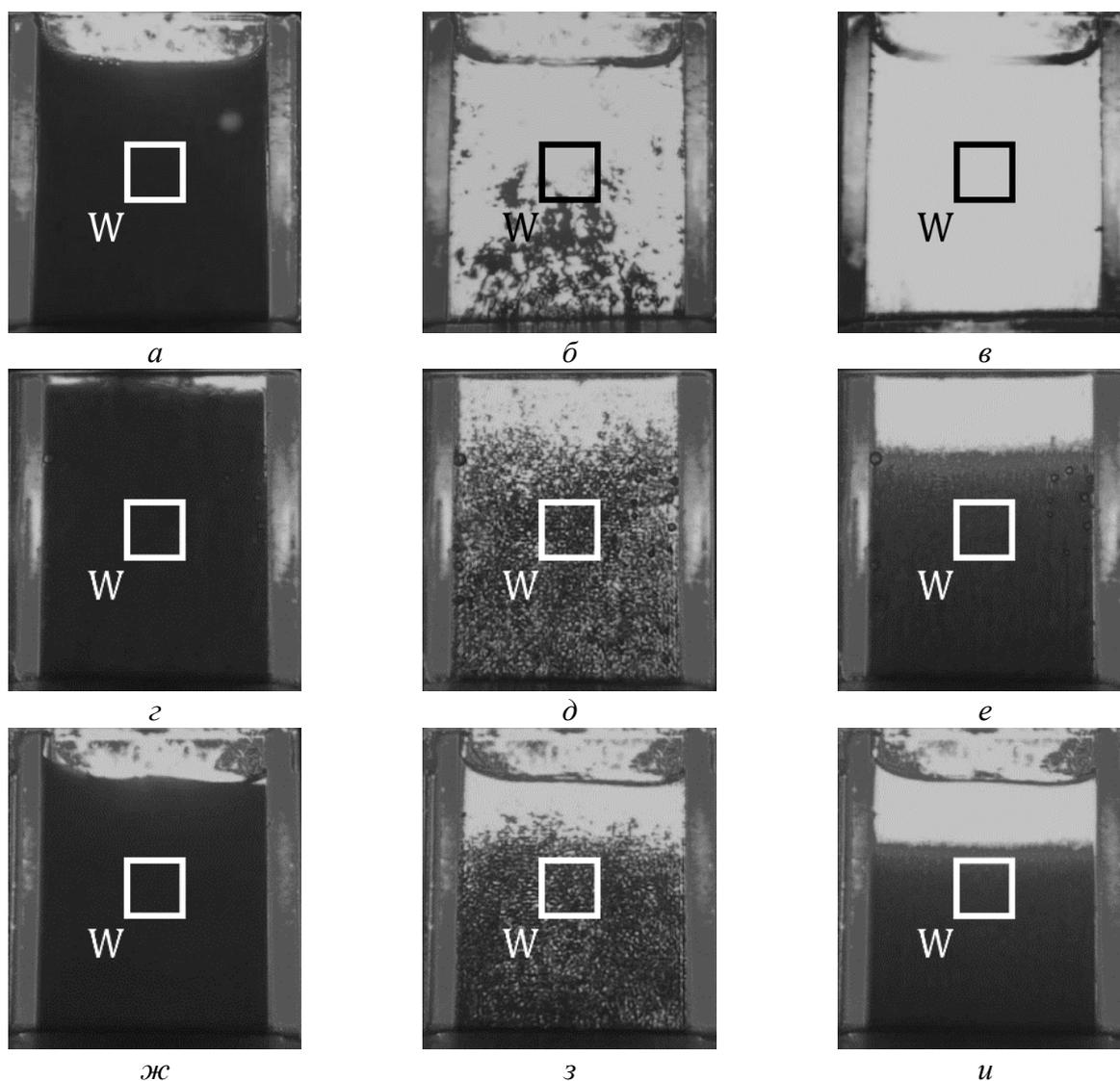


Рисунок 2. Примеры исследуемых цифровых изображений.

