

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Аристов А.А., Евтушенко Г.С., Рафальский А.С.* Биотехническая система для фотометрического исследования капельных проб биожидкостей // Фотоника. – 2009. – № 6. – С. 32-35.
2. *Nishi K., Rand S., Nakagawa T., Yamamoto A., Yamasaki S., Yamamoto Y. et.al.* – ABO Blood Typing from Forensic Materials - Merits and demerits of detection methods utilized in our laboratories, and biological significance of the antigens. Режим доступа: http://www.geradts.com/anil/ij/vol_006_no_002/papers/paper001.html. – Загл. с экрана.

Аристов Александр Александрович

Национальный исследовательский Томский политехнический университет.

E-mail: aristov@tpu.ru.

634050, г. Томск, пр. Ленина, 30.

Тел.: 83822419605.

Рафальский Андрей СергеевичE-mail: rafalskiy_andrey@sibmail.com.**Евтушенко Геннадий Сергеевич**E-mail: ime@tpu.ru.**Жогло Екатерина Владимировна**E-mail: zhoglo@sibmail.com.**Aristov Alexander Alexandrovich**

National Research Tomsk Polytechnic University.

E-mail: aristov@tpu.ru.

30, Lenina av., Tomsk, 634050, Russia.

Phone: +73822419605.

Rafalsky Andrei SergeevichE-mail: rafalskiy_andrey@sibmail.com.**Evtushenko Gennady Sergeevich**E-mail: ime@tpu.ru.**Zhoglo Ekaterina Vladimirovna**E-mail: zhoglo@sibmail.com.

УДК 615.478

Е.В. Жогло, А.А. Аристов, А.С. Рафальский, Г.С. Евтушенко**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА
ФОТОМЕТРИРОВАНИЯ КАПЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ
РЕАКЦИИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ***

Рассмотрено применение метода фотометрирования пробы биологической жидкости, имеющей форму лежащей капли, для оценки реакции гемагглютинации. Представлено теоретическое обоснование и приведены результаты экспериментальных исследований использования предлагаемого подхода. Показана эффективность метода в плане минимизации используемых реагентов, повышения чувствительности анализа и устранения субъективного фактора.

Гемагглютинация; антиген; антитело; капельный образец; кровь.

* Работа выполнена при поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг.

E.V. Zhoglo, A.A. Aristov, G.S. Evtushenko, A.S. Rafalsky

**INVESTIGATION OF THE POSSIBILITY OF USING OF THE METHOD
OF PHOTOMETRY OF DROPLET SAMPLES FOR EVALUATION
HAEMAGGLUTINATION TEST**

The paper presents the application of the method of photometric study of blood sample as a droplet for evaluation hemagglutination test. We offer the theoretical justification and experimental results of using of the method. Proposed method allows to reduce the amount of reagents, increase the sensitivity of the analysis and eliminate the subjective factor.

Hemagglutination; antigen; antibody; droplet sample; blood.

На сегодняшний день для лабораторной диагностики большинства инфекционных и паразитных болезней, определения групп крови, тканевых и опухолевых антигенов, видовой принадлежности белка, распознавания аллергий и аутоиммунных болезней, беременности, а также гормональных нарушений применяются так называемые иммунологические методы исследований. Они включают серологические исследования, или серологические реакции, к которым относят реакции прямого воздействия антигенов и антител сыворотки крови *in vitro*.

