

УДК 528.87 + 535.8 + 621.378

Дж. Ладеманн, Х.-Дж. Вайгманн, Х. Кайзеветтер, В. Стерри,
А. В. Приезжев, Н. Н. Фирсов

(Берлин, Германия – Москва, Россия)

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ АГРЕГАЦИИ И ДЕЗАГРЕГАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ В ПОТОКЕ КРОВИ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ*

Явления агрегации и дезагрегации эритроцитов отражают патологические состояния человеческого организма. Кинетика агрегационных и дезагрегационных процессов в образцах человеческой крови, помещенных в коаксиальной цилиндрической системе, исследуется спектроскопическими методами. Аналогичная технология используется для диагностики диабетических и тромбозных заболеваний.

Введение. Мембраны эритроцитов покрыты различными макромолекулами, подобными белкам фибриногена, α_2 -макроглобулина и иммуноглобулина, которые являются чувствительными маркерами физического состояния человеческого организма. Эти молекулы влияют на агрегационные и дезагрегационные свойства эритроцитов. Были предприняты попытки использования агрегационных свойств эритроцитов для медицинской диагностики [1–7]. Существует возможность создания различных образцов агрегатов, соответствующих патологическим состояниям. Эритроциты, обычно имеющие диаметр около 7 мкм, могут образовывать агрегаты диаметром до 500 мкм. Сравнение типичных агрегационных форм эритроцитов, которые следует принимать во внимание, представлено на рис. 1.

Методы спектроскопии могут использоваться для исследования процесса агрегации и выявления различных форм агрегатов. Изучаемые образцы крови должны иметь объем, соответствующий линейному разме-

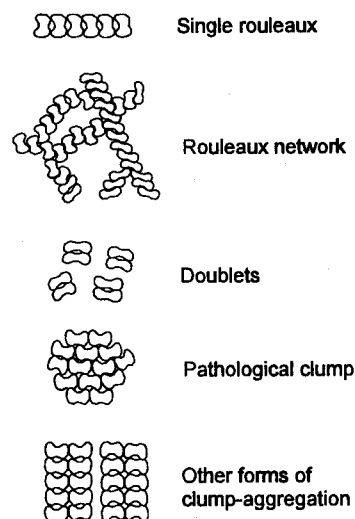


Рис. 1. Агрегатные формы эритроцитов

* Работа поддержана Федеральным министерством науки и технологий (BMFT) Германии (проект № 13N7154).

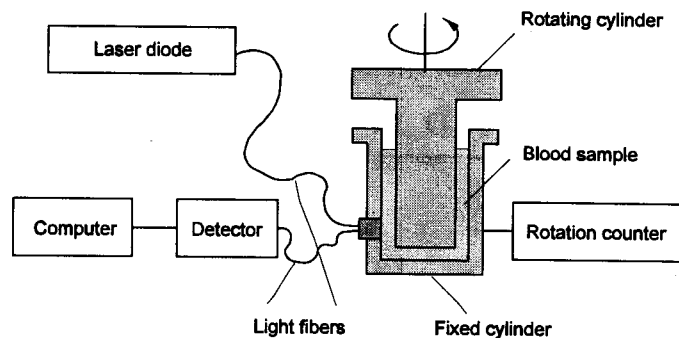


Рис. 2. Экспериментальная установка для исследования свойств агрегации и дезагрегации образцов цельной крови человека

ру не менее 0,5 мм, для того, чтобы произошла полная агрегация. Для исследований и измерений пробы крови должны быть разбавленными [8]. В представленной работе для анализа образцов крови здоровых доноров и пациентов, страдающих диабетом и тромбозами, использовалась коаксиальная система вращающихся цилиндров (система Куэтта).

Экспериментальная установка и подготовка образцов. Схема экспериментальной установки для исследований и измерений агрегации и дезагрегации показана на рис. 2. Она представляет коаксиальную систему с вращающимся цилиндром. Образцы крови помещаются в зазор размером 1 мм между цилиндрами. Фиксированный внешний цилиндр прозрачен для видимого лазерного излучения. Он сделан из стекла или плексигласа. Шаговый двигатель, вращающий внутренний цилиндр, контролируется компьютером. Поверхность внутреннего цилиндра имеет светоотражающее покрытие. Для облучения образцов крови используется полупроводниковый лазер с длиной волны 780 нм. Лазерный свет направляется оптическим волокном к поверхности внешнего цилиндра. Второе оптическое волокно, закрепленное непосредственно вблизи лазерного облучающего световода, собирает свет, рассеянный от образца крови. Рассеянный свет детектируется фотодиодом, соединенным с приемным оптическим волокном. Измерения проводились с образцом крови объемом 5 мл, взятым у добровольца или пациента из подлокотной вены и стабилизированным с помощью ЕДТ-кислоты (этилендиаминтриацетатовой кислоты).