На рисунке 2 изображения *а*, *б*, *в* соответствуют положительной реакции агглютинации; *г*, *д*, *е* – отрицательной реакции агглютинации; *ж*, *з*, *и* – чистому образцу; *W* – зона обработки изображений. На данном рисунке нетрудно заметить отличие изображения *в* от *е* и *и*, что демонстрирует наличие быстро осевших крупных агглютинатов (*в*) и, как следствие, возможность типирования образца.

В разделе 2.3 определяется понятие разрешающей способности седиментационного АОМ. Общий принцип состоит в том, что полученные в процессе программного анализа изображений в зоне *W* величины для каждого из трёх случаев сначала сопоставляются между собой, а именно величины, полученные от образцов с цоликлонами с величинами чистого образца. Таким

образом получают по два значения разрешения для каждой пробы. Далее по значениям этих величин и данным, приведённым в таблице 1, определяют групповую принадлежность исследуемой пробы крови, а за итоговую величину разрешения берут то значение, которое соответствует образцу с положительной реакцией агглютинации.

**Разделе 2.4** содержит краткий вывод по главе 2, а также предпосылки к последующим главам, в которых будут подробно разобраны три основных принципа седиментационного АОМ: седиментация (глава 3) и группировка (глава 4) эритроцитов; способы цифровой обработки экспериментальных результатов (глава 5).

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 **разделе 3.1** приведены условия и результаты экспериментов по исследованию седиментации эритроцитов. Сами эксперименты проводились на установке, представленной на рисунке 2.1, но без применения ультразвука к образцу. Анализ полученных данных так же проводился цифровым способом. Принцип заключается в слежении за границей раздела оседающей эритроцитарной массы и надосадочного слоя плазмы крови с целью определения скорости седиментации. На рисунке 3 приведены примеры изображений кювет с образцами.

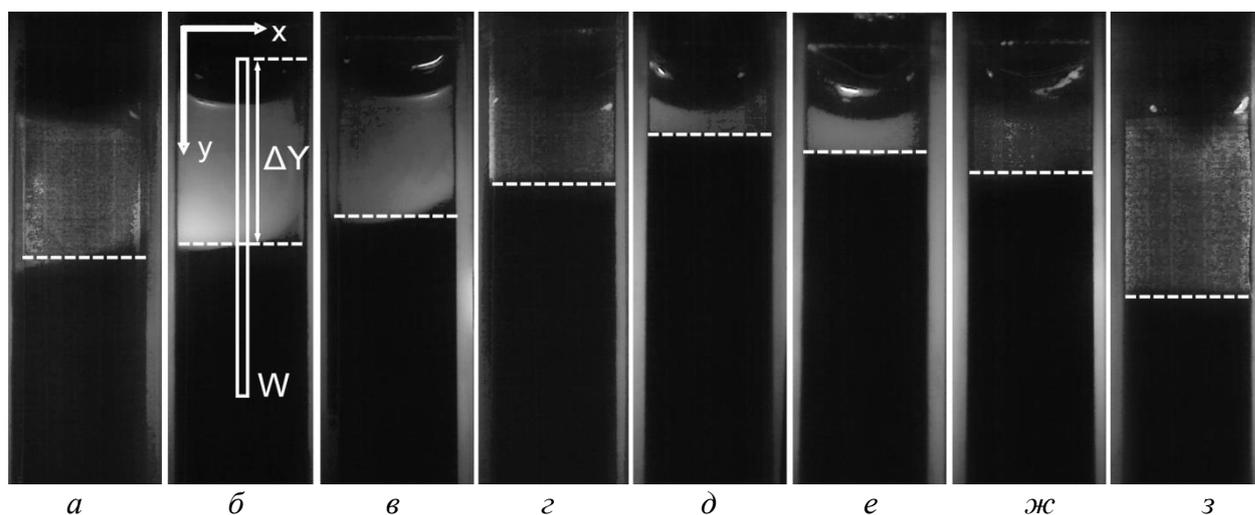


Рисунок 3. Изображения кювет с образцами крови.