В зависимости от их механизма и учета результатов иммунологические реакции можно подразделить на реакции, основанные на феномене преципитации; реакции с участием комплемента; реакции нейтрализации; реакции с использованием химических и физических методов, а также реакции, основанные на феномене гемагглютинации. Гемагглютинация представляет собой склеивание и выпадение в осадок эритроцитов с адсорбированными на них антигенами или антителами. Данная реакция протекает в два этапа: соединение антигена с антителом и выпадение этого комплекса в осадок. Реакция гемагглютинации применяется в лабораторной диагностике многих серьезных заболеваний таких, как сифилис, вирусный гепатит В, клещевой энцефалит и др. Такому широкому применению данной реакции есть ряд серьезных оснований. Во-первых, это простота и малые затраты времени на постановку. Во-вторых, это высокая специфичность и чувствительность, которая превосходит чувствительность многих других методов исследования антигенов и антител. И, в-третьих, это возможность производить количественные измерения титра специфических антител в сыворотке пациента. Однако наряду с достоинствами метод диагностики на основе реакции гемагглютинации обладает и недостатками, которые связаны, прежде всего, с несовершенством методики постановки реакции. Дело в том, что постановка диагноза осуществляется на основе визуальной оценки результата анализа, а значит, при этом присутствует субъективный фактор. Кроме того, все процессы пробоподготовки и анализа проводятся вручную, а для проведения количественного анализа производятся многократные разведения используемых сывороток, что является причиной трудоемкости анализа. Еще одним существенным недостатком является использование достаточно большого количества реагентов: прежде всего, биологического материала – крови (не менее 5 мл), которую при этом приходится брать из вены, что является неудобным при проведении исследований в педиатрии; и реактивов, которые к тому же рассчитаны на проведение большого числа анализов. Поэтому зачастую применение данного метода диагностики является нерентабельным, особенно в небольших отдаленных больницах с малым числом ежедневно обследуемых пациентов.

Учитывая вышеуказанные факты, необходимо признать целесообразность усовершенствования методики оценки реакции гемагглютинации. При этом данная методика должна быть простой и недорогой, удобной для проведения одиночных исследований и использовать при этом малые объемы реагентов. Кроме того,

целесообразно максимальное сокращение времени проведения данных иммунологических реакций, а также создание автоматизированных систем их инструментального учета.

В связи с этим на кафедре ПМЭ ТПУ для оценки и учета результатов реакции гемагглютинации был предложен и апробирован метод фотометрирования капельных образцов биожидкостей, расположенных на прозрачной гидрофобной подложке рис. 1,а [1]. Исследования проводились на экспериментальной установке, сконструированной таким образом, чтобы обеспечить необходимый температурный режим для оптимальных условий протекания исследуемых процессов и высокий уровень влажности. Полное описание экспериментальной установки содержится в патенте РФ на ПМ [2].

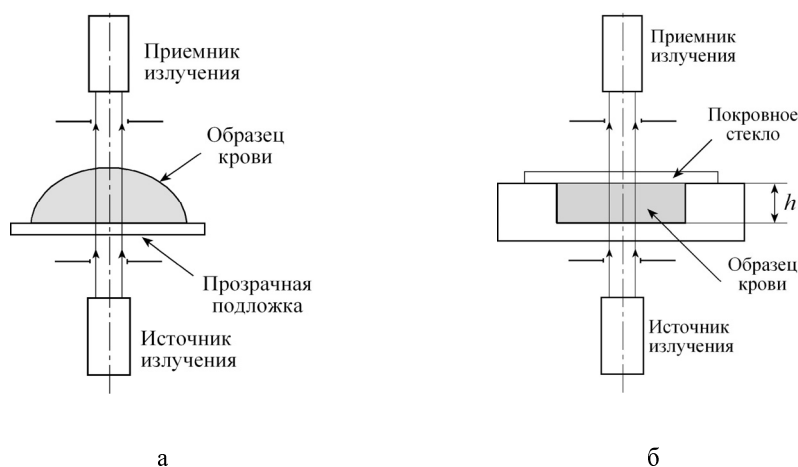


Рис. 1. Схема реализации метода фотометрирования капельной пробы (а) и проведения эксперимента в плоской кювете (б)

Исходя из предложенной схемы исследования, можно предположить наличие зависимости величины тока фотометрического канала от оптических свойств просвечиваемой среды, а они, в свою очередь, определяются физическими и физико-химическими процессами, протекающими в пробе. К упомянутым процессам можно отнести специфическое взаимодействие антигенов и антител при протекании реакции гемагглютинации.

При проведении исследований ставилась реакция гемагглютинации для определения группы крови по системе АВ0. Выбор в пользу указанной реакции был сделан в связи с простотой постановки, а также безопасностью и доступностью реагентов. При постановке реакции использовалась кровь III группы, в которую добавляли стандартную тестовую сыворотку (III группы), содержащую антитела, вызывающие агглютинацию эритроцитов исследуемой крови. Использовались разведения со следующим титром антител: 1:64, 1:128, 1:256 и 1:512. Кровь смешивалась с сывороткой в соотношении 3:1. Для получения образцов с различным гематокритом исходную кровь центрифугировали и эритроцитарная взвесь разбавлялась аутологичной плазмой до нужной величины концентрации клеток (Ht 20, 30, 50).

