

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ
(РОСПАТЕНТ)**

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995. Телефон (8-499) 240-60-15. Факс (8-495) 234-30-58

На № - от 28.04.08

Наш № 2007101151/15(001213)

630090, г.Новосибирск, ул. Институтская,
3, В.П. Мальцеву, ИХКиГ.

*При переписке просьба ссылаться на номер заявки
и сообщить дату получения данной корреспонденции*

27 МАЙ 2008

**Р Е Ш Е Н И Е
о выдаче патента на изобретение**

(21) Заявка № 2007101151/15(001213)

(22) Дата подачи заявки 10.01.2007

В результате экспертизы заявки на изобретение по существу установлено, что
 заявленное изобретение
 заявленная группа изобретений
относится к объектам патентных прав и соответствует условиям патентоспособности,
предусмотренным Гражданским кодексом Российской Федерации, в связи с чем
принято решение о выдаче патента на изобретение.

Заключение по результатам экспертизы прилагается.

Приложение: на 3 л. в 1 экз.

Руководитель



Б.П.Симонов

СПОСОБ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗОВ КРОВИ И АНАЛИЗАТОР КРОВИ

Изобретение относится к способам определения состава крови и автоматизированным техническим средствам, определяющим состав крови, и может использоваться в медицине для определения качественного и количественного состава крови.

Одним из важнейших факторов, определяющих физическое состояние человека и животных, является состав крови, соотношение входящих в нее форменных элементов, к которым относятся: незрелые красные кровяные клетки – ретикулоциты, эритробласты, зрелые красные кровяные клетки - эритроциты, белые кровяные клетки - лейкоциты, тромбоциты, Т- и Б - лимфоциты, гранулоциты, и др., их морфологические характеристики: форма, размер, коэффициент преломления, структура, а также их абсолютное количество и другие показатели. Например, повышение количества только одного вида клеток - ретикулоцитов сопутствует гемолитической и сидеробластной анемии, талассемии, и другим острым и хроническим заболеваниям. В целом, клиническая потребность в гематологическом контроле существует при диагностике и/или лечении большинства заболеваний.

Известные способы проведения анализов крови можно условно разделить на ручные и автоматизированные.

Ручные способы основаны на изучении под микроскопом мазков крови, приготовленных по специальным технологиям, или полученных с помощью микроскопа слайдов с изображением названных мазков. Например, известен способ, позволяющий на одном мазке одновременно визуализировать эритроциты, ретикулоциты, базофилы, эозинофилы, псевдоэозинофилы, лимфоциты, моноциты и тромбоциты, для чего пробу нестабилизированной крови суправитально окрашивают красителем бриллиантовым крезиловым синим, после сушки производят фиксацию в растворе-фиксаторе по Лейшману, а затем докрасивают разбавленным буферным раствором с рН 6,8-7,2, состоящим из натрия фосфорнокислого двузамещенного и калия фосфорнокислого однозамещенного красителя-фиксатора по Лейшману [Патент РФ №222423]. Данный способ, как и прочие ручные способы определения форменных элементов крови, является высокочувствительным по времени и недостаточно точным.

Автоматизированные способы проведения анализов крови предполагают использование специализированного оборудования, повышающего скорость и информативность анализа. Данное оборудование, как правило, способно идентифицировать некоторые форменные элементы крови и определять их

концентрацию. Также в некоторых способах осуществляется характеристика клеток по одному или нескольким присущим параметрам, систематизируются и обобщаются полученные данные.

Например, известен автоматизированный способ определения диаметра эритроцитов, и других параметров крови, по которому образец крови размещают в зазоре между горизонтально установленными пластинками, нижняя из которых является приемником-преобразователем ультразвуковых колебаний, и воздействуют на названный образец ультразвуком, измеряя резонансный пик частоты, по минимальному сдвигу которого и определяют диаметр эритроцитов и полосу уширения резонансной кривой, по которой определяют динамический модуль упругости крови [Патент РФ № 2206091].

Известен способ выявления ретикулоцитов, включающий добавление образца клеток крови к системе реагентов, позволяющих растворить зрелые клетки крови, затем анализ названного образца в потоке клеток путем измерения одного или двух низших сигналов от угла рассеяния света, определенного меньше чем в 10 градусов относительно направления исходного излучения, для дифференцирования ретикулоцитов от других видов клеток [Патент США № 5 874 311]. Этот способ пригоден только для выявления одного вида форменных элементов крови - ретикулоцитов и не позволяет выполнять комплексные анализы крови.

Известен способ выявления пяти субпопуляций лейкоцитов [Патент США № 5 389 549] по которому к трем отдельным образцам крови добавляют три разных растворяющих реагента – свой к каждому образцу и проводят измерения для идентификации эозинофилов, нейтрофилов, и базофилов кроме субпопуляций лимфоцитов и моноцитов в автоматическом режиме. Этот способ позволяет получить только полную картину по содержанию в крови лейкоцитов и не предусматривает проведения комплексных анализов крови.

Большее количество видов клеток крови может быть определено известным автоматизированным способом проведения анализов крови, позволяющим одновременно определить в пробе крови наличие красных, белых клеток крови и тромбоцитов [Патент США № 5 891 734]. В соответствии с этим способом пробу крови разделяют, по меньшей мере, на три части и помещают в отдельные сосуды. Первую часть пробы крови смешивают с разбавляющим, вторую часть – с растворяющим, а третью часть – с флуоресцентным реагентами. Далее первую разбавленную часть пробы крови пропускают через кювету - анализатор электрического сопротивления, посредством которой выявляют и подсчитывают красные клетки и тромбоциты.

Вторую часть пробы крови пропускают через оптический проточный преобразователь и определяют мультиугловое рассеяние света клетками крови, по которому подсчитывают и дифференцируют белые кровяные клетки. Затем определяют мультиугловое рассеяние света и флюоресценцию от второй растворенной части пробы крови или от первой разбавленной части пробы крови и подсчитывают и дифференцируют красные клетки крови, содержащие ядро, или ретикулоциты, или те и другие, посредством названного оптического проточного преобразователя. Далее через названный оптический проточный преобразователь пропускают третью часть пробы крови, определяют мультиугловое рассеяние света и флюоресценцию, и по этим показателям подсчитывают и дифференцируют тромбоциты, или их сгустки. Затем полученные от описанных тестов данные объединяют, обрабатывают и по ним составляют отчет о составе крови в автоматическом режиме.

Этот способ является ближайшим аналогом предлагаемого и принят за прототип изобретения. К недостаткам прототипа следует отнести его многостадийность (анализ включает четыре последовательные стадии) и, как следствие, длительность и сложность, большие трудозатраты, а также необходимость использования дорогостоящих реагентов, таких, например, как моноклональные антитела CD4, CD19, CD14, CD3 и др., меченные флуоресцентными веществами. В прототипе изобретения, как и в других известных способах точность определения параметров ограничена по следующим причинам. Используемые процедуры модификации, такие как иммунофлуоресцентное мечение, хотя и являются традиционными в современной цитометрии, приводят неоднозначным изменениям в форменных элементах образца крови. Эти модификации приводят в большинстве случаев к возникновению статистической и систематической ошибки в измеряемых параметрах и делают невозможным увеличение информативности измерения, кроме как по пути иммунофенотипирования с ограниченной точностью. В результате, в прототипе, как и в других существующих методах автоматизированного анализа, помимо фенотипирования, популяция форменных элементов характеризуется не более чем по трем физическим параметрам: распределение по объемам эритроцитов, тромбоцитов и концентрации гемоглобина в эритроците. Повышение точности измерения даже данных параметров, имело бы большое клиническое [McLaren C.E., Brittenham G.M. and Hasselblad V. Analysis of the volume of red blood cells: application of the expectation-maximization algorithm to grouped data from the doubly-truncated lognormal distribution. // Biometrics. - 1986. - V.42 - P.143-158.] и фундаментальное научно – исследовательское значение [Lew V.L., Raftos J.E., Sorette M., Bookchin R.M. and Mohandas N. Generation of

normal human red cell volume, hemoglobin content, and membrane area distributions by "birth" or regulation? // Blood. - 1995. - V.86 - P.334-341].

Предлагаемое изобретение решает задачу создания такого способа проведения анализов крови, который позволил бы получать комплексные данные о качественном и количественном составе крови без применения дорогостоящих флуоресцентных реагентов, при этом с минимальными модификациями измеряемых форменных элементов (клеток) крови и высокой точностью, позволяющем, кроме того, проводить полный экспресс - анализ крови не более чем в две стадии.

Поставленная задача решается тем, что предлагается способ проведения анализов крови, по которому пробу смешивают с разбавляющим и/или растворяющим реагентом, затем формируют поток пробы крови, определяя при этом мультиугловое рассеяние света клетками в потоке крови, выявляют и подсчитывают клетки крови по мультиугловому рассеянию света, причем на поток пробы крови воздействуют когерентным поляризованным излучением в видимом диапазоне длин волн, направляя его вдоль оси потока.

Для выполнения полного анализа крови необходимо пробу крови разделить на две части, первую из которых смешать с разбавляющим, а вторую – с растворяющим реагентом.

Оптимально смешивать пробу крови с разбавляющим реагентом и растворяющим реагентом до концентрации клеток крови в ней $10^5 - 10^6$ кл/мл.

Скорость потока пробы крови целесообразно поддерживать на уровне 1-10 м/с.

В качестве разбавляющего реагента может использоваться, например, буферный изотоничный раствор хлорида натрия.

В качестве растворяющего реагента может использоваться, например, раствор хлорида аммония.

Наиболее эффективно использовать когерентное поляризованное излучение с длиной волны, лежащей в диапазоне 330-680 нм.

Как правило, когерентным поляризованным излучением является лазерное излучение.

Для большей точности результатов анализов поляризационное состояние когерентного излучения целесообразно изменять при определении рассеяния света под различными углами.

Для обеспечения высокой точности анализов по рассеянию света клетками крови под различными углами в каждом из потоков пробы крови определяют от одной

до девяти угловых зависимостей интенсивности светорассеяния клеток крови от угла наблюдения.

Предлагаемый способ проведения анализов крови основан на измерении рассеянного света одиночными клетками крови под разными углами. При этом главными анализируемыми данными являются измеряемые интенсивности светорассеяния от одиночной частицы, называемые здесь «индикатрисы светорассеяния».

Взаимодействие когерентного поляризованного излучения с клеткой крови в оптической системе можно наглядно описать с помощью формализма матриц Мюллера. Состояние поляризации падающего и рассеянного излучения рассчитывается путем перемножения матриц, при этом каждый элемент оптической системы представляется в виде матрицы. Интенсивность и состояние поляризации излучения описывается вектором Стокса [Collett E. Polarized Light: Fundamentals and Applications. - New York: Marcel Dekker, 1993. – 581 с.]. Например, излучение, линейно - поляризованное под углом φ относительно лабораторной системы координат, описывается вектором Стокса:

$$\mathbf{V} = \begin{pmatrix} 1 \\ \cos 2\varphi \\ \sin 2\varphi \\ 0 \end{pmatrix} \quad (1)$$

При повороте базисных векторов лабораторной системы на угол φ вектор Стокса преобразуется как:

$$\mathbf{V}' = \mathbf{R}_\varphi \times \mathbf{V}, \text{ где} \quad (2)$$

$$\mathbf{R}_\varphi = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos 2\varphi & \sin 2\varphi & 0 \\ 0 & -\sin 2\varphi & \cos 2\varphi & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (3)$$

Матрица Мюллера частицы произвольной формы имеет вид [Борен К. и Хафмен Д. Поглощение и рассеяние света малыми частицами: пер. с англ. - М.: Мир, 1986. - 664 с.]:

$$\mathbf{S}(\theta, \varphi) = \frac{1}{k^2 r^2} \begin{bmatrix} S_{11} & S_{12} & S_{13} & S_{14} \\ S_{21} & S_{22} & S_{23} & S_{24} \\ S_{31} & S_{32} & S_{33} & S_{34} \\ S_{41} & S_{42} & S_{43} & S_{44} \end{bmatrix} \quad (4)$$

Элементы S_{ij} зависят от полярного и азимутального углов рассеяния: $S_{ij} = S_{ij}(\theta, \varphi)$, причем θ изменяется от 0° до 180° , а φ изменяется от 0° до 360° , k – волновое число, r – расстояние до точки наблюдения. Далее множитель $\frac{1}{k^2 r^2}$ опущен. Матрица Мюллера для идеального линейного поляризатора, повернутого осью пропускания под углом ξ к лабораторной системе координат описывается так:

$$\mathbf{P}_\xi = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & \cos 2\xi & \sin 2\xi & 0 \\ \cos 2\xi & \cos^2 2\xi & \sin 2\xi \cos 2\xi & 0 \\ \sin 2\xi & \sin 2\xi \cos 2\xi & \sin^2 2\xi & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (5)$$