На рисунке 3: 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  $\Delta Y$  – смещение границы к данному моменту времени. Здесь отчётливо видно, что граница раздела сред опустилась ниже для

образца с цельной кровью. Это обусловлено наличием большого числа эритроцитарных агрегатов во взвеси образца.

Результатами обработки экспериментальных данных являются кинетические кривые – графики, показывающие смещение границы раздела сред с течением времени. Они приведены на рисунке 4.

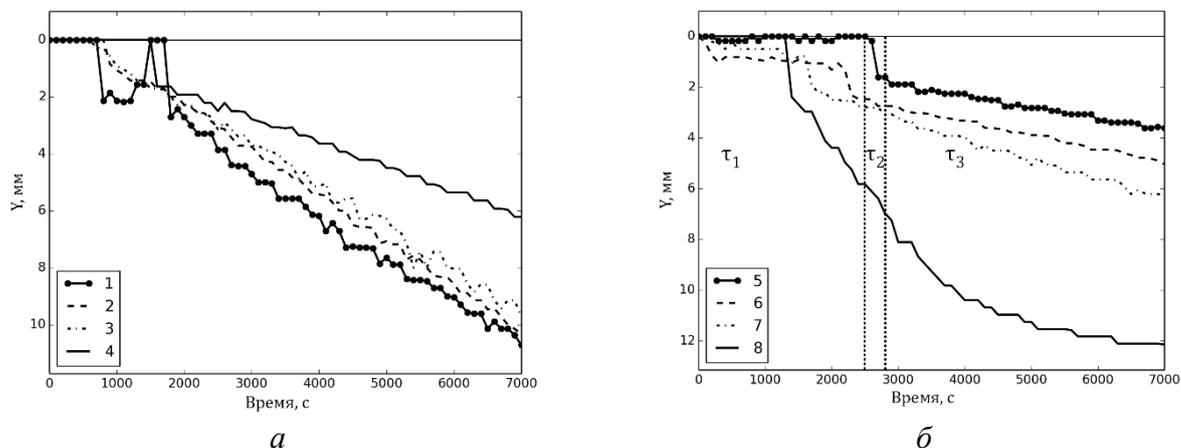


Рисунок 4. Зависимости перемещения границы "седимент-супернатант" от времени.

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

Из полученных графиков можно сделать один важный вывод – после начала седиментации слой крови движется равномерно в определённых пределах. Ограничения связаны с тем, что с течением времени эритроциты более плотно упаковываются в нижней части кюветы, тем самым замедляется оседание вышерасположенных слоёв. Этот эффект насыщения отчётливо виден на примере образца с цельной кровью (рис. 4б, график 8).

С учётом вышеизложенного происходит расчёт средней скорости седиментации крови для каждого образца. Результаты данных расчётов приведены на рисунке 5.

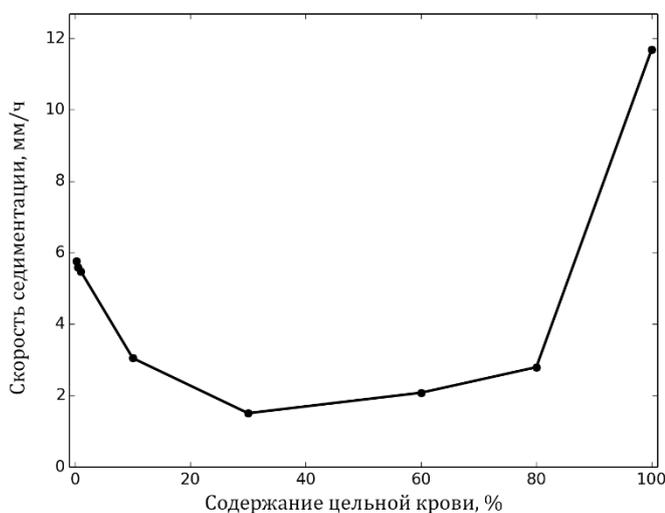


Рисунок 5. Зависимость скорости седиментации крови от её концентрации в образце.

