

НАМЕТКИ К ПЛАНУ РАБОТ ПО ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМ ЧИПАМ С МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ЧАСТЬЮ ДЛЯ АНАЛИЗА КРОВИ В РАМКАХ КОСМИЧЕСКОЙ ПРОГРАММЫ

Градов О.В.

ИНЭПХФ РАН, Лаб. 007

От: o.v.gradov@gmail.com

Дата и время отправки: 20 июл. 2015 г., 03:13

Тема сообщения:

Наметки к плану работ по гематологическим чипам для космонавтов

Наименование вложения:

Наметки к плану работ по крови для космической программы.pdf

Ответ: отказ

Полный текст документа (без иллюстраций)

Исходя из расширенного анализа литературы, составил план-конспект:

- 1) Прежде всего, чипы должны обеспечивать возможность работы в двух режимах – с обратимой дегидратацией (после высушивания, после доставки на землю – впрыск реагента через отдельный канал) и с длительным поддержанием гематокрита крови / целлокрита, т.е. с сохранением состояния форменных элементов, так как протеомы свежезятой, консервированной, неконсервированной крови качественно различны (соответственно, нужно обеспечить возможность впрыска гепарина, растворителей, разжижителей среды, детергентов и небелковых, т.е. не мешающих анализу, либо являющихся индикаторами состояния, консервантов).
- 2) Во-вторых, чипы должны быть центрифугируемыми как вкладыши гематокритной центрифуги и иметь возможность быть использованными в вертикальной фиксации как СОЭ-метры (измерители скорости оседания эритроцитов). Это необходимо для контроля крови как микрогетерогенной среды. Попытки рассматривать кровь чисто как гомогенную среду, характеризуемую одним только масс-спектрометрическим методом, обречены на провал, так как она – не-newтоновская жидкость с изменением локальной концентрации, эффективности экстрагирования и электрофореза (значит

и выделения с использованием PaperSpray) в зависимости от состояния / реологии. Нужно обязательно характеризовать образец по другим переменным, определяя его «анализопригодность в масс-спектрометрии» по отношению объема эритроцитов к объёму жидкой части крови, соотношению фракций белков плазмы, способности к гемокоагуляции / плазменному (вторичному) гемостазу.

- 3) В случае крови как совокупности разных типов клеток – форменных элементов, их разнообразие при аддитивном MS-анализе с использованием ESI-подобных техник неизбежно будет являться источником артефактов и ложноотрицательных выводов (в силу размывания химизма по выборке клеток). Протеом крови без учета клеток – средняя температура по больнице. Соответственно, как минимум, нужно обладать методами быстрого морфологического тестирования с использованием программы для распознавания образов с обучением на эталонных препаратах; как максимум – нужно проектировать чип сразу как клеточный сортер, т.е. заменитель проточного цитометра, широко используемого в зарубежной гематологической клинической и лабораторной практике. Технологии для этого у нас есть, так как выполненный на базе известного Вам завода образец чипа по топологии исходно разрабатывался для разделения клеток и микрочастиц (сортер на чипе). Программа для автоматизации распознавания образов клеток, обучаемая по эталонной выборке, была разработана А.В. Нотченко в 2012 году (см. нашу статью по лабораториям на чипе в «Журнале радиоэлектроники», 2 – 2012 [<http://jre.cplire.ru/mac/feb12/5/text.pdf>]).
- 4) В случае изучения крови на предмет содержания гемоглобина и пр., в особенности – в целях предупреждения анемий и функциональных биохимических сдвигов (что, в частности, было описано в экспериментальных полетах в 70-х гг.), целесообразно контролировать оптическую плотность на нескольких характеристических длинах волн (гемоглобинометрия с использованием элементарно вводимых в чип агентов и смежные методы). Помимо стандартного решения – подключения оптоволоконного световода с выводом на полихроматор (например – компактный спектрофотометр «Ocean Optics»), есть возможность простого и компактного решения на чипе. Если вместо матриц Байера поставить матрицы фильтров на соответствующий максимум – можно в форме фотометрии на КМОП-чипе производить гемоглобинометрию. На той же платформе с выводом на микросхему АЦП можно осуществлять в режиме реального времени электрохимические методы контроля крови (12 вариантов).

- 5) При изготовлении части стенок и канавок чипа из ионоселективного материала (я уже нашел потенциального изготовителя в РФ) или использовании структур ISFET (ионоселективных полевых транзисторов) можно при разделении плазмы крови от форменных элементов проводить измерение содержащихся неорганических ионов, не просто осуществляя тем самым анализ металломики и элементмики аналита, но и производя диагностику микроэлементозов и дефицитных состояний. Для космоса это – самое оно, так как, в частности, у космонавтов вымывается кальций, зачастую необратимо сдвигается ионный обмен, нарушается элементный статус и т.д. Нашел специалистов, которые готовы производить анализ по неорганическим элементам – с ними, получая данные по протеому масс-спектрометрически, можно будет весьма качественно характеризовать бионеорганическую химию тела человека при полете, а в качестве экспресс-тестов внедрить откалиброванные ими элементометрические гематологические лаборатории на чипе.
- 6) Так как морфология клеток в невесомости стремится к форме протопласта – сфере / телу вращения, но различным патологическим состояниям соответствуют различия в форме клеток (эллиптоцитоз, эхиноцитоз, стоматоцитоз и пр.), что, в частности, имеет место при железодефицитных состояниях / анемиях, для диагностики нужна модель поведения таких форм клеток в невесомости. Кроме того, показатели СОЭ в отсутствие земной гравитации нерелевантны, показатели гематокрита отчасти тоже нерепрезентативны после возвращения из микрогравитации в поле тяготения (если судить исходя из данных малочисленных работ). Стандартный подход не подходит – нужно доводить численные модели, используя труд сотрудников ИМПБ, ИТЭБ и др. В противном случае, будет недостаточно качественное разделение на фракции, с которых будет производиться эджекция вместо аддитивного PaperSpray-я.
- 7) Я вижу формат работы чипа следующим образом. С одного из концов чипа стилет-игла, с помощью которой осуществляется прокол и забор крови. После забора идет стадия подачи через вентиль с перекрытием для соблюдения стерильности. Затем, в соответствии со схемой известного чипа-прототипа, происходит разделение клеток по канавкам. После того, как в каждой канавке накапливается достаточно аналита – прибор готов к вставке в приемный модуль головы масс-спектрометра. Далее (как в известных чипах для Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip-MS system, объединяющих в HPLC-Chip II колонку разделения и компоненты наноэлектроспрея), разделенный в