Фазозадерживающий элемент, который сдвигает горизонтальную компоненту поля на $\delta_x = \Theta/2$, а вертикальную – на $\delta_y = -\Theta/2$ описывается так:

$$\mathbf{C}_\Theta = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \cos \Theta & -\sin \Theta \\ 0 & 0 & \sin \Theta & \cos \Theta \end{pmatrix} \quad (6)$$

Фотодетектор, регистрирующий интенсивность, описывается вектором: $(1 \ 0 \ 0 \ 0)$. Все вышеописанные матрицы даны в лабораторной системе координат, тогда как матрица Мюллера дана в системе координат, относящейся к клетке крови, поэтому для расчетов необходимо сначала перейти в систему координат клетки крови, повернув ее на угол φ , и после преобразования падающего света клеткой крови перейти обратно в лабораторную систему, повернув ее на угол $-\varphi$. Таким образом, для произвольных положений или состояний оптических элементов в средстве фотодетекции рассеянного света и состояния падающего излучения, определяемого вектором \mathbf{V} , измеряемый сигнал имеет вид:

$$I_{\xi, \Theta}(\theta) = \int_0^{2\pi} (1 \ 0 \ 0 \ 0) \times \mathbf{P}_\xi \times \mathbf{C}_\Theta \times \mathbf{R}_{-\varphi} \times \mathbf{S}(\theta, \varphi) \times \mathbf{R}_\varphi \times \mathbf{V} \, d\varphi \quad (7)$$

В Матрице Мюллера из 16 элементов имеется всего 7 независимых, которые полностью характеризуют электромагнитное поле, рассеянное клеткой крови. Любые измеряемые интенсивности (индикатрисы светорассеяния), являются комбинациями матрицы Мюллера анализируемой клетки. Для восстановления элементов матрицы Мюллера клетки крови достаточно измерить 7 независимых комбинаций этих элементов. В предлагаемом изобретении измерение 9 комбинаций матрицы Мюллера может достигаться, например, путем попеременного изменения состояния поляризации падающего излучения в виде трех состояний и попеременного изменения состояний фазозадерживающего оптического элемента, расположенного перед фотодетектором, в виде трех состояний, или деления рассеянного света по трем каналам, имеющим различные состояния поляризационных элементов.

Наряду с точечным фотодетектором, описанным выше, измерение электромагнитного поля рассеяния возможно выполнить с использованием двумерной фоточувствительной матрицы. Фоточувствительная матрица располагается ортогонально оптической оси системы. В данной конфигурации измеряется двумерная функция интенсивности $S(x, y)$, где x и y – координаты фоточувствительного элемента матрицы. Искомая индикатриса светорассеяния $S_{ij}(\theta, \varphi)$ восстанавливается из решения интегрального уравнения

$$S_{i,j}(x, y) = \int_{L_1}^{L_2} \int_{\varphi} \int_{\theta} S_{i,j}(\theta, \varphi) \delta(\theta - g(x, y, t)) \delta(\varphi - f(x, y, t)) d\varphi d\theta dt, \quad (8)$$

где t – положение анализируемой клетки внутри зоны детекции, простирающейся от L_1 до L_2 . Функции $g(x, y, t)$ и $f(x, y, t)$ определяют углы θ и φ при которых свет, вышедший из точки t , попадет в точку с координатами (x, y) .

Основными получаемыми данными в данном способе измерения являются сигналы индикатрис светорассеяния. Класс математических задач, возникающих при анализе данных можно условно разбить на два вида: первый вид - задачи классификации клеток крови и второй вид – задачи характеризации клеток крови.

К задачам первого вида, а именно, классификации клеток крови относятся задачи разбиения измеряемых сигналов на классы и определения принадлежности каждого измеряемого сигнала к какому либо классу. При этом установления взаимосвязи между сигналом светорассеяния и физико-морфологическими характеристиками клетки крови не требуется. Обучение выполняется по сигналам, принадлежащим к известным классам клеток крови (например, клеточная линия), либо

разбиение на классы происходит эмпирически в пространстве параметров измеряемого сигнала.

Для выявления и подсчета клеток крови необходимо использовать кластеризацию, либо классификацию массива измеренных клеток. По измеренным индикатрисам светорассеяния клеток крови определяют набор параметров индикатрис светорассеяния, например, интегралы индикатрис в заданных угловых интервалах, положения и амплитуды максимумов в Фурье спектре индикатрис, так же параметры могут быть взяты непосредственно из решения обратной задачи светорассеяния по измеренным индикатрисам всего N параметров. Каждая клетка имеет вполне определенный набор параметров $\bar{\mathbf{P}}_q^j = (P_1, P_2, \dots, P_N)_q^j$, где N – число параметров индикатрисы, q – индекс принадлежности клетки кластеру или подклассу, j – номер клетки в кластере или подклассе. Кластеризация возможна в случае, когда между типами клеток есть явные и существенные различия, например, как в случае разделения лейкоцитов на три основных типа: лимфоциты, моноциты и гранулоциты. Границы отдельных кластеров производится там, где плотности точек $\bar{\mathbf{P}}^j$ в N -мерном пространстве минимальны. При кластеризации нет алгоритма обучения, т.е. нет необходимости использовать независимые от светорассеяния методы выявления типов клеток, например, окрашивания иммунофлуоресцентными маркерами для создания обучающей выборки, или, другими словами, выделения существенных признаков. В случае, когда, различия между клетками крови слабо выражены, необходимо применять классификацию. Первый шаг в классификации – это создание обучающей выборки. Обучающую выборку создают путем одновременного измерения флуоресценции от исследуемых клеток, окрашенных иммунофлуоресцентными маркерами, или специфичными флуорохромами, и индикатрис светорассеяния. Тип каждой клетки, с одной стороны, однозначно определен с помощью флуоресценции, а, с другой стороны, имеет вполне определенный набор параметров индикатрис $\bar{\mathbf{P}}_q$. Далее, измеряя индикатрисы светорассеяния и определяя вектор параметров $\bar{\mathbf{P}}$ для произвольной клетки, можно судить к какому подклассу относится тестируемая клетка, уже не применяя окрашивания иммунофлуоресцентными маркерами или специфичными флуорохромами.

Классификация может производиться разными методами, например, методом Байеса, методом k ближайших соседей, и т.д. В каждом отдельно взятом случае выделение существенных признаков основывается на различных предположениях о свойстве системы и может сильно отличаться. В методе Байеса, исходя из

предположения о нормальности распределения клеток по параметрам \bar{P} , строят разделяющие поверхности второго порядка в N -мерном пространстве, каждая поверхность разделяет два граничащих подкласса.

Наиболее общий метод классификации – это метод k ближайших соседей. Этот метод основывается на предположении о локальной компактности, из которой следует, что похужесть двух объектов по l признакам обычно сопровождается их похужестью и по $(l + 1)$ -му признаку. Отсюда следует, что рядом в малой ε -окрестности от имеющихся реализаций i -го образа обучающей выборки могут появляться только реализации того же i -го образа. Причем чем ближе контрольная реализация j находится к имеющейся реализации образа q , тем с большей вероятностью отнесение точки j к q -му образу будет правильным. Исходя из этого можно предложить в качестве решающего правила следующую процедуру: оставить в памяти ЭВМ все реализации обучающей выборки и контрольную точку j относить к тому образу, чья реализация оказалась ближе всего к точке j . Это правило действительно используется в практике решения некоторых задач, и оно носит название «правило ближайшего соседа». Однако следует учитывать, что реальные измерения признаков нередко сопровождаются помехами и ошибками, так что свидетельству одного прецедента доверять опасно. Целесообразно учитывать свидетельства и других объектов обучающей выборки. С этой целью обращают внимание не на одну, а на несколько ближайших точек. Такие правила называются *правилами k ближайших соседей*. Если больше половины из k соседей принадлежит образу q , то и точка j относится к q -му образу.

К задачам второго вида, а именно, задачам характеристики клеток крови относится определение различных параметров клеток крови. Для их решения в общем случае необходимо решать обратную задачу светорассеяния. Для корректного построения последней с контролируемой точностью необходимо проведение расчета прямой задачи светорассеяния. Решение прямой задачи светорассеяния возможно, например, путем построения оптических моделей клеток крови, в которых клетки моделируются некоторой формой с конечным набором параметров, основанных на данных микроскопических измерений клеток крови. В этом случае возможно теоретически рассчитать светорассеяние от оптических моделей клеток для набора параметров оптической модели клетки крови. Методы расчета могут быть различными, например: метод многослойных концентрических сфер, метод Т-матриц, приближения дискретных диполей, (DDA - discrete dipole approximation – англ.) и др.

Далее методы решения обратной задачи могут быть различными, например: метод прямого сравнения по минимуму среднеквадратичного отклонения, различные

нейросети и т.д. Метод прямого сравнения и поиска наиболее соответствующей индикатрисы является простейшим и универсальным методом решения обратной задачи и представляет собой частный случай известного метода узлового пространства. В нем сравниваются теоретически рассчитанные индикатрисы светорассеяния с измеренными в процессе анализа и перебором находятся модельная клетка, индикатриса которой дает минимальное значение среднеквадратичного отклонения при сравнении с экспериментально измеренной индикатрисой. В данном случае характеристики анализируемой клетки крови принимаются равными характеристикам найденной модели.

Способ осуществляют следующим образом. Пробу крови, подлежащую исследованию, разделяют на две, например, равные части и помещают в отдельные емкости. В первую емкость добавляют разжижающий реагент, например, изотоничный раствор хлорида натрия, до концентрации клеток в полученной смеси $10^5 - 10^6$ кл/мл. Во вторую емкость добавляют растворяющий реагент – это реагент, растворяющий оболочку эритроцитов, который также называют лизирующий реагент [Tiirikainen M.I. Evaluation of red blood cell lysing solutions for the detection of intracellular antigens by flow cytometry. // Cytometry. - 1995. - V.20 - P.341-348.]), например раствор хлорида аммония, также до концентрации клеток крови в полученной смеси $10^5 - 10^6$ кл/мл. После лизирования эритроцитов может быть добавлен реагент, воздействующий на лейкоциты с сохранением указанной концентрации.

Из первой части пробы крови формируют ее поток со скоростью 1-10 м/с и одновременно облучают этот поток когерентным излучением с длиной волны 330-680 нм и последовательным изменением его поляризационного состояния. Определяют рассеянный под разными углами свет и его поляризационное состояние для каждой клетки крови, находящейся в потоке пробы крови. По индикатрисам светорассеяния, применяя методы классификации, например, метод k ближайших соседей, и методы кластеризации, например, метод k средних, определяют и подсчитывают количество эритроцитов, ретикулоцитов, тромбоцитов и их сгустков, а также, решая обратную задачу светорассеяния, например, методом узлового пространства решают задачу характеристики, определяя параметры этих клеток крови: объем, концентрацию гемоглобина, индекс сферичности, диаметр, площадь мембраны для эритроцитов; объем, диаметр, коэффициент преломления, отношение полуосей для тромбоцитов и ретикулоцитов. По временным изменениям индикатрис светорассеяния, решая обратную задачу светорассеяния, например, методом узлового пространства,

определяют также временные изменения параметров эритроцитов, ретикулоцитов, тромбоцитов или время агглютинации тромбоцитов, а также определяют кинетические характеристики происходящих с этими клетками крови процессов.

После этого из второй части пробы крови формируют ее поток со скоростью 1-10 м/с и одновременно облучают этот поток когерентным излучением с длиной волны 330-680 нм и последовательным изменением его поляризационного состояния одновременно определяя рассеянный под разными углами свет и его поляризационное состояние для каждой клетки крови, находящейся в потоке пробы крови. По индикатрисам светорассеяния, применяя методы классификации, например, метод k ближайших соседей, и методы кластеризации, например, метод k средних, определяют и подсчитывают абсолютное и относительное количество белых клеток крови, а так же решая обратную задачу светорассеяния, например, методом узлового пространства определяют параметры этих клеток крови: размер, размер ядра, коэффициенты преломления цитоплазмы и ядра.

Дополнительные биофизические параметры клеток крови определяют при измерении индикатрис светорассеяния в результате отклика на изменение состава раствора с пробой *in vitro*, или в динамике – в ходе реакции какого-либо реагента с клетками, например, в составе окружающего раствора. По причине относительно сложной постановки эксперимента и необходимости в разработке математических моделей для его интерпретации, направление гематологического анализа с проведением кинетических остается практически неразработанным. Известно только применение эффекта активации и агглютинации тромбоцитов, а также использование в клинике автоматизированных устройств [Danon D. E. The fragiligraph and its applications. // Br. J. Haematol. – 1967. – V.13 – P.61-66 и Терсков И.А., Гительзон И.И. Метод химических (кислотных) эритрограмм. // Биофизика. – 1957. – Т.2, N2. – С.259-266.].