В разделе 3.2 приводятся результаты исследования седиментации крови при условии наличия в образце гемагглютинирующего агента, цоликлона, принципиально подобранного так, чтобы имела место положительная реакция агглютинации, то есть наличие агглютинатов в образце заявлено априори в постановке условий эксперимента. Проведение и обработка полученных данных производились по тому же алгоритму, что и в предыдущем разделе 3.1. Естественно, отличием здесь являлось время, которое требовалось образцу для просветления. Наличие цоликлона во взвеси приводит к лавинообразному процессу образования агглютинатов, что приводит к увеличению скорости седиментации. Результаты анализа приведены на рисунке 6.

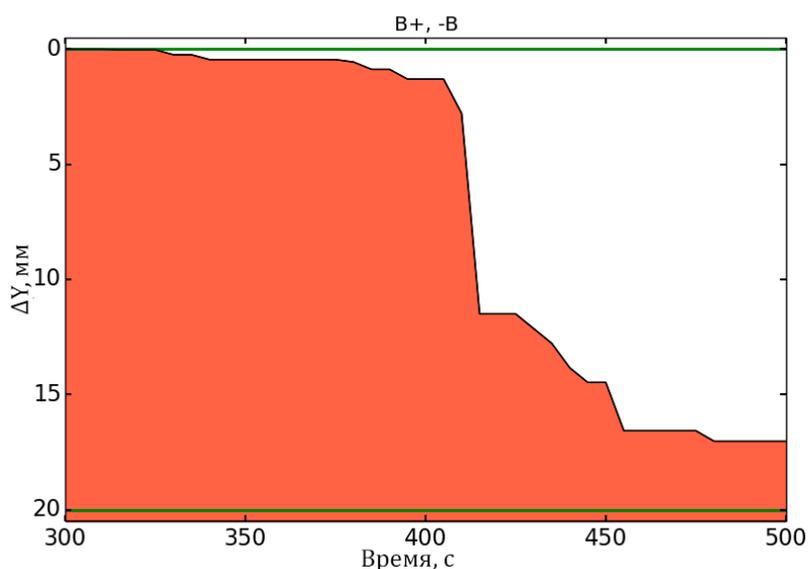


Рисунок 6. Кинетика движения границы "седимент-супернатант" для образца с агглютинатами.

Кинетика седиментации на рисунке 6 показывает схожесть между оседанием агрегатов и агглютинатов: вначале скорость седиментации минимальна, так как клеточные комплексы только начинают формироваться, а по мере образования более крупных ассоциатов она возрастает. Естественно, что имеет место такое явное различие между этими случаями – агрегаты могут распадаться, дезагрегировать, при их столкновении с другими клетками или комплексами, агглютинаты же не разрушаются, а наоборот увеличивают свои размеры за счёт того же эффекта. Как результат седиментация без агглютинатов проходит равномерно (раздел 3.1), а при их наличии, точнее при наличии подходящего для их образования цоликлона, имеет лавинообразный характер.

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.

**Раздел 3.3** полностью посвящён разработанным в рамках настоящей диссертационной работы теоретическим, математическим моделям седиментации. Особое внимание здесь уделяется описанию и трактовке принципа, который применяется для моделирования – коллективный подход к описанию движения эритроцитов и их агрегатов. С учётом экспериментальных результатов, полученных в разделе 3.1, выделим по отношению к концентрации крови в образце два случая, в которых имеет место наибольшая скорость оседания: низкое содержание крови ( $c < 30\%$ ) и высокое, вплоть до цельной крови ( $30\% < c < 100\%$ ). Принципиальное различие между ними заключалось в возможности спонтанной агрегации – при малом содержании крови в образце межклеточное расстояние оказывается достаточно большим по отношению к размеру самих эритроцитов, что говорит о том, что вероятность образования агрегатов крайне мала; в другом случае ситуация противоположная – с ростом концентрации в образце вплоть до состояния нативной, цельной крови межклеточное расстояние соизмеримо или меньше самих клеток, что приводит к образованию достаточно крупных агрегатов. В связи с этим было решено разработать две модели для каждого случая, соответственно.