Скорость вращения внутреннего цилиндра увеличивается до предельной величины 750 1/с в течение 5 с после того, как образец крови заполнит щель между цилиндрами. За это время агрегаты эритроцитов разрушаются полностью. Затем вращение резко прекращается и начинается агрегация. Рассеянный (ремиссионный) сигнал в этом случае уменьшается. Изменения рассеянного сигнала измеряются до момента, когда он достигает постоянного уровня, означающего, что новые агрегаты полностью сформированы. Следовательно, для измерений необходимо время ~2 мин. Когда агрегаты сформируются, вращение постепенно увеличивается до полной дезагрегации. С увеличением скорости вращения рассеянный сигнал растет. Максимум сигнала достигается при полном разрушении эритроцитов.

Если вращение прекращается, процесс агрегации начинается снова. Эта процедура агрегации и дезагрегации может повторяться несколько раз с одним и тем же образцом крови. Типичная кинетика процессов агрегации и дез-

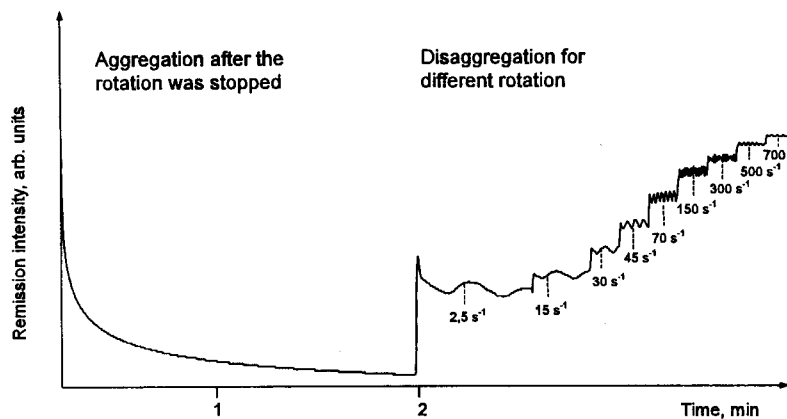


Рис. 3. Характеристика агрегации и дезагрегации образца крови здорового добровольца за полный цикл измерений

агрегации образца крови здорового донора за один цикл измерения представлена на рис. 3.

Типичные характеристики измеряемых параметров. Первый участок кривой, представленной на рис. 3, характеризует процесс агрегации эритроцитов. Две линии с различными наклонами аппроксимируют ее, если интенсивность рассеянного сигнала графически показана в полулогарифмическом масштабе. Наклон линий характеризуется углами α_1 и α_2 . Параметры $T_1 = \text{ctg}\alpha_1$ и $T_2 = \text{ctg}\alpha_2$ коррелируют со временем образования малых и больших агрегатов. Кинетика процесса агрегации описывается функцией

$$I_a = C_1 e^{-t/T_1} + C_2 e^{-t/T_2} + C_3.$$

Здесь I_a – амплитуда аргумента; T_1, T_2 – характеристические времена образования линейного и трехмерного агрегатов; t – время; C_1, C_2, C_3 – константы.

По аналогии с процессом агрегации анализируется кинетика дезагрегации. При увеличении скорости вращения задаются интервалы, внутри которых значение скорости выдерживается постоянным. На этих временных интервалах при заданном значении скорости регистрируется интенсивность рассеянного света. Полученная связь между сигналом ремиссии и скоростью распада отображается кривой, как и в случае кинетики агрегации. Характеристические параметры β_1 и β_2 соответствуют устойчивым состояниям больших и малых агрегатов:

$$I_d - I_r = C_4 e^{-\gamma/\beta_1} + C_5 e^{-\gamma/\beta_2}.$$

Здесь γ – скорость распада; I_d и $I_{\gamma=0}$ – амплитуды дезагрегации; β_1 и β_2 – коэффициенты гидродинамической устойчивости больших и малых агрегатов; C_4 и C_5 – константы. Отметим, что величина сигнала ремиссии, соответствующая скорости 2,5 1/с, выбрана в качестве параметра, характеризующего устойчивость самых больших агрегатов.