Выше описано проведение полного анализа крови. В том случае, если полный анализ не требуется, пробу крови можно смешать, например, только с разжижающим реагентом и определить соответствующие показатели, представляющие интерес. Точно также можно смешать пробу крови только с растворяющим реагентом и получить данные только о соответствующих показателях.

Для реализации этого способа предлагается устройство для проведения анализов крови в автоматическом режиме. В качестве прототипа предлагаемого устройства выбрано устройство для измерения концентрации клеток крови и гемоглобина, которое содержит проточную камеру для пробы крови, перпендикулярно оси которой расположены оптические оси первого оптического и второго оптического каналов,

источник когерентного излучения, модулятор интенсивности светового потока источника когерентного излучения, первый и второй фотоприемники, блок управления и индексации [Патент РФ № 2196989]. Недостатком этого устройства является невозможность с его помощью проведения комплексного анализа крови.

Изобретение решает задачу создания анализатора крови, позволяющего проводить комплексные анализы крови в автоматическом режиме.

Поставленная задача решается тем, что предлагается анализатор крови, включающий проточную камеру, средство, формирующее поток пробы крови в названной проточной камере, источник когерентного излучения, средство фотодетекции, а также средство управления и обработки данных, связанное с названным средством фотодетекции, у которого проточная камера выполнена в форме сканирующей кюветы, содержащей корпус из оптически прозрачного материала с внутренним прямолинейным каналом и сферическое зеркало, ось которого совпадает с осью названного внутреннего канала, а источник когерентного излучения выполнен в форме источника когерентного поляризованного излучения в видимом диапазоне длин волн и установлен таким образом, что его излучение направлено вдоль оси названного внутреннего канала сканирующей кюветы, а внутренняя поверхность сферического зеркала сканирующей кюветы оптически связана с названным средством фотодетекции.

Внутренняя поверхность сферического зеркала сканирующей кюветы может быть оптически связана со средством фотодетекции посредством зеркала, установленного под углом к оси сканирующей кюветы.

Средство, формирующее поток пробы крови может быть выполнено в форме гидрофокусирующей головки.

Источник когерентного поляризованного излучения может иметь длину волны в диапазоне 330-680 нм.

В качестве блока управления и обработки данных может служить ЭВМ.

Сканирующая кювета может быть снабжена дифракционным оптическим элементом, а средство фотодетекции выполнено с возможностью детекции флуоресценции.

Источник когерентного поляризованного излучения может быть снабжен $\lambda/4$ фазозадерживающим элементом.

Источник когерентного поляризованного излучения может быть снабжен управляемым фазозадерживающим элементом, выполненным в форме электрооптического кристалла.

Источник когерентного поляризованного излучения может содержать один лазер и один поляризатор.

Источник когерентного поляризованного излучения может содержать два лазера и снабжен при этом светоделительным элементом, двумя поляризаторами и $\lambda/4$ фазозадерживающим элементом.

Источник когерентного поляризованного излучения может содержать три лазера снабжен при этом двумя светоделительными элементами, тремя поляризаторами и двумя $\lambda/4$ фазозадерживающими элементами.

Средство фотодетекции может содержать управляемый фазозадерживающий элемент, выполненный в форме электрооптического кристалла, поляризатор и фотодетектор.

Средство фотодетекции может содержать светоделительный элемент, два поляризатора, $\lambda/4$ фазозадерживающий элемент и два фотодетектора.

Средство фотодетекции может содержать два светоделительных элемента, три поляризатора, два $\lambda/4$ фазозадерживающих элемента и три фотодетектора.

Средство фотодетекции может представлять собой двумерную фоточувствительную матрицу.

Средство фотодетекции может быть связано со средством управления и обработки данных через аналого–цифровой преобразователь.

На Рис. 1 изображено предлагаемое устройство в его базовом варианте.

На Рис. 2 изображен принцип действия сканирующей кюветы при измерении рассеяния света клеткой крови под различными углами.

На Рис. 3 изображены варианты выполнения источника когерентного поляризованного излучения.

На Рис. 4 изображены варианты выполнения средства фотодетекции.

На Рис. 5 изображен принцип действия сканирующей кюветы с дифракционным оптическим элементом (ДОЭ) при измерении спектра флуоресценции.

На Рис. 6 изображен вариант исполнения сканирующей кюветы для измерения рассеянного света в диапазоне полярных углов от 5° до 175° .

На Рис. 7 изображены примеры индикатрис светорассеяния для основных типов клеток крови – лимфоцитов, тромбоцитов, моноцитов, эритроцитов, гранулоцитов.

На Рис. 8 изображены примеры сравнения измеренных и рассчитанных индикатрис светорассеяния для тромбоцитов.

На Рис. 9 изображены примеры сравнения измеренных и рассчитанных индикатрис светорассеяния для эритроцитов.

На Рис. 10 изображен пример дифференциации основных типов лейкоцитов по интегралам индикатрисы светорассеяния I_7 .

На Рис. 11 изображена экспериментально измеренная кинетика сферизации и гемолиза, а также показан результат обработки моделью.

На приведенных рисунках использована следующая нумерация позиций: 1 – источник когерентного поляризованного излучения, 2 – линза, 3 – зеркало с отверстием, либо светоделительный элемент, 4 – оптическое окно, 5 – сфокусированный луч когерентного поляризованного излучения, 6 – сфокусированный триггерный луч, 7 – сканирующая кювета, 8 – обжимающая жидкость гидрофокусирующей головки, 9 – поток пробы крови, 10 – гидрофокусирующая головка, 11 – средство фотодетекции, 12 – аналого – цифровой преобразователь, 13 – средство управления и обработки данных, 14 – сферическое зеркало, 15, 16, 60, 61 – точка положения клетки крови, 17, 18 – рассеянное клеткой крови излучение, 19, 59 – зона измерения, 20, 25, 26, 27 – источник когерентного излучения (лазер), 22, 39 – управляемый фазозадерживающий элемент, 23, 42 – средство управления фазозадерживающим элементом, 24 – управляющий вход, 21, 28, 30, 31, 40, 52, 53, 54 – поляризатор, 29, 50, 51 – $\lambda/4$ фазозадерживающий элемент, 32, 33 – светоделительный элемент, 34 – средство управления питанием источника когерентного излучения, 35, 43 – управляющий вход, 36 – средство приема флуоресценции, 37 – средство приема рассеянного света, 38, 45, 47 – диафрагма, 44 – дихроичное зеркало, 41, 46, 48, 49 – светоделительный элемент, 55, 56, 57 – фотодетектор, 58 – дифракционный оптический элемент (ДОЭ), 62, 63 – флуоресценция клетки крови

Анализатор крови работает следующим образом.

Гидрофокусирующая головка анализатора 10 (Рис.1) формирует поток клеток крови движущихся одна за одной с определенной скоростью по центру канала сканирующей кюветы 7. Точность доставки клеток в центр сканирующей кюветы обеспечивается разницей расходов обжимающей жидкости 8 и пробы крови 9. Скорость движения частиц регулируется расходом обжимающей жидкости 8. Для освещения клеток крови используется поляризованное излучение со строго определенным состоянием поляризации, создаваемое источником когерентного поляризованного излучения 1. Освещение производится соосно потоку пробы крови. Освещение может производиться как по направлению движения потока пробы крови, так и навстречу ему. Линзой 2 когерентное поляризованное излучение фокусируется

внутри канала сканирующей проточной кюветы 7, при этом в месте измерения светорассеяния и флуоресценции создается зона постоянной освещенности. Рассеянный клеткой свет отражается от сферического зеркала, расположенного на торце сканирующей проточной кюветы 7, выходит через оптическое окно 4, отражается от зеркала с отверстием, либо светоделительного элемента 3 и попадает на средство фотодетекции 11. Многоканальный АЦП 12 преобразует полученные фотоприемниками сигналы, которые поступают в средство управления и обработки данных 13, являющееся по сути ЭВМ. ЭВМ обрабатывает полученные данные, по которым выполняет отчет о составе крови.

Принцип работы сканирующей кюветы показан на Рис. 2. Сфокусированный луч когерентного поляризованного излучения в видимом диапазоне длин волн 5 и рассеянные клеткой крови лучи 17, 18 показаны пунктирной линией. Для каждого положения клетки в зоне измерения 19 рассеянный свет, отразившись от сферического зеркала, попадает в средство фотодетекции 11 только под определенным углом θ . Когда частица проходит через точку 15, принимается только свет, рассеянный под углом θ_1 . При движении клетки от точки 15 до точки 16 угол приема света непрерывно изменяется от θ_1 до θ_2 . Измеряемый сигнал является функцией времени и напрямую связан с угловой зависимостью интенсивности рассеянного света. Сфокусированный триггерный луч 6, направленный перпендикулярно потоку клеток, служит для создания опорного сигнала, необходимого для трансформации измеряемого времени пролета клетки в положение клетки в кювете.

Источник когерентного поляризованного излучения 1 служит для формирования контролируемого состояния поляризации входного излучения. В анализаторе реализуется три необходимых состояния поляризации: две независимых плоских поляризации и круговая поляризация. В устройстве возможны несколько вариантов исполнения источника поляризованного когерентного излучения, два из которых представлены на Рис. 3. Источник поляризованного когерентного излучения 1 состоит из:

- вариант «а» - источника когерентного излучения 20, поляризатора 21, управляемого фазозадерживающего элемента 22, средства управления фазозадерживающим элементом 23, управляющего входа 24;

- вариант «б» - из источников когерентного излучения 25, 26, 27, поляризаторов 28, 30, 31, $\lambda/4$ фазозадерживающего элемента 29, светоделительных элементов 32, 33, средства управления питанием источников излучения 34, управляющего входа 35.

Принцип работы формирования поляризованного когерентного излучения в варианте «а» заключается в следующем: лазер 20 создает когерентное излучение; поляризатор 21 преобразует поляризационное состояние лазерного излучения до эллиптичности не более чем 10^{-3} ; управляемый фазозадерживающий элемент 22 создает три последовательных значения задержки фазы между двумя состояниями поляризации – 0, $\pi/2$, π , формируя тем самым три независимых состояния поляризации излучения. Управляемый фазозадерживающий элемент может быть выполнен, например, из электрооптического кристалла, оптические свойства которого зависят от величины электрического поля. Средство управления фазозадерживающим элементом 23 служит для создания электрического поля и управления его величиной.

Принцип работы формирования поляризационного излучения в варианте «б» заключается в следующем: источники когерентного излучения, например лазеры 25, 26, 27 создают когерентное излучение, поляризаторы 28, 30, 31 преобразуют каждое поляризационное состояние лазерных излучений до эллиптичности не более чем 10^{-3} , причем каждый лазер и каждый поляризатор установлены так, чтобы на выходе из источника поляризованного когерентного излучения обеспечивать три независимых состояния поляризации, $\lambda/4$ фазозадерживающий элемент формирует круговое состояние поляризации излучения, средство управления питанием источников излучения 34 поочередно включает один из источников когерентного излучения, формируя тем самым три независимых состояния поляризации излучения.

Средство фотодетекции 11 служит для приема рассеянного света, флуоресценции и анализа поляризационного состояния рассеянного света. В анализаторе крови возможны несколько вариантов исполнения средства фотодетекции, два из которых представлены на Рис. 4. Средство фотодетекции 11 состоит из средства приема флуоресценции 36 и средства приема рассеянного света 37. Средство приема флуоресценции 36, детально показанное на Рис. 4 Б, и состоит из дихроичного зеркала 44, диафрагмы 45, фотоприемника 46. Средство приема рассеянного света 37 в варианте «а» состоит из диафрагмы 38, управляемого фазозадерживающего элемента 39, поляризатора 40, фотоприемника 41, средства управления фазозадерживающим элементом 42, управляющего входа 43. Средство приема рассеянного света (37) в варианте «б» состоит из диафрагмы 47, светоделительных элементов 48, 49, $\lambda/4$ фазозадерживающих элементов 50, 51, поляризаторов 52, 53, 54, фотоприемников 55, 56, 57.

Измеряемые интенсивности являются комбинациями матрицы Мюллера. Для восстановления элементов матрицы Мюллера клетки, достаточно измерить 7

независимых комбинаций этих элементов. В изобретении измерение 9 комбинаций матрицы Мюллера достигается путем попеременного изменения состояния поляризации падающего излучения в виде трех состояний и попеременного изменения состояний фазозадерживающего оптического элемента перед фотоприемником в виде трех состояний - см. вариант «а» в средстве приема рассеянного света 37 (Рис. 4) или деления рассеянного света в три канала, имеющих различные состояния поляризационных элементов - см. вариант «б» в средстве приема рассеянного света 37 (Рис. 4).

Принцип работы средства приема рассеянного света 37 в варианте «а» заключается в следующем: диафрагма 38 отсекает нежелательный рассеянный свет, оставляя для данного положения клетки только лучи, идущие под определенным углом к оптической оси сканирующей кюветы; управляемый фазозадерживающий элемент 39 создает три последовательных значения задержки фазы между двумя состояниями поляризации – 0, $\pi/2$, π , создавая тем самым три независимых состояния поляризации принимаемого излучения.