Первая модель получила название "*Модель коллективной седиментации эритроцитов*", что ещё раз подчёркивает принципиальное отсутствие агрегатов во взвеси образца при моделировании. Модель в своём конечном виде представляет собой выражение, с помощью которого определяется величина скорости оседания монослоя крови, представляющего собой цилиндр, состоящий из эритроцитов и плазмы крови. Его толщина (высота) составляет 5.5 мкм – это диаметр сферической модели эритроцита, а диаметр соответствует диаметру сосуда, в котором находится образец. Как было указано выше, рассматриваемый монослой неоднороден, поэтому его плотность рассчитывалась с учётом наличия плазмы в межклеточных пространствах. Как итог полученная модель слоя крови приобрела название *квазисплошной монослой (диск)*. Это подчёркивает его неоднородность, но в то же время говорит о том, что все клетки внутри него движутся вместе. Естественно, такое представление является допущенным упрощением, но, с учётом экспериментальных результатов из раздела 3.1, где подтверждается равномерность седиментации, можно представить весь образец в виде множества таких монослоёв, которые в определённых пределах движутся с постоянной скоростью в одном и том же направлении, находясь на некотором расстоянии друг от друга и никак не взаимодействуя. Поэтому определение скорости седиментации для одного такого монослоя будет являться определением скорости седиментации для всех остальных, или же для всего образца целиком. В конечном виде данная модель представлена в виде выражения (1), учитывающего множество параметров крови и образца:

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

Сопоставление результатов моделирования с экспериментальными данными представлено на рисунке 7.

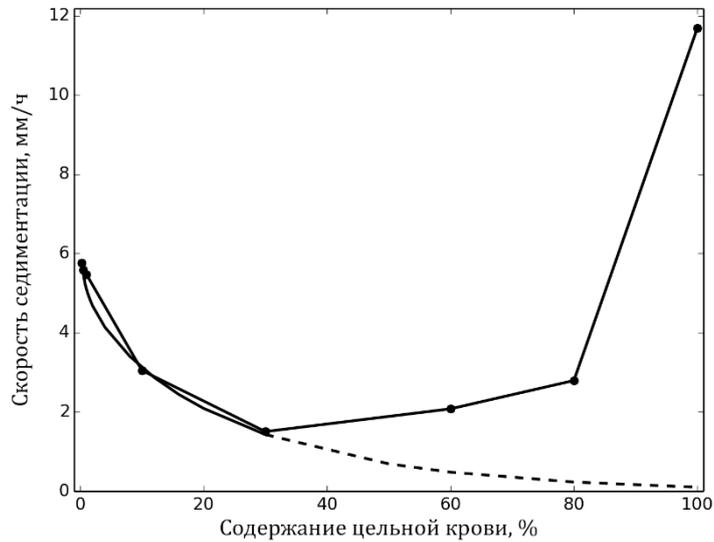


Рисунок 7. Зависимости скорости седиментации от концентрации цельной крови в образце.

Точки – результаты экспериментов; пунктирная линия – результат моделирования.

Как видно из рисунка 7, модель коллективной седиментации эритроцитов полностью совпадает с экспериментальным графиком до значения концентрации крови примерно равной 30%. Это ещё раз подчёркивает тот факт, что в образцах с концентрацией выше 30% уже имеет место агрегация, которая значительно влияет на седиментацию.

Вторая модель "Модель коллективной седиментации агрегатов" имеет те же общие принципы, но с важными отличиями:

- монослой – неоднородный диск, состоящий из агрегатов и плазмы крови, все эритроциты которого входят в состав всех агрегатов одинакового размера;
- между стенкой сосуда и монослоем есть расстояние (кольцо), что обусловлено перераспределением клеток по комплексам в процессе агрегации.

Таким образом здесь учитываются не только параметры клеток и пор в монослое, но ещё и влияние кольца на седиментацию, а также агрегационная способность эритроцитов.