Обсуждение результатов. *Определение параметров, влияющих на измерение ремиссии.* В первой серии экспериментов исследовалось влияние различных параметров на результаты измерений. Эксперименты должны были установить, отражаются ли процессы седиментации на результатах измере-

ния ремиссии. Образец крови помещался в зазор между цилиндрами, и ремиссионный сигнал измерялся без какого-либо вращения цилиндра. Оптический волоконный датчик позиционировался непосредственно вблизи поверхности исследуемого образца крови. Было установлено, что седиментация не влияет на сигнал ремиссии в течение всего временного интервала измерения процесса агрегации.

Изменение температуры от 28 до 37 °С не влияет на измерения, тогда как влияние степени оксигенизации зависит от используемой длины волны. Это влияние исключается, если при измерениях выбирать длину волны вблизи точки, соответствующей наилучшей чувствительности [9].

Влияние численной концентрации красных кровяных телец в крови на ремиссионный сигнал и соответственно на характеристические параметры исследовалось путем анализа специально подготовленных образцов крови от одного и того же добровольца при различных показаниях гематокрита (численной концентрации красных кровяных телец). Серии измерений повторялись шесть раз с шестью различными здоровыми донорами. Результаты представлены на рис. 4. Показана зависимость параметров α_1 , α_2 , β_1 , β_2 и $I_{2,5}$ от значений гематокрита. Особенно сильно концентрация эритроцитов влияет на параметры β_1 , β_2 и $I_{2,5}$.

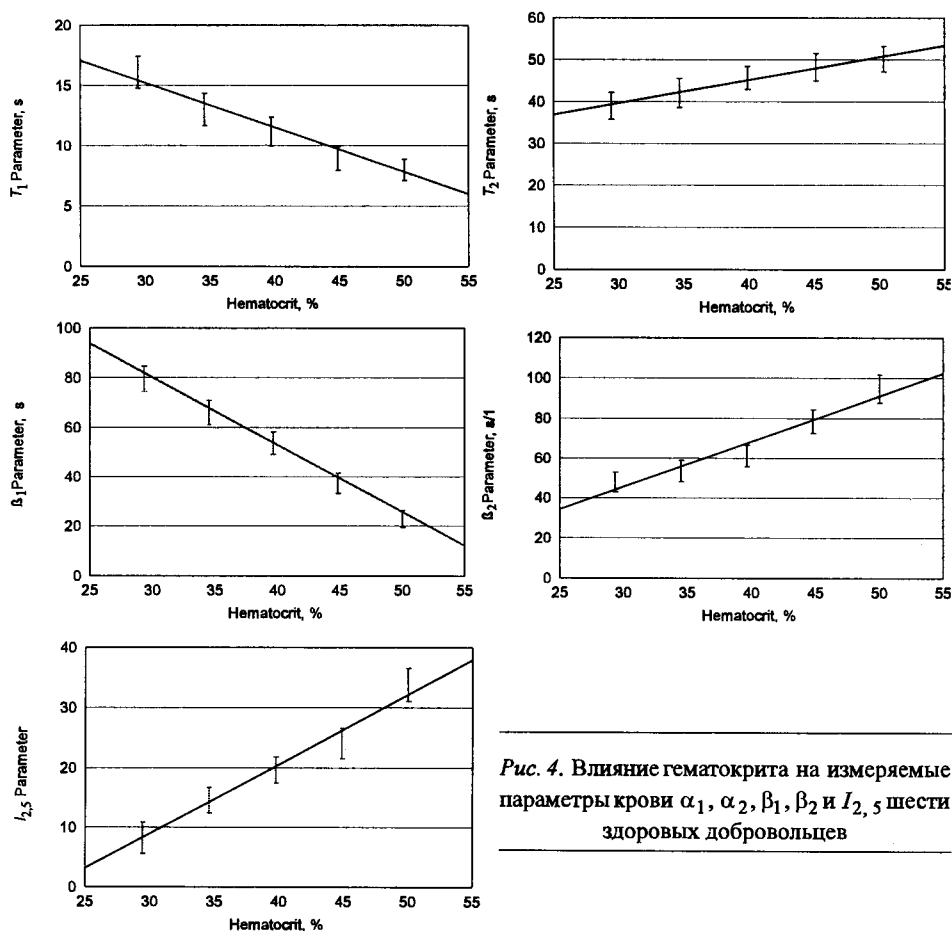


Рис. 4. Влияние гематокрита на измеряемые параметры крови α_1 , α_2 , β_1 , β_2 и $I_{2,5}$ шести здоровых добровольцев