Принцип работы средства приема рассеянного света 37 в варианте «б» заключается в следующем: диафрагма 38 работает так же как и в варианте «а»; далее рассеянное излучение делится на три части светоделительными элементами 48, 49 не изменяющими состояние поляризации каждой из частей, одна часть излучения проходит через $\lambda/4$ фазозадерживающий элемент 50 и поляризатор 54 на фотоприемник 57, вторая часть излучения проходит через $\lambda/4$ фазозадерживающий элемент 51 и поляризатор 53 на фотодетектор 56, третья часть излучения проходит поляризатор 52 на фотодетектор 55; поляризационные оптические элементы для каждой из частей рассеянного излучения установлены таким образом, чтобы каждый фотодетектор принял и измерял три независимых состояния поляризации принимаемого излучения.

На примере вариантов «б» средства формирования поляризационного излучения 1 и приема рассеянного света 37 может быть показано, какие комбинации элементов матрицы Мюллера будут измеряться для определенного положения поляризационных элементов. Источник когерентного излучения 27 и поляризатор 31 установлены таким образом, чтобы направление поляризации излучения направлено под 45° к лабораторной системе, источник когерентного излучения 26 и поляризатор 30 установлены таким образом, чтобы обеспечить направление поляризации излучения параллельно лабораторной системе, источник когерентного излучения 25, поляризатор 28, $\lambda/4$ фазозадерживающий элемент 29 установлены таким образом, чтобы что

излучение имело циркулярную поляризацию. В этом случае векторы Стокса перечисленных трех положений будут иметь вид:

$$\mathbf{V}_{45^\circ} = \frac{1}{2} \cdot \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad \mathbf{V}_{0^\circ} = \frac{1}{4} \cdot \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad \mathbf{V}_c = \frac{1}{4} \cdot \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix} \quad (9)$$

где множители перед векторами означают потерю интенсивности при прохождении через светоделительные элементы. Далее на приеме рассеянного света в преобразовании поляризационных элементов $\mathbf{P}_\xi \times \mathbf{C}_\ominus$ устанавливаем $\lambda/4$ фазозадерживающие элементы 50, 51 так, что $\Theta = \pi/2$, поляризатор 54 по углом $\xi = 45^\circ$ к лабораторной системе, поляризатор 53 по углом $\xi = -45^\circ$ к лабораторной системе, поляризатор 52 по углом $\xi = 0^\circ$ к лабораторной системе. Тогда матрицы Мюллера поляризационных преобразований на приеме рассеянного света имеют вид:

$$\mathbf{M}_C = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \quad \mathbf{M}_{-C} = \frac{1}{4} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \quad \mathbf{M}_{0^\circ} = \frac{1}{4} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (10)$$

Теперь записываем измеряемые интенсивности рассеянного света для вышеуказанных состояний поляризации падающего света и состояний поляризационных элементов на приеме:

$$\mathbf{V}_{45^\circ}, \mathbf{M}_{-C} - I_1 = \frac{1}{8} \cdot \int_0^{2\pi} [S_{11} + S_{41} + (S_{12} + S_{42}) \cdot \sin(2\varphi) + (S_{13} + S_{43}) \cdot \cos(2\varphi)] \cdot d\varphi \quad (11)$$

$$\mathbf{V}_{45^\circ}, \mathbf{M}_C - I_2 = \frac{1}{4} \cdot \int_0^{2\pi} [S_{11} - S_{41} + (S_{12} - S_{42}) \cdot \sin(2\varphi) + (S_{13} - S_{43}) \cdot \cos(2\varphi)] \cdot d\varphi \quad (12)$$

$$\mathbf{V}_{45^\circ}, \mathbf{M}_0 - I_3 = \frac{1}{8} \cdot \int_0^{2\pi} [S_{11} - S_{21} \cdot \cos(2\varphi) + S_{31} \cdot \sin(2\varphi) + S_{12} \cdot \sin(2\varphi) - S_{22} \cdot \frac{1}{2} \sin(4\varphi) + S_{32} \cdot \sin^2(2\varphi) + S_{13} \cdot \cos(2\varphi) - S_{23} \cdot \cos^2(2\varphi) + S_{33} \cdot \frac{1}{2} \sin(4\varphi)] \cdot d\varphi \quad (13)$$

$$\mathbf{V}_{0^\circ}, \mathbf{M}_{-C} - I_4 = \frac{1}{16} \cdot \int_0^{2\pi} [S_{11} + S_{41} - (S_{12} + S_{42}) \cdot \cos(2\varphi) + (S_{13} + S_{43}) \cdot \sin(2\varphi)] \cdot d\varphi \quad (14)$$

$$\mathbf{V}_{0^\circ}, \mathbf{M}_C - I_5 = \frac{1}{8} \cdot \int_0^{2\pi} [S_{11} - S_{41} - (S_{12} - S_{42}) \cdot \cos(2\varphi) + (S_{13} - S_{43}) \cdot \sin(2\varphi)] \cdot d\varphi \quad (15)$$

$$\mathbf{V}_{0^\circ}, \mathbf{M}_0 - I_6 = \frac{1}{16} \cdot \int_0^{2\pi} [S_{11} - S_{21} \cdot \cos(2\varphi) + S_{31} \cdot \sin(2\varphi) - S_{12} \cdot \cos(2\varphi) + S_{22} \cdot \cos^2(2\varphi) + S_{32} \cdot \frac{1}{2} \sin(4\varphi) + S_{13} \cdot \sin(2\varphi) - S_{23} \cdot \frac{1}{2} \sin(4\varphi) + S_{33} \cdot \sin^2(2\varphi)] \cdot d\varphi \quad (16)$$

$$\mathbf{V}_C, \mathbf{M}_C - I_7 = \frac{1}{16} \int_0^{2\pi} [S_{11} + S_{41} + S_{14} + S_{44}] \cdot d\varphi \quad (17)$$

$$\mathbf{V}_C, \mathbf{M}_C - I_8 = \frac{1}{16} \int_0^{2\pi} [S_{11} - S_{41} + S_{14} - S_{44}] \cdot d\varphi \quad (18)$$

$$\mathbf{V}_C, \mathbf{M}_{0^\circ} - I_9 = \frac{1}{16} \int_0^{2\pi} [S_{11} - (S_{21} + S_{24}) \cdot \cos(2\varphi) + S_{14} + (S_{31} + S_{34}) \cdot \sin(2\varphi)] \cdot d\varphi \quad (19)$$

Средство фотодетекции 11 может представлять собой двумерную матрицу фоточувствительных элементов. Принцип работы средства фотодетекции рассеянного света заключается в следующем: каждый элемент матрицы накапливает фотосигнал при движении клетки в зоне измерения 19. При этом результирующая величина сигнала описывается выражением

$$S_{i,j}(x,y) = \int_{L_1}^{L_2} \int_{\varphi} \int_{\theta} S_{i,j}(\theta, \varphi) \delta(\theta - g(x,y,t)) \delta(\varphi - f(x,y,t)) d\varphi d\theta dt, \quad (20)$$

где (x,y) – координаты фоточувствительного элемента матрицы, $S_{ij}(\theta, \varphi)$ – искомая индикатриса светорассеяния, t – положение анализируемой клетки внутри зоны детекции, простирающейся от L_1 до L_2 . Функции $g(x,y,t)$ и $f(x,y,t)$ определяют углы θ и φ при которых свет, вышедший из точки t , попадет в точку с координатами (x,y) .

На Рис. 5 детально показан принцип измерения спектра флуоресценции анализируемой клетки. Сфокусированный луч когерентного поляризованного излучения 5 и флуоресценция от клетки крови для двух ее положений 62, 63 показаны пунктирной линией. Флуоресценция изменяется при движении клетки крови по центру сканирующей кюветы 7. В основе измерения спектра флуоресценции лежат большие хроматические aberrации дифракционного оптического элемента ДОЭ. ДОЭ 58 выполнен в виде оптически прозрачного окна 4 с нанесенными с одной его стороны штрихами в виде концентрических колец. Размер и форма штрихов специально рассчитываются для конкретной геометрии анализатора. ДОЭ работает как линза, перенося флуоресценцию от клетки крови в диафрагму 45 на средство приема флуоресценции. Для определенной длины волны λ флуоресценция, эмитируемая

клеткой крови, будет фокусироваться ДОЭ в диафрагму 45 только при определенном положении клетки. Для клетки крови, находящейся в положении 60 только флуоресценция эмитируемая с длиной волны λ_1 достигнет фотоприемника. Длина волны принимаемой флуоресценции изменяется от λ_1 до λ_2 при движении клетки крови в зоне измерения 59 от положения 60 до положения 61.

Неотъемлемой частью изобретения является: во - первых, наличие сканирующей кюветы, имеющей сферическое зеркало, совпадение осей названного зеркала, внутреннего канала (потока пробы крови) и когерентного поляризованного излучения, и, во - вторых, средство фотодетекции, принимающее рассеянный клетками крови свет, позволяющие в совокупности измерять 9 комбинаций матрицы Мюллера рассеянного света. Чрезвычайно полезным является также использование ДОЭ, который позволяет измерять спектр флуоресценции клетки крови.

Описанная выше оптическая система позволяет измерять 9 комбинаций элементов матрицы Мюллера в зависимости от угла рассеяния одиночной клетки в диапазоне углов от 5° до 120° .

На Рис.6 показана сканирующая кювета, которая совмещает два сферических зеркала, расположенных последовательно, но в противоположных направлениях, и позволяет измерять индикатрисы светорассеяния в расширенном диапазоне углов от 5° до 175° .

Пример1

Определение характеристик эритроцитов по индикатрисе светорассеяния.

Для анализа светорассеяния на длинах волн видимого диапазона эритроцитов можно рассматривать как однородный объект [Туско D.H., Metz M.H., Epstein E.A., Grinbaum A. Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration. // Applied Optics. - 1985. - V. 24. - P. 1355-1365.], имеющий форму двояковогнутого диска. Из анализа литературных данных [Fung Y.C., Tsang W.C. and Patitucci P. High-resolution data on the geometry of red blood cells. // Biorheology. - 1981. - V.18 - P.369-385] для расчета прямой задач светорассеяния была выбрана следующая параметризация:

$$\left(r^4 + 2Sr^2z^2 + z^4\right) + Pr^2 + Qz^2 + R = 0 \text{ или} \quad (21)$$

$$z = \sqrt{-\frac{Q}{2} - S \cdot r^2 + \sqrt{\left(\frac{Q}{2} + S \cdot r^2\right)^2 - P \cdot r^2 - r^4 - R}}$$

Где S, P, Q, R являются параметрами, которые связаны с параметрами геометрии клетки крови следующим образом:

$$\begin{aligned}
 P &= -\frac{d^2}{4} - \frac{b^2 h^2}{4d^2} - \frac{4b^2 c^2}{d^2(h^2 - b^2)} \\
 R &= -\frac{d^2}{16}(d^2 + 4P) \\
 Q &= -\frac{d^4 + 4d^2 P - b^4}{16} \\
 S &= -\frac{4c^2 - 2P}{h^2}
 \end{aligned}
 \tag{22}$$

Где d – диаметр клетки, h – максимальная толщина клетки, b – минимальная толщина, c – радиальная координата положения максимума толщины клетки относительно оси симметрии клетки.

Расчет прямой задачи светорассеяния осуществляют по методу аппроксимации дискретными диполями [Draine В.Т. The discrete-dipole approximation and its application to interstellar graphite grains. // *Astrophys. J.* - 1988 – V.333, 848-872]. Распределение клеток по параметрам считают однородным в диапазонах: для d от 5.8 до 10.2 микрометров, для h от 0.85 до 4 микрометров, для b от 0.1 до 2.1 микрометров, и c задавалась в диапазоне $0.33*d \pm 0.05$ микрометров. Концентрация гемоглобина варьируется от 25 до 42 грамм/децилитр. Угол поворота наиболее протяженной координаты клетки относительно падающего излучения варьируется в узком диапазоне от 0° до 15° , т.к. гидрофокусирующая система устройства имеет хорошие ориентирующие характеристики для несферических объектов (в случае эритроцитов – разброс по ориентациям составляет несколько градусов).

Величины всех параметров варьируют независимо по методу Монте-Карло в указанных диапазонах. Таким образом рассчитывают базу характеристик светорассеяния от 10^5 модельных клеток.

Измерения и расчет проводят для индикатрисы I_7 (см. (17)). Для каждой измеренной индикатрисы эритроцита в модельной базе данных находят наиболее близкую модельную индикатрису, например, по методу наименьших квадратов с определенной весовой функцией, зависящей от угла рассеяния. Величины параметров, соответствующие модельной индикатрисе (объем, площадь поверхности) принимают равными таковым у измеренной клетки.