При учёте всех параметров, влияющих на седиментацию в данном случае, модель была выражена следующим образом:

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

Сопоставление результатов расчётов и эксперимента приведено на рисунке 8.

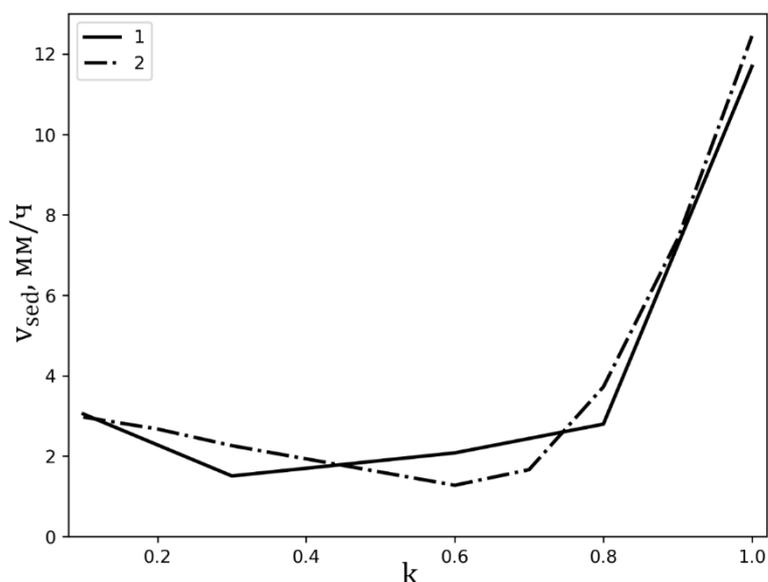


Рисунок 8. Зависимость скорости седиментации крови в образце от содержания её в образце.

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

Как видно по рисунку 8 данная модель не только достаточно совпадает с экспериментом, но и то, что является более полной, так как с её помощью оказалось возможным определение скорости седиментации как при больших значениях концентрации крови в образце, так и при малых, что являлось областью интереса при построении "модели седиментации эритроцитов". Это связано с тем, что при значении параметра  $q = 1$  (то есть по условиям создания модели агрегат состоит из одного эритроцита) модель как бы перестраивается.

Помимо построения моделей седиментации в данном разделе подробно описаны факторы, которые влияют на этот процесс.

В разделе 3.4 разобраны предложенные авторами механические модели седиментации. Первая модель отражает поведение эритроцитарного ассоциата, а точнее зависимость между количеством эритроцитов в агрегате ( $q$ ) и его скоростью оседания. В разработке этой модели также был использован коллективный подход — агрегат представляет собой квазисплошной шар, состоящий из клеток и плазмы крови. Результаты моделирования как экспериментальные, так и математические, показывают, что с линейным ростом величины  $q$  скорость оседания агрегата также возрастает, но по другому закону. Это является ещё одним подтверждением тому, что агрегация в значительной степени влияет на седиментацию.

Вторая механическая модель рассматривает оседание монослоя и представляет собой диск, учитывающий такие параметры как размер и количество пор, величину зазора (кольца). Для каждого определённого набора параметров создавался отдельный диск. Такие параметры как плотность диска и его геометрические размеры подбирались согласно условиям проведения экспериментов. Данная механическая модель была также описана и математически, а затем было проведено сравнение не только внутри модели, но

с экспериментальными данными и моделью седиментации крови. При соответствии определённых параметров все модели и эксперименты показали достаточно схожее поведение. Этот факт ещё раз подтверждает, что к описанию седиментации абсолютно правомочно применять коллективный подход.

**Раздел 3.5** содержит ключевые выводы по главе 3, касающиеся итогов моделирования седиментации крови как математическими, так и механическими моделями.

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.

Описание экспериментов по влиянию ультразвука на образцы крови, а также анализ и интерпретация полученных данных приводится в **разделе 4.1**. Главным результатом такого рода воздействия на образец крови является группировка эритроцитов и их последующая индуцированная агрегация или агглютинация. Целью данного раздела является сопоставление величин скорости седиментации при различных комбинациях условий эксперимента.