Как было отмечено ранее, в результате протекания реакции гемагглютинации происходит специфическое взаимодействие антигенов и антител. Это взаимодействие приводит к склеиванию эритроцитов и образованию из них крупных агрегатов. Поскольку величина образующихся агрегатов влияет на скорость их оседания, можно предположить наличие зависимости между величиной СОЭ и про-

цессами взаимодействия антигенов и антител. Причем эти процессы можно достаточно четко отслеживать именно в капельных образцах, поскольку ранее нами было доказано наличие связи между изменением их оптических свойств и величиной СОЭ [1,3]. Экспериментальное исследование СОЭ при протекании реакции гемагглютинации в капиллярах по Панченкову не подтвердило наличие зависимости между скоростью оседания эритроцитов и процессами взаимодействия антигенов антител. Результаты исследований показали, что агрегация эритроцитов, наблюдаемая при гемагглютинации, приводит не к увеличению скорости их оседания, а к образованию из них (ввиду высокого гематокрита) плотной сети клеток, которая довольно медленно оседает в капиллярах.

Нами были проведены исследования по возможности оценки результатов гемагглютинации по следующей методике. Кровь смешивали с сыворотками соответствующих концентраций и после 5 минут выдержки в пробирках формировали капельные образцы и проводили их фотометрирование. Также фотометрирование этих же образцов было проведено в плоской кювете (рис. 1,б).

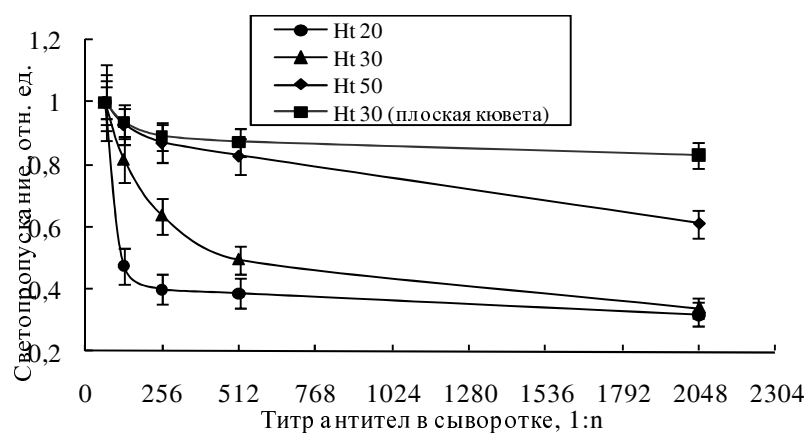


Рис. 2. Характер изменения светопропускания образцов при различных концентрациях сывороток для капельных образцов с Ht 20, 30, 50 и образца в плоской кювете с Ht 30

Как видно из представленных на рис. 2 графиков, при увеличении концентрации антител в сыворотке наблюдается увеличение светопропускания. Действительно, чем выше концентрация антител в сыворотке, тем активнее протекает реакция гемагглютинации и соответственно большее количество эритроцитов примет участие в агрегации. Количество рассеивающих частиц уменьшается, а значит, уменьшается дисперсность среды, что приводит к увеличению светопропускания. Из представленных зависимостей видно, что для исследуемого образца в плоской кювете характерно более малые изменения значений светопропускания, чем для капельного образца с тем же гематокритом. Кроме того, чем ниже гематокрит в исследуемом капельном образце, тем круче проходит кривая в области высоких концентраций антител в сыворотке. Следует отметить, что использование данной методики не слишком целесообразно ввиду существования большого разброса значений при проведении повторных исследований тех же образцов, что связано, вероятно, с разрушением образовавшихся агрегатов в процессе забора пробы из пробирки с помощью автоматического дозатора. Поэтому было решено исследовать возможность использования для этой цели анализа динамики изменения оптических свойств капельных образцов в процессе образования агглютинирующих комплексов. При этом

фотометрирование образцов проводилось сразу после добавления агглютинирующих сывороток. Полученные зависимости для образцов с Ht 20 и 30 представлены на рис. 3.