Пример 2

Определение характеристик тромбоцитов по индикатрисе светорассеяния

Анализ литературных данных по морфологии тромбоцитов в различных антикоагулянтах и предварительное детальное изучение измеренных индикатрис светорассеяния позволяет сделать вывод, что тромбоцит в EDTA является сплюснутым

сфероидом, имеющим несколько отростков, псевдоподий. Далее проводят расчет светорассеяния методом дискретных диполей (DDA) для сплюснутого сфероида с псевдоподиями. Анализ расчетных данных показывает, что наличие псевдоподий вносит незначительный вклад в индикатрису светорассеяния, что существенно упрощает модель тромбоцита. Проведят предварительный расчет индикатрис светорассеяния для сплюснутых сфероидов с вариацией параметров, характерных для тромбоцитов в EDTA. Варьируют размерный параметр определяемый как $\alpha = 2\pi r \cdot n_0 / \lambda$, набег фазы определяемый как $\rho = 2\alpha(m - 1)$, ϵ отношение полуосей сфероида, где $m = n/n_0$ - относительный коэффициент преломления, λ - длина волны падающего излучения, r - радиус сферы эквивалентного объема. Измерения и расчет проводят для индикатрисы I_7 (см. (17)). Путем сравнения рассчитанных индикатрис с измеренными находят вышеназванные параметры тромбоцита. Далее, для известной длины волны и коэффициента преломления среды вычисляют объем, определяемый как $V = 4/3\pi r^3$, и коэффициент преломления, определяемый как $n = (\rho/2\alpha + 1) \cdot n_0$.

Пример 3

Дифференциация лейкоцитов по индикатрисам светорассеяния

Для разделения основных трех популяций лейкоцитов на лимфоциты, моноциты и гранулоциты используются параметры индикатрисы светорассеяния I_7 . В качестве параметров индикатрисы берутся интегралы индикатрисы светорассеяния в два определенных телесных угла. Для указанных целей выбраны интегралы в интервалах $7.5^\circ \pm 2.5^\circ$ и в $45^\circ \pm 10^\circ$ (см. Рис. 10).

Пример 4

Измерение дополнительных характеристик эритроцитов в процессе лизиса

Более детальное определение характеристик клеток крови в по заявляемому способу выполняется в ходе анализа кинетического процесса с участием изменения морфологических характеристик. В процессе кинетического процесса происходит упрощение определения морфологических параметров клеточной популяции за счет принятия измеряемыми объектами формы, для которых точность решения обратной задачи светорассеяния возрастает (например, сферической). Примером такого процесса является лизис эритроцитов в водном растворе соли хлорида аммония в изотонической концентрации. Как показано на Рис. 11, в данном процессе можно идентифицировать стадию сферизации (серая область).

Измерение эволюции во времени функции распределения по морфологическим параметрам клеточной популяции в сочетании с кинетической моделью процесса

позволяет определять «динамические» параметры, недоступные для измерения в статике. Для определения «динамических» параметров по данным измерения кинетики гемолиза на СПЦ применялись модели транспорта анионов, растяжения мембраны и образования клеточной поры. В Таблица 1 показаны определенные таким образом параметры крови и их распределение в популяции.

Таблица 1

	Параметры логнормального распределения	
	Среднее	Ширина
Объем, V_0 , μm^3	87.5 ± 0.3	$(1.22 \pm 0.03) \cdot 10^{-1}$
Гемоглобин, [Hb], mM	4.910 ± 0.005	$(6.46 \pm 0.10) \cdot 10^{-2}$
Индекс сферичности, V_s/V_0	1.74 ± 0.02	$(4.60 \pm 0.07) \cdot 10^{-2}$
Площадь мембраны, S , μm^2	$(1.38 \pm 0.01) \cdot 10^2$	$(8.0 \pm 0.2) \cdot 10^{-2}$
Количество белка N_{band3} , молекул	$(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^6$	-
Эластичность мембраны, $\frac{\sigma_\beta}{K_s}$	$(1.5 \pm 0.6) \cdot 10^{-2}$	-

Пример 5

Построение обучающей выборки для разделения лимфоцитов на подклассы CD3 (Т - лимфоциты), CD19 (В - лимфоциты), CD4 (Т - хелперы), CD8 (Т - киллеры).

Кровь здорового донора забирают в пробирку, наполненную EDTA в качестве антикоагулянта в соотношении 1.5 мг EDTA к 1 мл крови. Для создания обучающей выборки для разделения лимфоцитов на классы используют следующую процедуру пробоподготовки [Ormerod MG. Preparing suspensions of single cells. Flow Cytometry: A Practical Approach (3rd edition). (Ormerod MG., ed) Oxford Univ Press, 2000]. 2 мл крови разбавленной антикоагулянтом разбавляют 6 мл солевого фосфатного буферного раствора и центрифугируют при ≈ 450 g в течении 20 минут в Ficoll®-sodium metrizonate solution, плотность которого составляет 1.077 мг/л. Затем тонкий слой мононуклеарных клеток выбирают из поверхности раздела фаз плазма/ Ficoll, отмывают в фосфатном буфере и окрашивают иммунофлуоресцентными маркерами CD3, CD19, CD4, CD8, каждый из которых несет на себе свой флуоресцентный краситель: FITC, PE, TRPE, Cy5PE соответственно. После 20 минут окрашивания пробу опять отмывают и доводят разбавлением в фосфатном буфере до концентрации 10^6 клеток/мл.

Для каждой клетки из приготовленной пробы одновременно измеряют спектр флуоресценции и индикатрисы светорассеяния. По измеренному спектру флуоресценции определяют принадлежность клетки к тому или иному типу: CD3, CD19, CD4 или CD8. По измеренным индикатрисам определяют набор параметров, например, интегралы индикатрис в заданных угловых интервалах, положения и амплитуды максимумов в Фурье спектре индикатрис, так же параметры могут быть взяты непосредственно из решения обратной задачи светорассеяния по измеренным индикатрисам, всего N параметров. Тип каждой клетки с одной стороны однозначно определен с помощью флуоресценции, с другой стороны имеет вполне определенный набор параметров $\bar{\mathbf{P}}_q^j = (P_1, P_2, \dots, P_N)_q^j$, где N – число параметров индикатрисы, q – индекс принадлежности клетки подклассу CD3, CD19, CD4 или CD8, j – номер клетки в подклассе.

Пример 6

Комплексный анализ крови

Для анализа берется 100 микролитров цельной антикоагулированной крови. Этот образец крови разделяют на две части: 25 микролитров и 75 микролитров, и помещают в две различных пробирки. В первую пробирку добавляют разбавляющий реагент в пропорции 500:1. Во вторую пробирку добавляют 1500 микролитров лизирующего раствора – раствор хлорида аммония в изотонической концентрации с концентрацией ионов HCO_3^- 8 ± 2 миллимоль. Эритроциты лизируются в течение 3-х мин при комнатной температуре $23^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

Далее первую и вторую части пробы крови последовательно пропускают через сканирующую проточную кювету устройства, изображенного на рис. 1 со скоростью 5 м/с, облучая ее циркулярно поляризованным излучением с длиной волны 660 мкм. В результате измеряют индикатрисы светорассеяния I_7 и I_9 одиночных клеток крови (см. выражения (17) и (19) и рис. 7). Измерения эритроцитов, тромбоцитов и ретикулоцитов происходит при измерении первой части пробы, измерения остальных клеток крови происходит при измерении второй части пробы.

Данные измерения эритроцитов и тромбоцитов образуют кластера в пространстве двух параметров. Данные клетки разделяют методом *k средних* по следующим параметрам индикатрисы I_7 : интегралы $J_1 = \int_5^{10} I_7(\theta) d\theta$ и $J_{10-50} = \int_{10}^{50} I_7(\theta) d\theta$.

Обратную задачу светорассеяния решают методом узлового пространства, используя базу индикатрис I_7 , рассчитанных от модельных клеток со случайным

образом варьируемой геометрией в пределах литературных значений. Примеры решения для нескольких измеренных индикатрис показаны на рис. 8 и рис. 9 для эритроцитов и тромбоцитов соответственно. Тромбоциты моделируют сплюснутыми эллипсоидами, эритроциты – двояковогнутым диском с известными параметризациями. Размер используемой базы составляет не менее 10^5 и 10^4 расчетных индикатрис для эритроцитов и тромбоцитов соответственно.

Идентификация ретикулоцитов производится по заранее обученному алгоритму классификацией методом *k* ближайших соседей. Используют алгоритм, обученный с помощью мечения красителем тиазоловым оранжевым способным окрашивать ретикулоциты. При этом, в качестве параметров для обучения и идентификации берут

интегралы $J_i = \int_{5+5(i-1)}^{5+5i} I_7(\theta) d\theta$, $i=(1, 2 \dots 10)$, всего 10 параметров.

Дифференциация лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов (множество последних объединяет нейтрофилы, базофилы, эозинофилы) осуществляют метом *k* средних в пространстве по измеренных параметров J_i и $J_{35-55} = \int_{35}^{55} I_7(\theta) d\theta$ (см. рис. 10).

Дифференциация гранулоцитов на подклассы - нейтрофилы, базофилы, эозинофилы производят по заранее обученному алгоритму классификацией методом *k* ближайших соседей. Используют алгоритм, обученный с помощью мечения специфичными моноклональными антителами (CD63, CD203с, CD244), связанными с флуоресцентными красителями. При этом, в качестве параметров для обучения и

дифференциации берут интегралы $J_i = \int_{5+5(i-1)}^{5+5i} I_7(\theta) d\theta$, $K_{35-50} = \int_{35}^{50} I_9(\theta) d\theta$ $i=(1, 2 \dots 10)$, всего

11 параметров.

В полученном множестве лимфоцитов по заранее обученному алгоритму классификацией методом *k* ближайших соседей выделяют подмножества Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. Используют алгоритм, обученный с помощью мечения специфичными моноклональными антителами CD3 и CD19 соответственно. В качестве

параметров для обучения берут интегралы $J_i = \int_{5+5(i-1)}^{5+5i} I_7(\theta) d\theta$, $K_i = \int_{5+5(i-1)}^{5+5i} I_9(\theta) d\theta$ всего 20

параметров.

Результаты комплексного анализа крови, проведенного описанным способом, сведены

Таблица 2:

Таблица 2

Величина	Значение
Гемоглобин, средне клеточная концентрация	32.8 (грамм/дл)
Ширина распределения по внутриклеточной концентрации гемоглобина	4.2 %
Эритроциты,	5.1×10^{12} (л ⁻¹)
Ретикулоциты, (% от концентрации эритроцитов)	0.9%
Лейкоциты	8.3×10^9 (л ⁻¹)
Нейтрофилы	5.1×10^9 (л ⁻¹)
Эозинофилы	0.2×10^9 (л ⁻¹)
Базофилы	0.05×10^9 (л ⁻¹)
Моноциты	0.4×10^9 (л ⁻¹)
Лимфоциты	2.5×10^9 (л ⁻¹)
Т-лимфоциты (CD3+)	1.6×10^9 (л ⁻¹)
В-лимфоциты (CD19+)	0.45×10^9 (л ⁻¹)
Средний диаметр эритроцитов	7.7 мкм
Ширина распределения эритроцитов по диаметру	12.3%
Средняя площадь поверхности мембраны эритроцитов	137.1 мкм ³
Ширина распределения эритроцитов по площади поверхности, %	9.5%
Средний объем эритроцитов	87 (фемтолитров)
Ширина распределения эритроцитов по объему, %	15.1%
Средний объем тромбоцитов	9.3 (фемтолитров)
Ширина распределения тромбоцитов по объему, %	17.8%
Средний коэффициент преломления тромбоцитов	1.39
Ширина распределения тромбоцитов по коэффициенту преломления, %	15%

Формула изобретения

1. Способ проведения анализов крови, по которому пробу крови смешивают с разбавляющим и/ или растворяющим реагентом, формируют поток пробы крови и определяют мультиугловое рассеяние света клетками крови в названном потоке пробы крови, выявляют и подсчитывают клетки крови по мультиугловому рассеянию ими света, отличающийся тем, что на поток пробы крови воздействуют когерентным поляризованным излучением в видимом диапазоне длин волн, направляя его вдоль оси потока.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что пробу крови разделяют на две части, первую из которых смешивают с разбавляющим, а вторую – с растворяющим реагентом.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что пробу крови смешивают с разбавляющим и/ или растворяющим реагентом до концентрации клеток крови в ней $10^5 - 10^6$ кл/мл
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что скорость потока пробы крови поддерживают на уровне 1-10 м/с.
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что разбавляющим реагентом является буферный изотоничный раствор хлорида натрия.
6. Способ по п.1, отличающийся тем, что растворяющим реагентом является раствор хлорида аммония.
7. Способ по п.1, отличающийся тем, что когерентное поляризованное излучение имеет длину волны 330-680 нм.
8. Способ по п.1, отличающийся тем, что когерентным поляризованным излучением является лазерное излучение.
9. Способ по п.1, отличающийся тем, что во время воздействия на поток пробы крови когерентным поляризованным излучением, поляризационное состояние излучения последовательно изменяют.
10. Способ по п.1, отличающийся тем, что по мультиугловому рассеянию света клетками крови в потоке пробы крови определяют N индикатрис светорассеяния клеток крови при N, равном 1-9.
11. Способ по п.1, отличающийся тем, что по мультиугловому рассеянию света клетками крови в потоке пробы крови определяют двумерную индикатрису светорассеяния.
12. Анализатор крови, включающий проточную камеру, средство, формирующее поток пробы крови в названной проточной камере, источник

когерентного излучения, средство фотодетекции, а также средство управления и обработки данных, связанное с названным средством фотодетекции, отличающийся тем, что проточная камера выполнена в форме сканирующей кюветы, имеющей корпус из оптически прозрачного материала с внутренним прямолинейным каналом, и сферическое зеркало, центр которого совпадает с осью внутреннего канала сканирующей кюветы, а источник когерентного излучения выполнен в форме источника поляризованного когерентного излучения в видимом диапазоне длин волн, который установлен таким образом, что его излучение направлено вдоль оси названного внутреннего канала сканирующей кюветы, причем внутренняя поверхность сферического зеркала сканирующей кюветы оптически связана с названным средством фотодетекции.

13. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что внутренняя поверхность сферического зеркала сканирующей кюветы оптически связана со средством фотодетекции посредством зеркала, установленного под углом к оси внутреннего канала сканирующей кюветы.

14. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что средство, формирующее поток пробы крови, выполнено в форме гидрофокусирующей головки.

15. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что источник когерентного поляризованного излучения выполнен с длиной волны 330-680 нм.

16. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что средством управления и обработки данных является ЭВМ.

17. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что сканирующая кювета снабжена дифракционным оптическим элементом.

18. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что средство фотодетекции выполнено с возможностью детекции флуоресценции.

19. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что источник когерентного поляризованного излучения снабжен $\lambda/4$ фазозадерживающим элементом.

20. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что источник когерентного поляризованного излучения снабжен управляемым фазозадерживающим элементом, выполненным в форме электрооптического кристалла.

21. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что источник когерентного поляризованного излучения содержит один лазер и поляризатор.

22. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что источник когерентного поляризованного излучения содержит два лазера и при этом снабжен

светоделительным элементом, двумя поляризаторами и $\lambda/4$ фазозадерживающим элементом.

23. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что источник когерентного поляризованного излучения содержит три лазера и при этом снабжен двумя светоделительными элементами, тремя поляризаторами и двумя $\lambda/4$ фазозадерживающими элементами.

24. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что средство фотодетекции содержит управляемый фазозадерживающий элемент, выполненный в форме электрооптического кристалла, поляризатор и фоториетник.

25. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что средство фотодетекции содержит светоделительный элемент, два поляризатора, $\lambda/4$ фазозадерживающий элемент и два фотодетектора.

26. Анализатор по п. 12 отличающийся тем, что средство фотодетекции содержит два светоделительных элемента, три поляризатора, два $\lambda/4$ фазозадерживающих элемента и три фотодетектора.

27. Анализатор по п. 12 отличающийся тем, что средство фотодетекции представляет собой двумерную матрицу фоточувствительных элементов.

28. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что сканирующая кювета снабжена дополнительным сферическим зеркалом, причем сферические поверхности зеркал направлены в противоположные стороны.

29. Анализатор по п. 12, отличающийся тем, что средство управления и обработки данных связано со средством фотодетекции через аналого - цифровой преобразователь.

СПОСОБ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗОВ КРОВИ
И АНАЛИЗАТОР КРОВИ

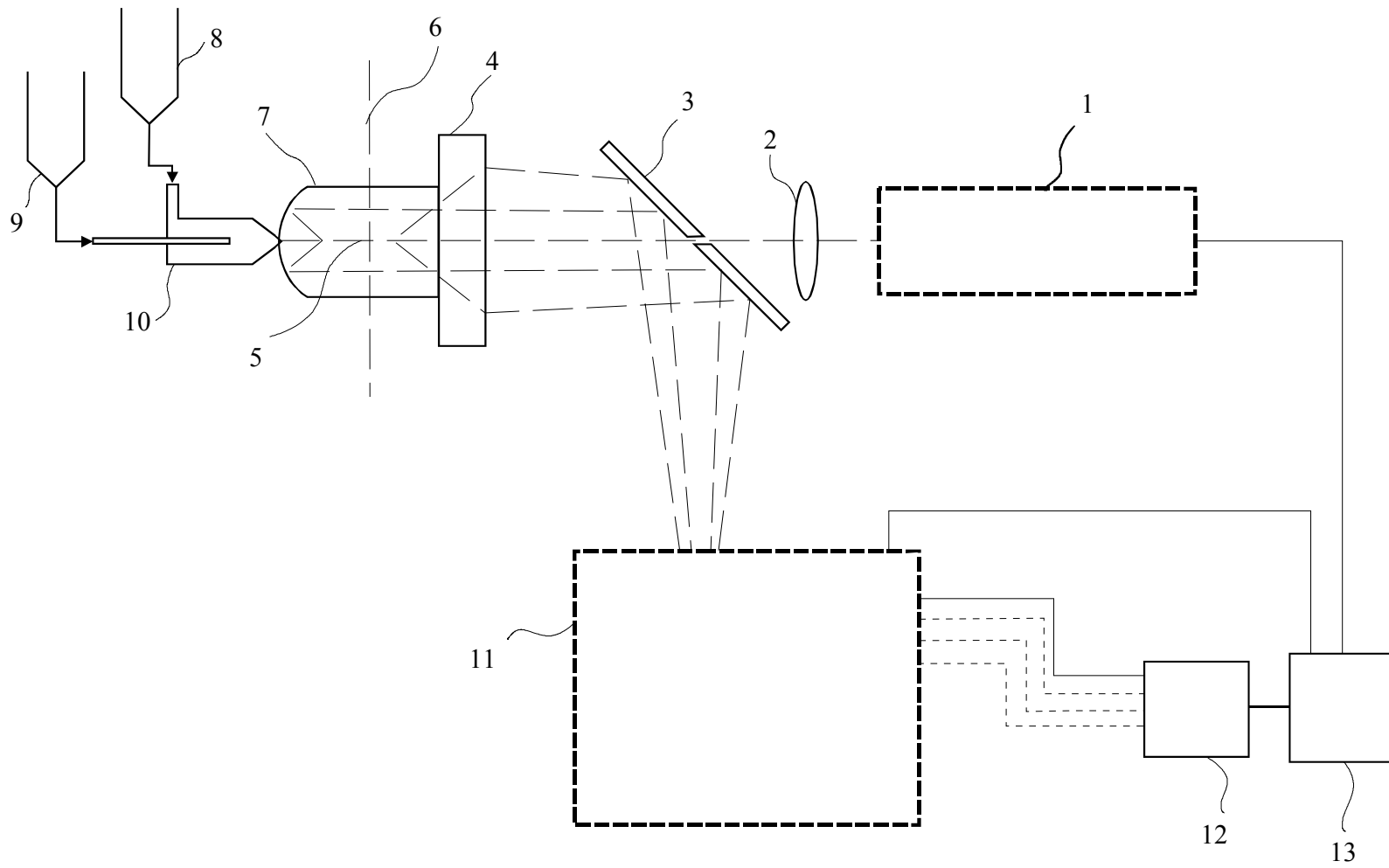


Рис. 1

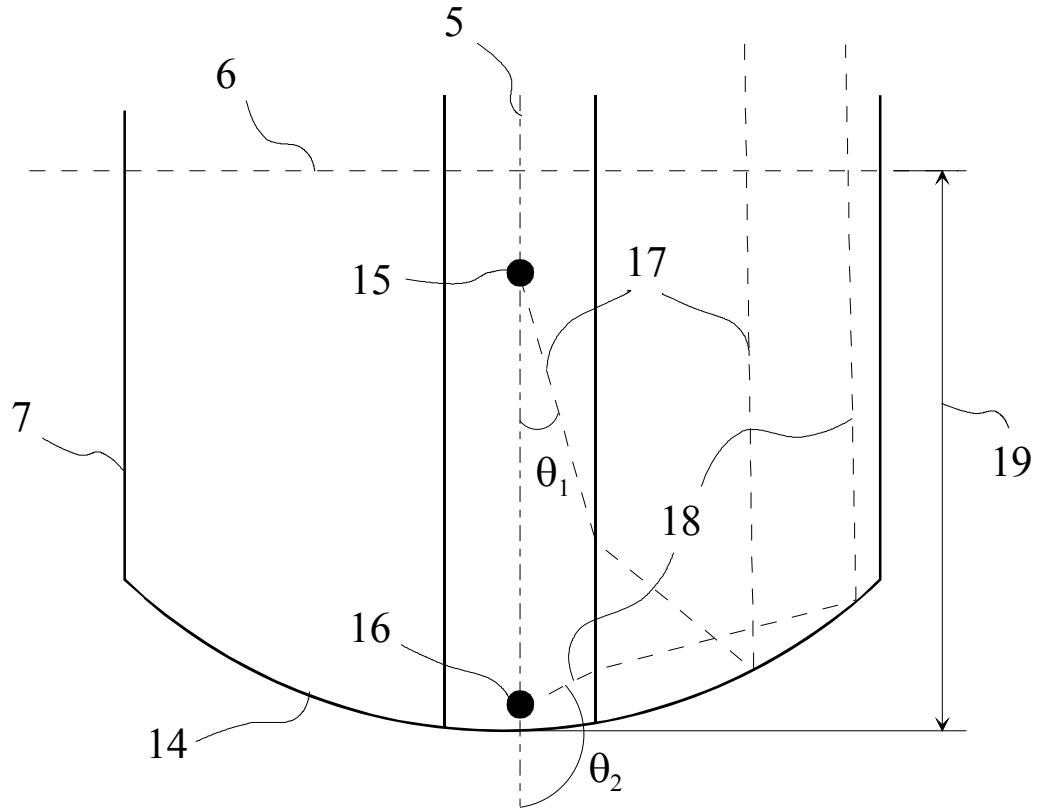
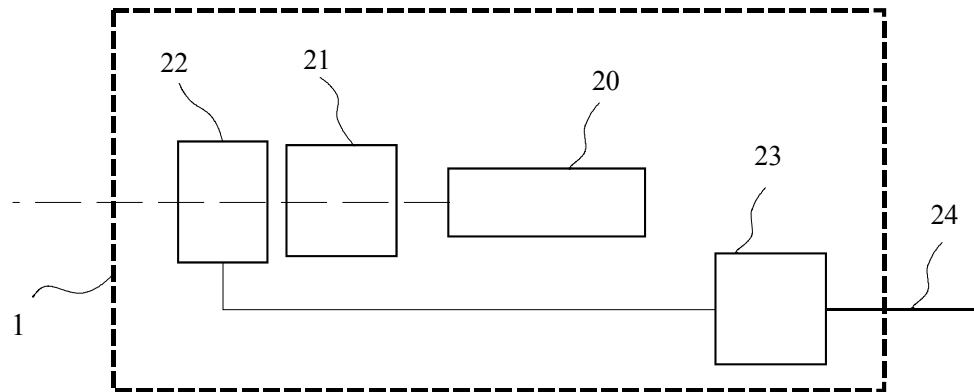


Рис. 2

а)



б)