Исследование было разделено на две группы по объектам влияния УЗ:

- образцы без цоликлонов – влияние на группировку агрегацию эритроцитов;
- образцы с цоликлонами – влияние на образование крупных агглютинатов при группировке и последующее сравнение результатов двух исходов реакции агглютинации.

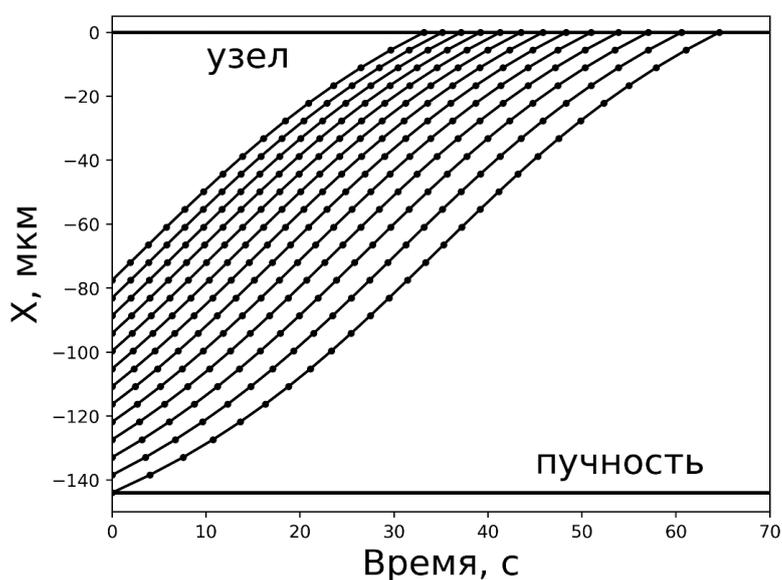
Результаты первой группы показали, что в целом УЗ воздействие способствует незначительному повышению скорости седиментации, но в некоторых случаях, при высоком содержании крови в образце, эффект был противоположный.

Во второй группе при несоответствии группы крови пробы и цоликлона наблюдались схожие эффекты, как для проб из первой группы. В ином случае, когда соответствие выполнялось, группировка УЗ приводила к образованию особо крупных агглютинатов, которые быстро оседали, в некоторых случаях ещё до отключения УЗ воздействия. Для таких случаев был разработан особый способ анализа с целью определения эквивалентной скорости седиментации, так как здесь принципиально отсутствует граница раздела сред эритроцитарная масса – плазма крови. Основываясь на том, что скорость седиментации непосредственно связана с просветлением образца, этот способ создавал искусственные изображения зоны интереса с учётом того, сколько эритроцитов и их комплексов в ней находятся.

Полученные в ходе всех вышеперечисленных вариантов условий проведения экспериментов величины скорости седиментации приведены в таблице 4.1 настоящей диссертационной работы.

В **разделе 4.2** при математическом моделировании группировки эритроцитов в поле стоячей УЗ волны применяется коллективный подход к

описанию движения эритроцитарных слоёв. Продемонстрировано, что, хоть и движение слоёв здесь не равномерное, а ускоренное за счёт действия радиационной силы, рассматриваемые слои движутся так, что каждый слой не взаимодействует с ближайшими слоями. Это обусловлено тем, что движение происходит от пучностей к узлам стоячей волны, а радиационная сила действует больше именно с приближением к узлу – значит у слоёв, расположенных ближе к узлу исходное ускорение выше, чем у тех, что расположены ближе к пучности. Как итог, в модели показано, что скорость движения гармонически зависит от координаты слоя. Рассмотренный случай только одного участка равной четверти длины волны между пучностью и узлом может быть распространён на весь объём образца. На рисунке 9 показана динамика перемещения слоёв эритроцитов в пределах рассматриваемого участка.