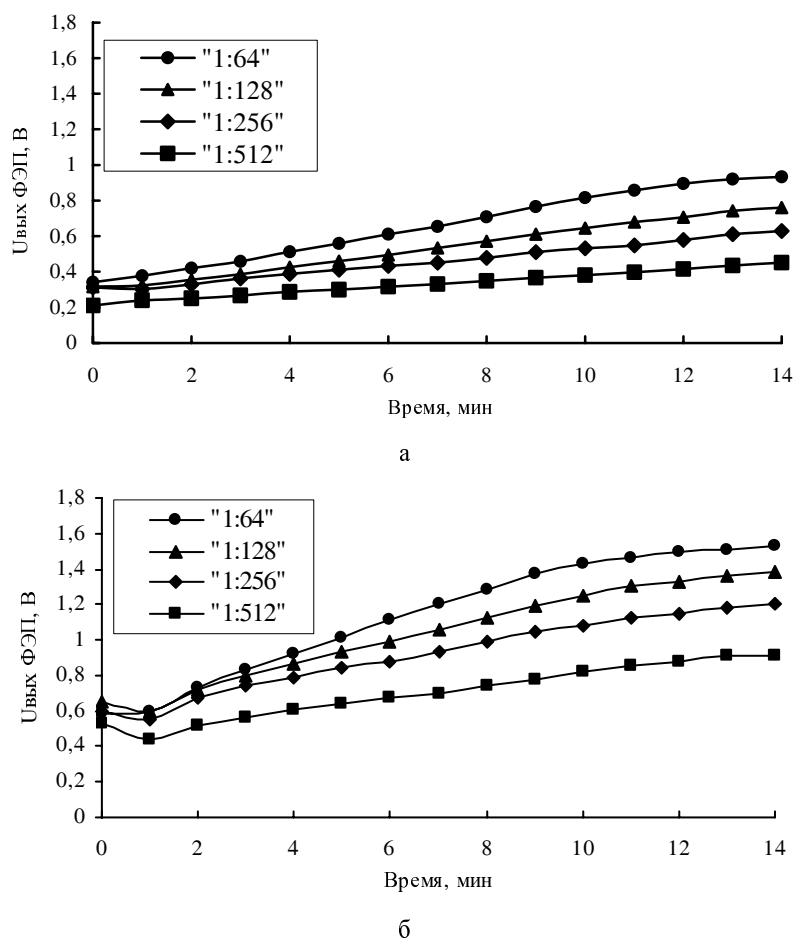


Рис. 3. Динамика изменения выходного напряжения фотоэлектронного преобразователя в зависимости от титра антител в сыворотке для капельных образцов: а – с Ht 30; б – с Ht 20

На графиках по оси ординат отложена величина выходного напряжения фотоэлектронного преобразователя (ФЭП), которое линейно связано с интенсивностью падающего на фотоприемник излучения. Из представленных зависимостей видно, что чем больше концентрация антител в добавляемой сыворотке, тем сильнее изменяются оптические свойства пробы. Эта закономерность сохраняется для образцов с любым гематокритом. Однако характер изменения оптических свойств зависит от гематокрита: для образца с Ht 20 наблюдается более высокая скорость нарастания кривых по сравнению с образцом с Ht 30. Все эти факты необходимо учитывать при разработке оптимальной методики постановки реакции.

В целях подтверждения целесообразности использования в качестве исследуемых проб капельных образцов были проведены сравнительные исследования изменения их оптических свойств и свойств образцов в плоской кювете при протекании реакции гемагглютинации. Результаты исследований представлены на рис. 4.

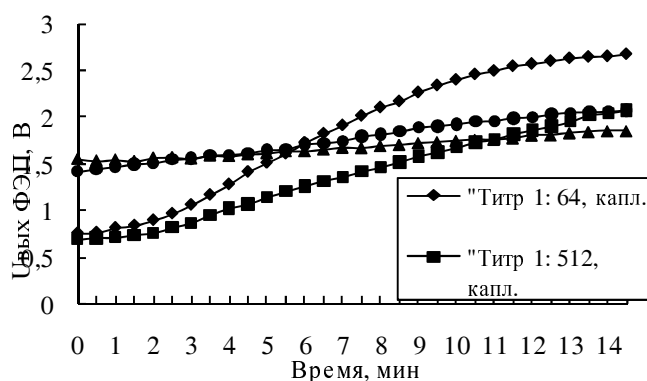


Рис. 4. Экспериментальные кривые, отражающие динамику изменения светопропускания в процессе протекания реакции гемагглютинации в капельной пробе (капл.) и плоской кювете (пл.)