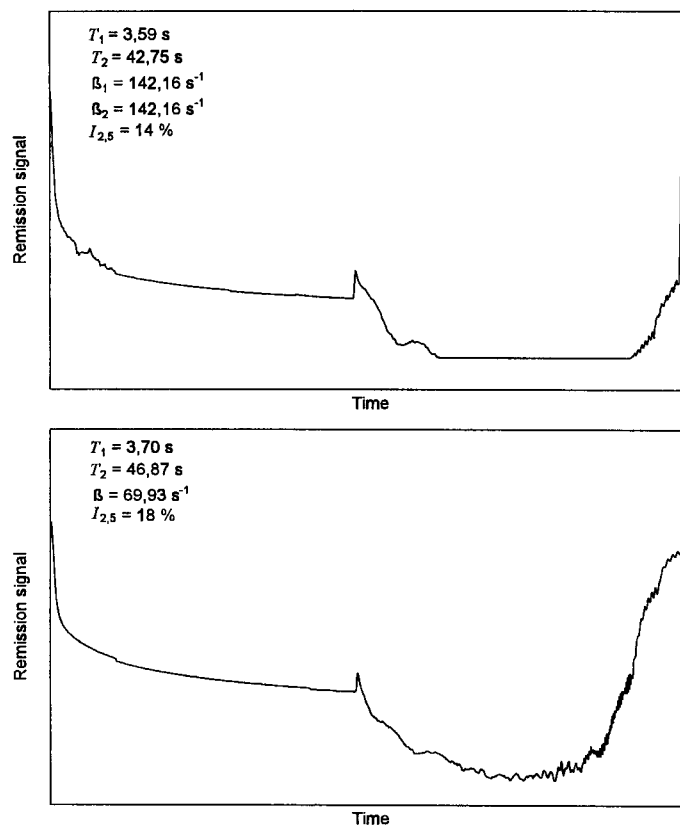


Рис. 5. Экстремальные изменения кинетики процессов агрегации и дезагрегации образцов крови пациентов, страдающих раковыми заболеваниями

Вследствие влияния концентрации эритроцитов в образцах крови на характеристические параметры агрегации и дезагрегации измерения выполнялись при постоянной величине показаний гематокрита, равной 40 для всех образцов. Концентрация красных кровяных телец поддерживалась стабильной на уровне 40 % при 37 °С за счет разбавления содержимого ячейки в плазме, взятой у одной и той же особи.

Измерение агрегации и дезагрегации образцов крови пациентов, страдающих различными заболеваниями. Р а к. Тяжелые патологические состояния больных раком четко отражались на характерных параметрах процессов агрегации и дезагрегации эритроцитов. На рис. 5 показаны два полных цикла измерений агрегационных и дезагрегационных характеристик образцов крови таких пациентов. Видно, что кинетика агрегации и особенно дезагрегации существенно меняется в сравнении со здоровыми донорами.

Д и а б е т. При других заболеваниях, подобных диабету, изменения в кинетике процессов агрегации и дезагрегации не носили столь явно выраженного экстремального характера. На рис. 6 приведено сравнение кинетики агрегации и дезагрегации образцов крови здорового добровольца и пациента, страдающего диабетом.

Для статистической оценки образцов крови шести здоровых доноров и шести пациентов, страдающих диабетом, выполнен сравнительный анализ характеристических параметров. Показания гематокрита поддерживались

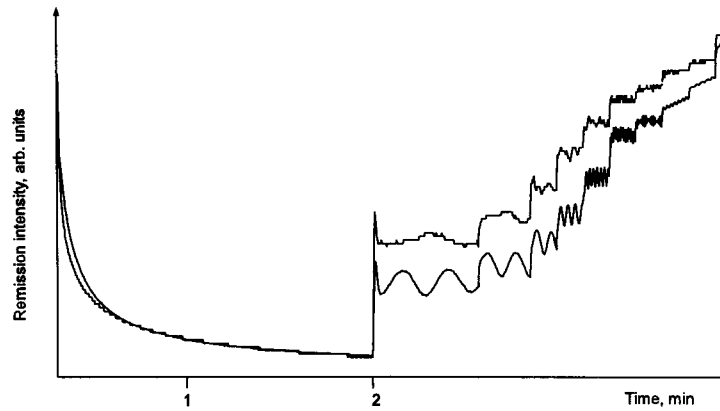


Рис. 6. Сравнение кинетики агрегации и дезагрегации образцов крови здорового добровольца и пациента, страдающего диабетом

на уровне 40 для всех образцов крови. Каждая проба крови измерена дважды. Разница в значениях характерных параметров меньше 5 % для каждой пары измерений. Часть образцов крови исследовалась в реологической лаборатории, где определялось содержание глюкозы. Концентрация глюкозы варьировалась от 120 до 180 мг/дл для шести исследованных проб крови. Концентрация глюкозы у здоровых доноров не превышала 75 мг/дл.