*Рисунок 9. Зависимость координаты положения монослоя от времени при различных начальных координатах.*

На основе этого был проведён корреляционный анализ между экспериментальными данными, изображением расслоения образца, и искусственно созданной синусоидой с параметрами, соответствующими стоячей волне. Результаты этого анализа показали достаточно высокий уровень сходства между объектами на протяжении всего времени УЗ воздействия. При проведении такого же анализа, но с образцом, в котором протекала реакция агглютинация, были получены обратные результаты – через несколько секунд после начала воздействия периодическая структура нарушалась в следствие образования крупных агглютинатов. Сравнение результатов корреляционного анализа дополнительно показывают значимость двух процессов для седиментационного АОМ: группировки и агглютинации.

В разделе 4.3 обобщенно приводятся результаты исследований по воздействию ультразвука на образцы крови при различных условиях 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 разделе 5.1 описывается программно реализованный фотометрический способ для цифровой обработки экспериментальных данных и определения разрешения седиментационного АОМ. Его принцип схож с аналоговой фотометрией, но здесь используются величины яркости пикселей зоны интереса  $W$  на изображении, а не, например, величина фототока.

**Раздел 5.2** посвящён статистическим способам анализа экспериментальных данных. Основным объектом здесь является распределение пикселей цифрового изображения в зоне интереса  $W$ , которое имеет специфический вид для разных исходов реакции агглютинации.

В связи с этим, первый способ – вычисление дисперсии для полученной выборки. Возможность определения данной величины обусловлена тем, что все распределения имеют вид близкий к нормальному распределению.

Второй и третий способы основаны на поиске определённого граничного значения по яркости для каждой отдельной пробы с дальнейшим подсчётом величин, связанных с пикселями, удовлетворяющих условиям разграничения распределения: их количество и суммарная яркость.

Четвёртый способ – определение средней плотности распределения пикселей по их яркости. Основная идея данного способа заключается в том, что при положительной реакции агглютинации наступает быстрое просветление образца, то есть на исследуемой части изображения практически все пиксели имеют одно и то же, причём близкое к предельному, значение яркости. В других случаях это не наблюдается и распределение пикселей выглядит иначе: ниже и шире. Из этого можно сделать вывод о том, что в первом случае значение средней плотности распределения пикселей по яркости будет значительно и стабильно выше, чем во втором.

Стоит также отметить, что описанные в разделах 5.1 и 5.2 способы применялись к анализу всех кадров из временного интервала обработки – с 90 по 120 секунду ролика. Полученные после этого величины по каждому образцу усреднялись и использовались для расчёта значений разрешающей способности и типирования исследуемой пробы крови.

В разделе 5.3 приводится обсуждение результатов, полученных с помощью вышеперечисленных способов анализа, а также числовые значения разрешения для нескольких проб. Подробно, на примере реальных данных, показан алгоритм типирования крови для каждого из представленных способов обработки. Проведено сравнение результатов настоящего исследования как внутри себя, так и с использующимися в современности подходами к типированию крови, с целью определения достоверности полученных величин

разрешения. В таблице 2 приведены максимально возможные величины разрешения, полученные данными способами обработки.

**Раздел 5.4** содержит краткий вывод по главе 5, приводятся основные преимущества представленных способов обработки и получения значения разрешающей способности седиментационного АОМ.

Таблица 2  
Пример определения групповой принадлежности проб крови.

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

В заключении сформированы основные выводы по всем выполненным задачам и в общем по всей диссертации, а также представлены перспективы ближайших исследований по теме работы.

### Список цитируемых источников

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](http://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.

## Список публикаций по теме диссертационной работы

### I. Издания, входящие в перечень ВАК и базы данных WoS, Scopus

1. Оптическая цифровая регистрация седиментации эритроцитов и ее моделирование в форме коллективного процесса, В.А. Дубровский, К.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 акусто-оптического метода определения группы крови человека, В. А. Дубровский, **С. В. Марков** // Оптика и спектроскопия, 2022, том 130, вып. 6, С 906–917;

### II. Прочие научные издания

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.