Полученные результаты показывают более высокую чувствительность метода фотометрирования капельных проб к процессам, протекающим в исследуемых образцах, по сравнению с классической фотометрической регистрацией в плоской кювете.

Представленные результаты исследований подтверждают возможность оценки иммунологических реакций, основанных на феномене агглютинации, в капельных образцах крови путем их фотометрирования. Предложенная методика обладает рядом существенных достоинств. Во-первых, это высокая чувствительность, которая позволяет использовать при постановке реакций сыворотки высоких разведений, что приводит к сокращению количества используемых реактивов, а значит и цены анализа. Во-вторых, это использование малого количества биологического материала (10 мкл крови). Кроме того практически полностью устраняется субъективный фактор, а значит увеличивается надежность и достоверность результатов.

Необходимо отметить, что описанный метод требует дальнейших исследований и накопления достаточно большого и более полного клинического материала и для возможности его практического применения.

Работа выполнена при поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аристов А.А., Евтушенко Г.С., Пеккер Я.С. Применение метода фотометрирования капельной пробы крови для оценки процесса оседания эритроцитов // Известия Томского политехнического университета. – 2006. – № 3. – С. 144-150.
2. Патент на ПМ № 47526 РФ. Устройство для оценки физических свойств биологических жидкостей / Аристов А.А.. Оpubл. 2005.
3. Патент на изобретение № 2379687 РФ. Способ определения динамики оседания клеток крови / Аристов А.А.. Оpubл. 2010.

Жогло Екатерина Владимировна

Национальный исследовательский Томский политехнический университет.

E-mail: zhoglo@sibmail.com.

634050, г. Томск, пр. Ленина, 30.

Тел.: 83822419605.

Аристов Александр Александрович

E-mail: aristov@tpu.ru.

Рафальский Андрей Сергеевич
E-mail: rafalskiy_andrey@sibmail.com.

Евтушенко Геннадий Сергеевич
E-mail: ime@tpu.ru.

Zhoglo Ekaterina Vladimirovna
National Research Tomsk Polytechnic University.
E-mail: zhoglo@sibmail.com.
30, Lenina av., Tomsk, 634050, Russia.
Phone: +73822419605.

Aristov Alexander Alexandrovich
E-mail: aristov@tpu.ru.

Rafalsky Andrei Sergeevich
E-mail: rafalskiy_andrey@sibmail.com.

Evtushenko Gennady Sergeevich
E-mail: ime@tpu.ru.

УДК 681.5.01

А.П. Белобров, С.А. Борисовский, Р.А. Томакова

**НЕЙРОСЕТЕВЫЕ МОДЕЛИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОПЕРАТОРОВ
ДЛЯ СЕГМЕНТАЦИИ ИЗОБРАЖЕНИЙ БИОМЕДИЦИНСКИХ
СИГНАЛОВ**

Предлагается способ сегментации полутоновых изображений, основанный на расширении признакового пространства за счет морфологических операторов и последующим его сжатию путем использования многослойной нейронной сети, реализующей операцию двумерной свертки и пороговой обработки.

Медицинское изображение; сегмент; морфологический оператор.

A.P. Belobrov, S.A. Borisovsky, R.A. Tomakova

**NEURAL NETWORK MODELS OF MORPHOLOGICAL OPERATORS
FOR SEGMENTATION OF IMAGES OF BIOMEDICAL SIGNALS**

In work the way of segmentation of the half-tone pictures, based on expansions space of signs at the expense of morphological operators and the subsequent its compression by use of the multilayered neural network realising operation of two-dimensional convolution and threshold processing is offered.

The medical image; a segment; the morphological operator.

В задачах обработки изображений в медицине выделение объектов предшествует этапу количественных оценок их характеристик, таких, как их размеры, форма, взаимное расположение, ориентация и т.д. Таким образом, в области обработки изображений весьма актуальной является задача сегментации, т.е. разделения изображения на области, принадлежащие разным объектам или их частям, с целью последующего выделения искомого объекта или определения характерных параметров выделенной области. Большинство развиваемых алгоритмов сегментации основывается на анализе локальных свойствах самого изображения. Задача сегментации в них ставится обычно как статистическая задача, главной целью которой является группирование между собой пикселей, которые семантически связаны [1].