теле чипа (сортере вместо хроматографической колонки) аналит подается с разных точек (видимых на схеме как круглые оконечные головки) на спрей с параллельной подачей жидкости, обеспечивающей смывание клеток в электрораспыляемую каплю. За счет наличия более сильного, чем есть у нас сейчас, микроскопа на ESI-голове можно контролировать и регулировать подачу, строя векторные поля PIV / LDV.

- 8) Список приборов для проекта: перистальтические насосы программируемые 2 шт., пневматический микроинъектор + микроманипулятор пневматический (в наименее благоприятном случае – механический). Все остальное я попытаюсь достать сам – в случае, если проект благожелательно пройдет экспертизу.
- 9) Интересные ответвления проекта, которые могут возникнуть. Дегидратация многих биожидкостей в контролируемых условиях имеет существенное диагностическое и научное значение. Существуют специальные упрощенные чипы для этого. Введены (не нами, также, как и упрощенные чипы) термины «тезиограммы дегидратации», «кристалломика» и пр., которые говорят о диагностической ценности дегидратации в контролируемых условиях. Однако достижение таких условий достаточно тяжело достижимо вне единого неупрощенного термостатируемого чипа. Если произвести масс-спектрометрический анализ крови при дегидратации в «хороших» и «плохих» условиях, то результаты будут качественно различными, так как разные популяции клеток уйдут в разные «фазы» или сегментированные фазии капли. Поэтому, если в перспективе планируется использование не только прямой биохимии, морфомики и электрофизики, но и форм дегидратации как диагностических дескрипторов или предикторов, то нужно будет изучить формы дегидратации в чипе, оптимизировать топологию для реализации идеологии неразрушающего контроля (без артефактов в результате разрушения неправильным хранением, неправильной дегидратацией) и, в перспективе, апробировать в условиях микрогравитации. Ясно с соавторами уже немало времени продвигает автоволновую модель дегидратации капель, в ЦФ РАН рассматривают термо-, фото- и СВЧ- индуцированные технологии дегидратации. В связи с этим, возможно, удастся найти неразрушающий, но эффективный индуктор дегидратации крови – например NIR, при котором препарат в чипе будет сохранен в сравнительно достоверном состоянии. Есть ряд наблюдений по изменению этого процесса в разных атмосферах и климатических условиях. Сейчас у нас в комнате есть климатическая газонаполнимая камера, взятая для этих целей. Изучение этого

даст возможность говорить о применимости атмосферного / газо-атмосферного ESI и MALDI (последний с высушиванием прямо на подложке-матрице) для измерения достоверных концентраций реальных белков. Я уже нашел биологов, которые нам готовы безвозмездно в этом помочь (только за соавторство в статье). Соединением морфометики морфологии биологических жидкостей («белковых тел») и протеометики можно достигнуть доселе не применявшейся в космической медицине новизны и полноты морфобиохимического анализа.

Задел в этой области (3 наиболее важные из 10 работ):

1. Notchenko A.V., Gradov O.V. Elementary Morphometric Labs-On-a-Chip Based on Hemocytometric Chambers With Radiofrequency Culture Identification and Relay of Spectrozonally Histochemical Monitoring. *Visualization, Image Processing and Computation in Biomedicine*. DOI: [10.1615/VisualizImageProcComputatBiomed.2013005968](https://doi.org/10.1615/VisualizImageProcComputatBiomed.2013005968), Vol. 2 (2013)
2. Нотченко А.В., Градов О.В. Элементарные морфометрические лаборатории на чипе на основе гемоцитометрических камер с радиочастотной идентификацией культур и трансляцией спектрозонально-гистохимического мониторинга. *Журнал радиоэлектроники*, Вып. 2 - 2012, Печатный объем: 27 стр. [URL: <http://jre.cplire.ru/jre/feb12/5/text.pdf>]
3. Notchenko A.V., Gradov O.V. A Five-Axis Arm-Manipulator Laser System & an Algorithm for Digital Processing of Output Data for Recording and Morpho-Topological Identification of Cells and Tissue Structures. *Visualization, Image Processing and Computation in Biomedicine*. DOI: [10.1615/VisualizImageProcComputatBiomed.2013005967](https://doi.org/10.1615/VisualizImageProcComputatBiomed.2013005967), Vol. 2 (2013)