Результаты измерений в обобщенном виде представлены на рис. 7. Как видно из рисунка, значения всех параметров сравниваемых проб крови здоровых доноров и больных диабетом существенно отличаются. Эти параметры за исключением β_1 для больных диабетом существенно меньше. Разница в значениях T_1 и T_2 и почти одинаковые величины β_1 и β_2 являются характерной особенностью проб крови для пациентов-диабетиков.

Тромбозы возникают обычно как следствие других видов заболеваний. По-видимому, этим объясняется широкий разброс зарегистрированных значений параметров α_1 , α_2 и $I_{2,5}$. По контрасту величины параметров β_1 и β_2 являются специфическими в случае тромбозов. Значения их приблизительно одинаковы и не превышают 40 1/с.

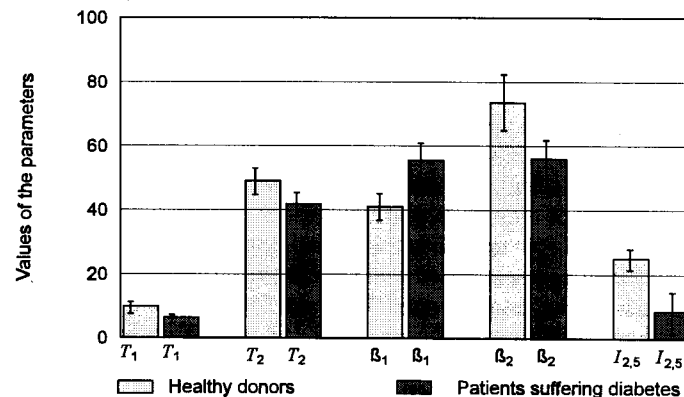


Рис. 7. Параметры агрегации и дезагрегации проб крови здоровых доноров и пациентов, страдающих диабетом

Заключение. Агрегационные и дезагрегационные свойства образцов крови человека могут использоваться для диагностики физического состояния пациентов. Анализ кинетики агрегации и дезагрегации должен выполняться в системах, не нарушающих образования сложных агрегатов эритроцитов. На формирование агрегатов эритроцитов влияют несколько внешних параметров. Используя двухцилиндрическую коаксиальную систему с вращением одного из цилиндров, можно выявить различие между образцами крови здоровых доноров и пациентов, страдающих диабетом.

Авторы выражают благодарность миссис Хайк Рихтер и миссис Сабине Шанцер из Университета Гумбольдта в Берлине за техническую поддержку, а также нашим коллегам Л. А. Кварталнову и И. В. Сирко из Российского государственного медицинского университета в Москве за помощь в эксперименте и полезные обсуждения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hahn A., Roggan A., Schädel D. // Minimal Invas Med. 1996. 7. P. 79.
2. Jung F. et al. // Biomed. Techn. 1992. 32. P. 117.
3. Donner M., Stolz J. F. // Biorheology. 1988. 25. P. 367.
4. Potron G., Jolly D., Nguyen P. et al. // Nouv. Rev. Fr. Hematol. 1994. 36. P. 241.
5. Hardeman M. R., Goedhard P. T., Dobbe L. G. G., Lettinga K. P. // Clinical Hemorheology. 1994. 14(4). P. 605.
6. Priezzhev A. V., Ryaboshapka O. M., Firsov N. N. // SPIE-series. 1997. 2678. P. 342.
7. Priezzhev A. V., Firsov N. N., Ryaboshapka O. M., Sirko I. V. // SPIE. 1994. 2100. P. 195.
8. Firsov N. N., Priezzhev A. V., Ryaboshapka O. M., Sirko I. V. // Proc. SPIE. 1993. 1884. P. 283.
9. Lademann J., Weigmann H.-J., Sterry W. et al. // J. Laser. Phys. 1999. 9(1). P. 357.

*Университетская клиника Шарите, Берлин;
Университет Гумбольдта, Берлин;
Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова;
Российский государственный
медицинский университет,
E-mail: AVP@ibp.ilc.msu.su*

*Поступила в редакцию
17 марта 2000 г.*