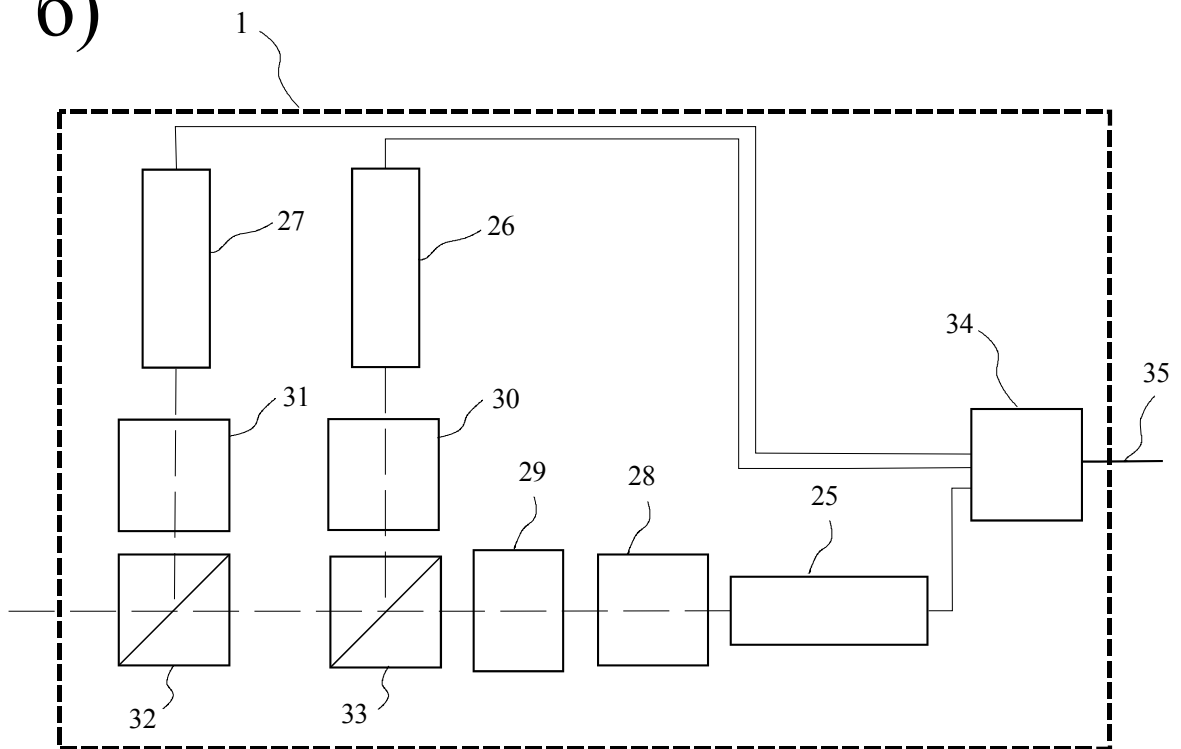


Рис. 3

СПОСОБ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗОВ КРОВИ
И АНАЛИЗАТОР КРОВИ

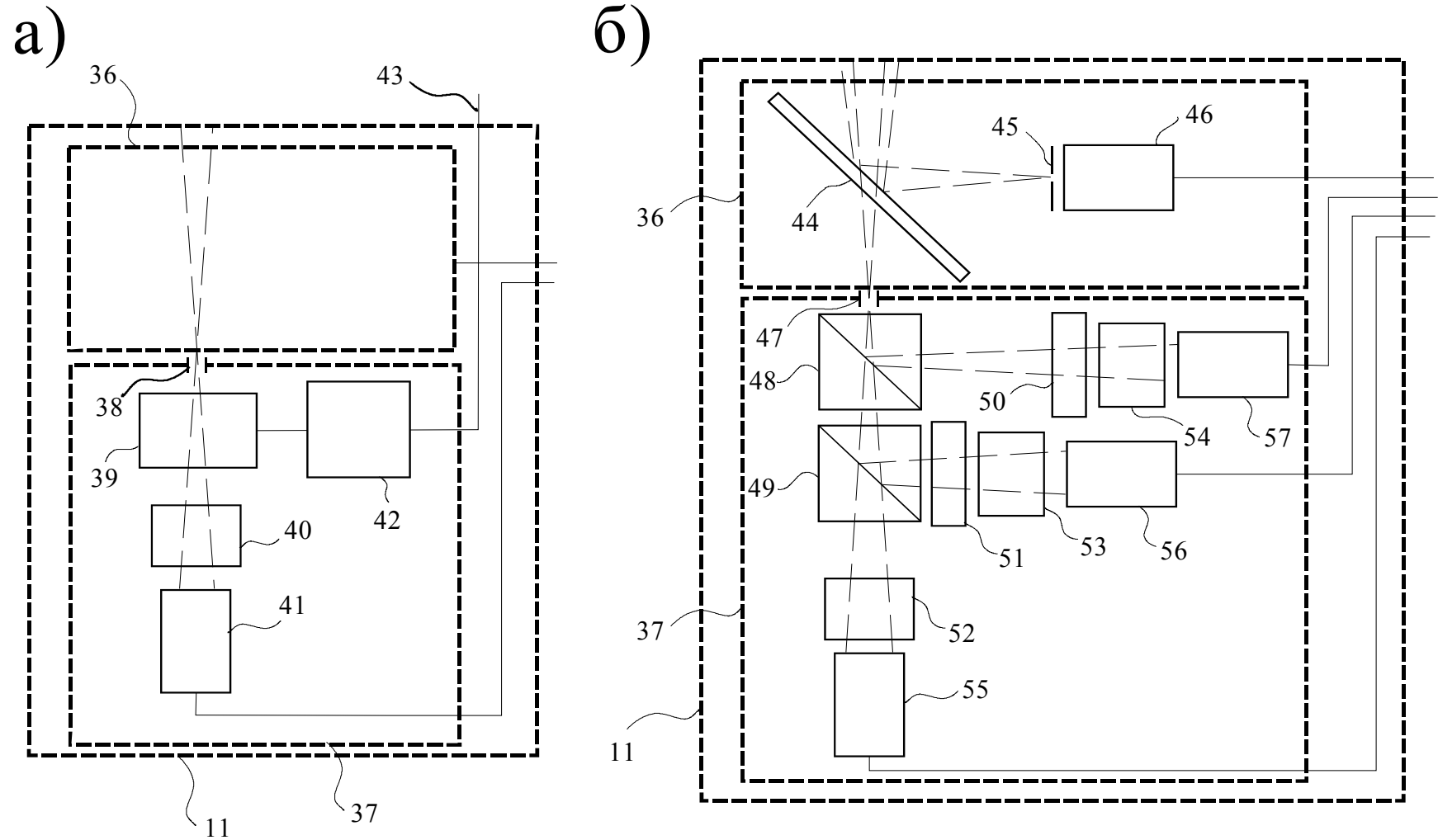


Рис. 4

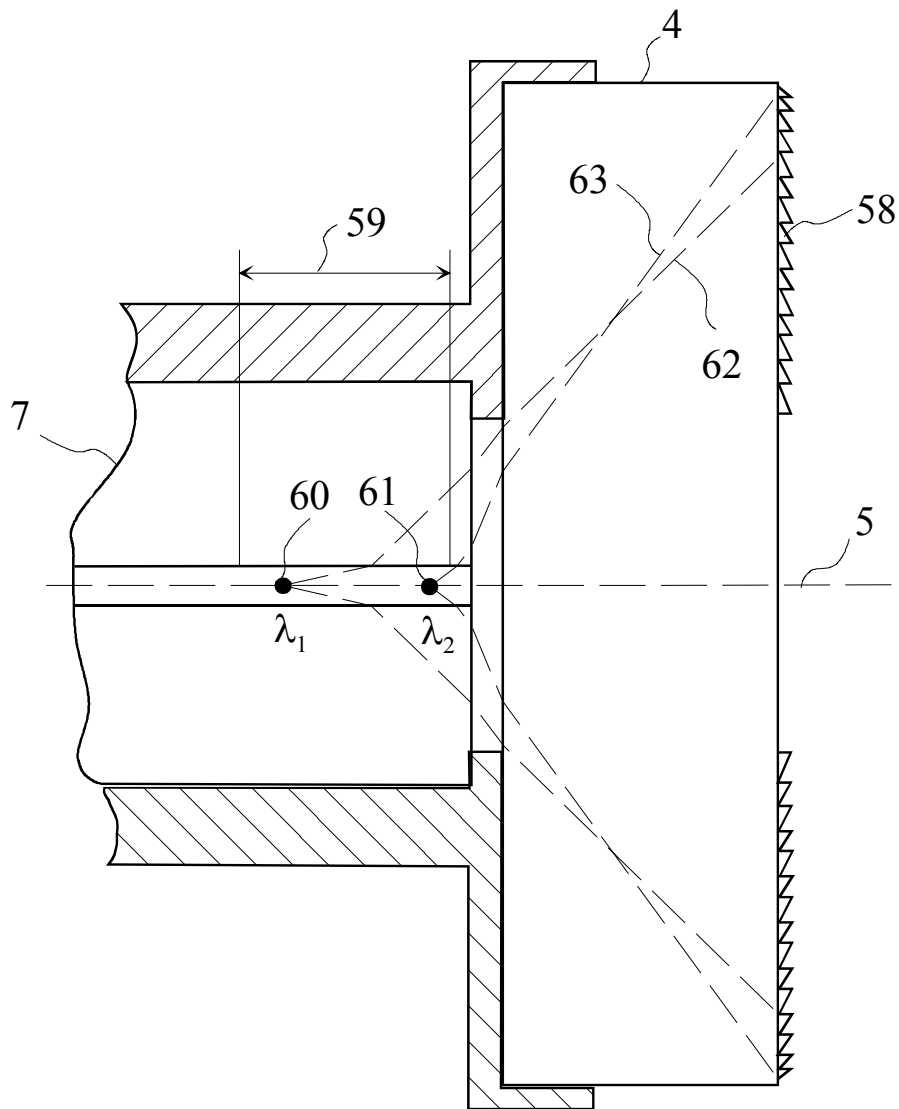


Рис. 5

СПОСОБ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗОВ КРОВИ

И АНАЛИЗАТОР КРОВИ

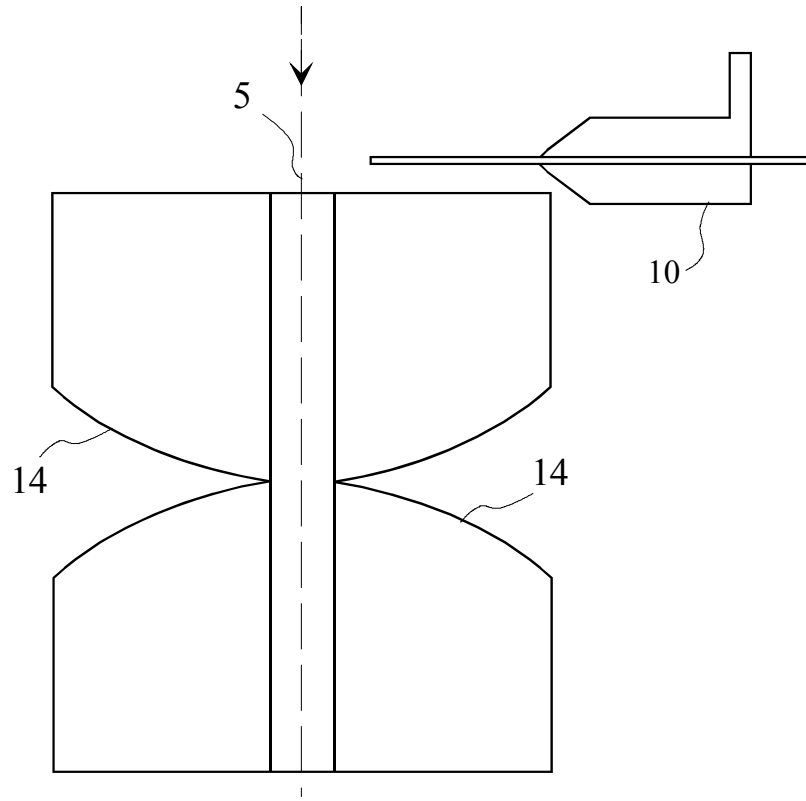


Рис. 6

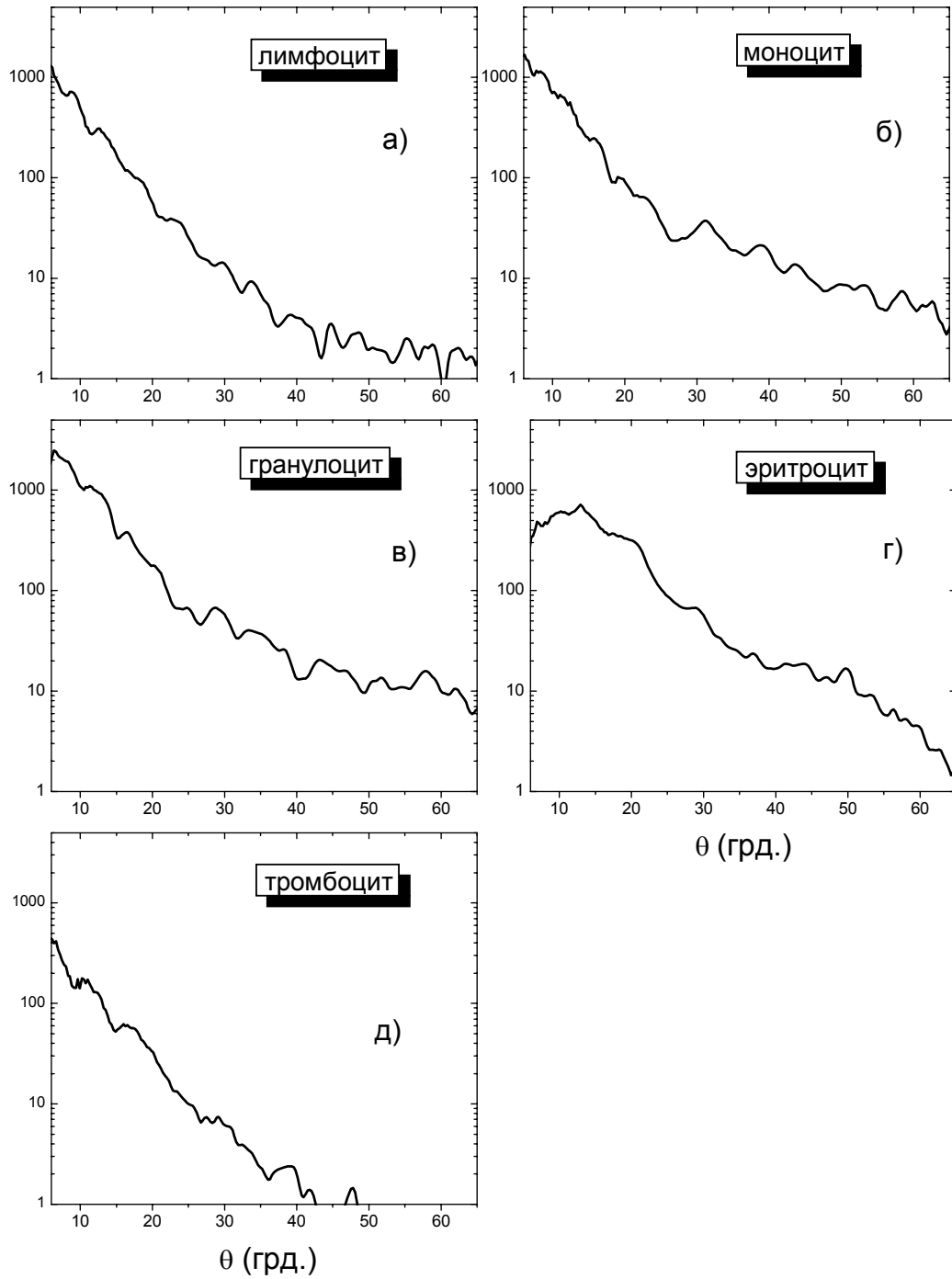


Рис. 7

СПОСОБ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗОВ КРОВИ

И АНАЛИЗАТОР КРОВИ

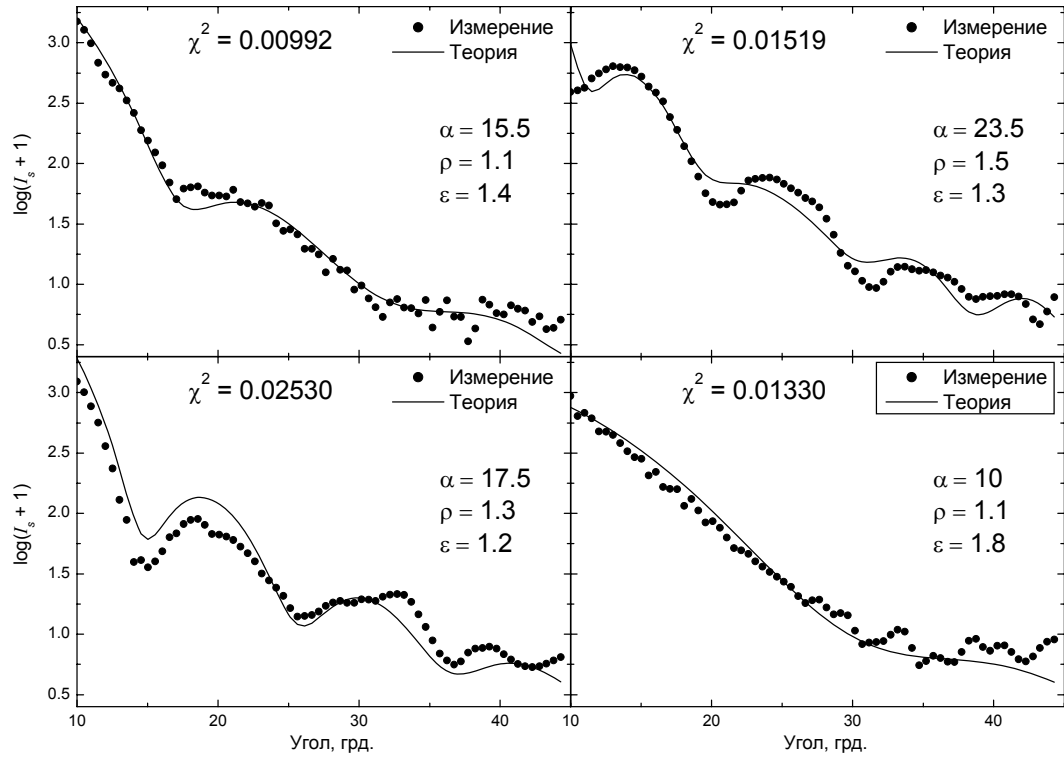


Рис. 8

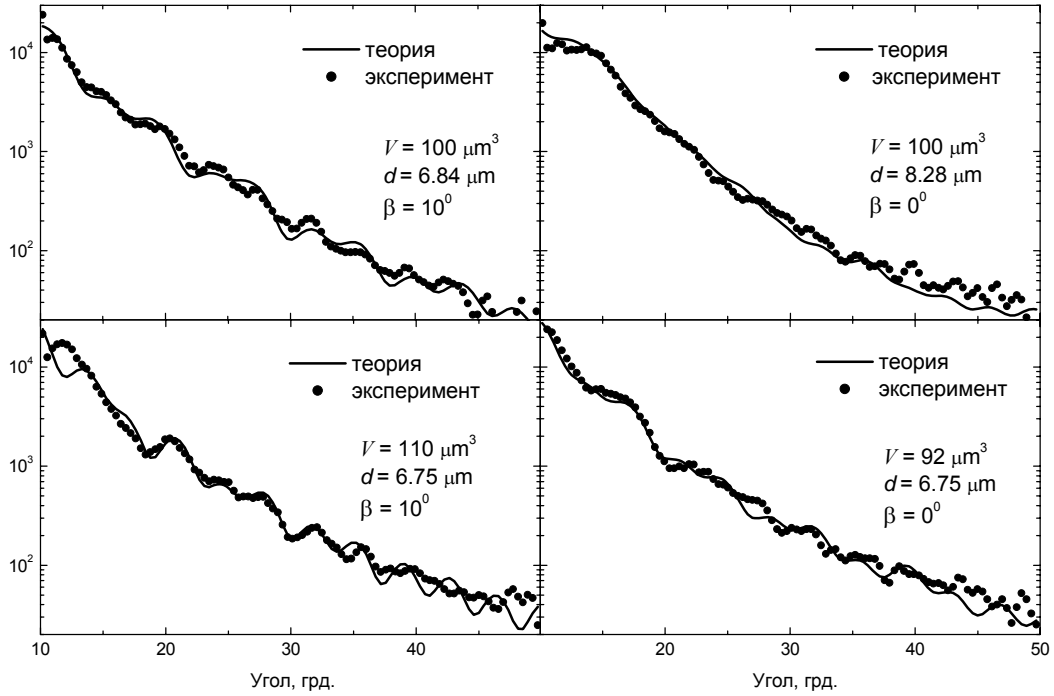


Рис. 9

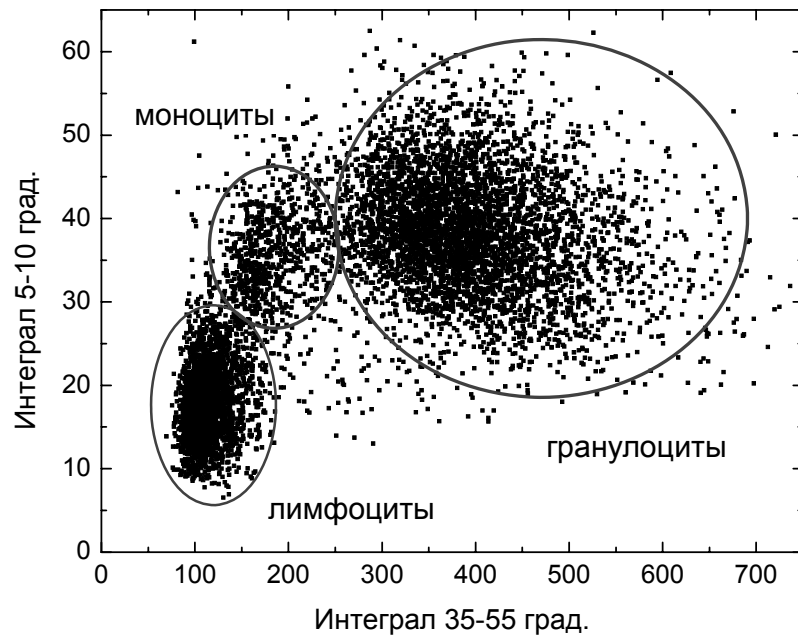


Рис. 10

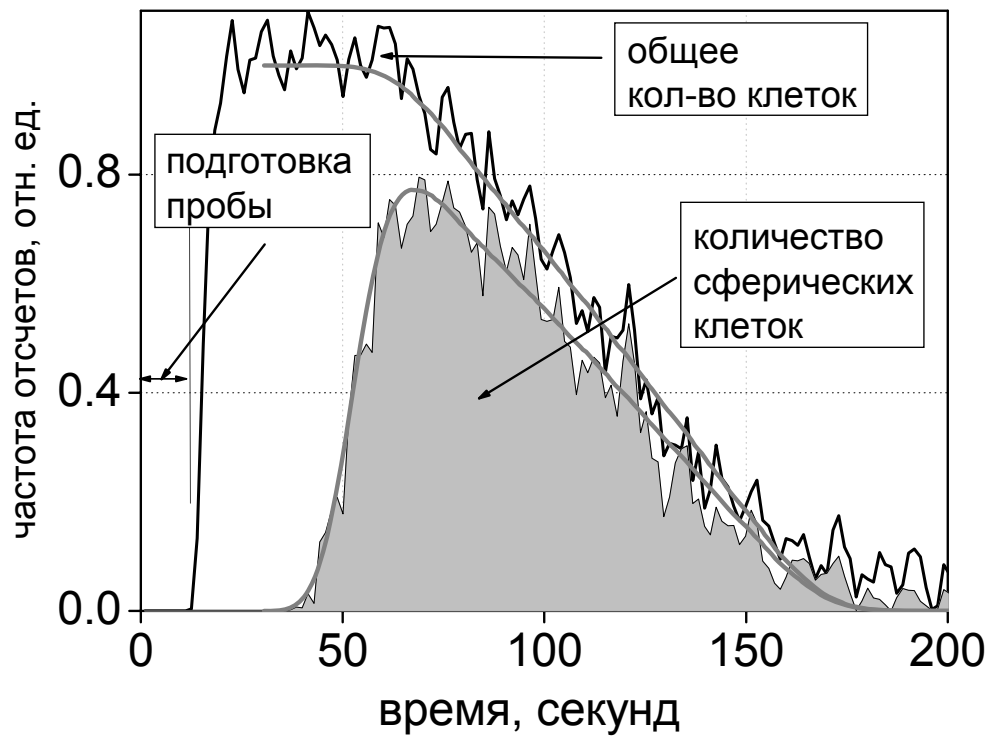


Рис. 11

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ЭКСПЕРТИЗЫ

(21) Заявка № 2007101151/15(001213) (22) Дата подачи заявки 10.01.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента 10.01.2007

 (85) Дата начала рассмотрения международной заявки на национальной фазе

ПРИОРИТЕТ УСТАНОВЛЕН ПО ДАТЕ

 (22) подачи заявки 10.01.2007 (23) поступления дополнительных материалов от
к ранее поданной заявке № _____ ОТ _____ (62) приоритета изобретения по первоначальной заявке № _____ ОТ _____,
из которой данная заявка выделена
 подачи первоначальной заявки № _____ ОТ _____,
из которой данная заявка выделена (66) подачи ранее поданной заявки № _____ ОТ _____ (30) подачи первой(ых) заявки(ок) в государстве-участнике Парижской конвенции

(31) Номер первой(ых) заявки(ок) (32) Дата подачи первой(ых) заявки(ок) (33) Код страны

1.

 (86) Заявка № РСТ/ (96) Заявка № ЕА (87) Номер публикации и дата публикации заявки РСТ

(72) Автор(ы) Мальцев В.П., Семьянов К.А., Тарасов П.А., RU

(73) Патентообладатель(и) Институт химической кинетики и горения СО РАН, RU, Общество с ограниченной ответственностью "Цитонова", RU

(54) Название изобретения СПОСОБ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗОВ КРОВИ И АНАЛИЗАТОР КРОВИ

(см. на обороте)

02	2	ДОМ 12.05.2008	150308
----	---	----------------	--------

ВНИМАНИЕ! С целью исключения ошибок просьба проверить сведения, приведенные в заключении, т.к. они без изменения будут внесены в Государственный реестр изобретений Российской Федерации, и незамедлительно сообщить об обнаруженных ошибках.