

ЭРИТРОЦИТЫ В СДВИГОВОМ ПОТОКЕ: МЕХАНИЗМЫ ДЕФОРМИРУЕМОСТИ, МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЙ, МЕДИЦИНСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

Свербиль В. П., Захаров С. Д.

В работе рассмотрены современные представления о физиологической роли деформируемости эритроцитов человека и молекулярных механизмах, обеспечивающих это уникальное свойство. Представлен обзор методов измерения данного параметра. Приведено описание принципа действия нового устройства для измерений динамики деформируемости, которое моделирует условия движения красных клеток в организме, и дан пример его практического применения в клинике

Для согласованной работы клеток организма необходим постоянный приток энергии, из-за чего основная масса потребляемых питательных веществ идет на воспроизводство универсальных носителей биологической энергии – молекул аденозинтрифосфата. Исходные реагенты аэробной энергетики – молекулы кислорода и моносахаридов доставляются в клетки током крови. Их транспортировка и обратный перенос отходов жизнедеятельности клеток происходит не равномерно по всей кровеносной системе, а только в местах максимальных сужений – капиллярах. При этом кислород поступает в тканевые клетки из эритроцитов, а сахара – из плазмы крови. Транскапиллярное движение эритроцитов – критическое звено функционирования энергетики организма. В большинстве случаев первопричиной нарушений проходимости эритроцитов является не уменьшение просвета капилляров, а ухудшение эластичности красных клеток. Это неизбежно ведет к кислородному голоданию организма. Целью данного сообщения является моделирование движения эритроцитов в сдвиговом потоке и разработка метода измерений их деформируемости в условиях клиники.

Диаметр диска эритроцитов (~ 8 мкм) больше просвета капилляров (3-7 мкм). Двояковогнутая форма клетки, соответствующий запас площади поверхности по сравнению с аналогичным параметром сферы эквивалентного объема и отсутствие внутриклеточных поперечных тяжей – микротрубочек и микрофиламентов, позволяет эритроцитам удлиниться в одном направлении и сжиматься в двух других под действием механических сил. Такими силами в кровеносной системе являются сдвиговые напряжения потока. Артериальное давление «втискивает» красные клетки в капилляр одну за другой как поршень, вынуждая их сильно деформироваться. Многократная деформация не наносит ущерба выполнению эритроцитами своих функций благодаря специфической структуре мембраны. Прочность мембраны обеспечивается подмембранной сеткой из длинных и относительно гибких нитей белков спектрина и актина (рис. 1), тогда как содержимое цитоплазмы (раствор гемоглобина) ведет себя подобно жидкости, не препятствуя деформациям.

Легкость деформаций имеет и обратную сторону. Небольшие изменения параметров жидкой фазы крови, таких как значение pH , температура, наличие лекарственных соединений некоторых типов, воздействуя на мембрану, приводит к потере (обратимой) деформируемости эритроцитов. Они перестают проникать через самые узкие

капилляры, направляются через «шунты» (анастомозы), артериальное давление повышается и начинается гипоксия. В хронических случаях ужесточение эритроцитов становится необратимым, они преждевременно подвергаются гемолизу, в организме развиваются патологические процессы. Все эти обстоятельства объясняют повышенный интерес биофизиков и врачей-исследователей к деталям молекулярной динамики, обеспечивающим гибкость красных клеток, и методам оперативного контроля деформируемости, особенно в условиях клиники.

Механизм деформируемости эритроцитов, по-видимому, имеет энтропийную природу[1-3]. Суть предложенной гипотезы состоит в следующем. В покоящейся клетке длинные спектриновые нити занимают наиболее энергетически выгодную пространственную конфигурацию, самопроизвольно сворачиваясь в клубки. С приложением нагрузки клубки разворачиваются, и конформационная энтропия понижается. При этом клетка деформируется, сохраняя площадь мембраны практически постоянной. После снятия сдвиговой нагрузки процесс повторяется в противоположном направлении, и эритроцит принимает прежнюю форму.

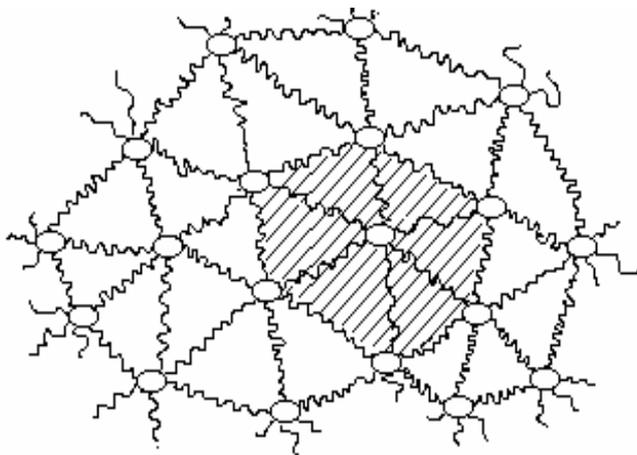


Рис. 1. Молекулы спектрина формируют гексагональную сетку, которая прикреплена к молекулам анкирина (эллипсы). Волнистыми линиями условно показана тенденция к образованию спектриновыми молекулами клубков («энтропийная пружина»)

Сведения о молекулярной структуре мембраны пока довольно ограничены и поступают, в основном, из данных электронной сканирующей и атомно-силовой микроскопии (ЭСМ и АСМ) [4,5]. При ЭСМ мембрану приходится полностью растягивать; тогда регистрируют гексагональную сетку (степень связности 6) из правильных треугольников со стороной 200 нм. При АСМ мембрану не растягивают, но регулярность теряется; степень связности от 3 до 4, размер ячейки 40-60 нм. Получаемые изображения зависят от способа приготовления образцов и метода измерений, а интерпретация структуры неоднозначна. Тем не менее, общие представления о постулированном механизме деформируемости красных клеток находят в этих данных подтверждение. Важная дополнительная информация ожидается в ближайшее время, когда будет начато измерение динамики деформируемости на нативных клетках.

При анализе способов измерений деформируемости обычно различают прямые и косвенные методы [6] (рис. 2). "Прямые" методы включают измерения деформаций мембраны при различных способах закрепления эритроцита в поле зрения микроскопа и при различных вариантах действия на него сдвигового напряжения. К ним относятся методы втягивания мембраны в микропипетку и растяжения эритроцита, закреплённого на несилеконизированном стекле. При этом изучают как механические свойства эритроцита, так и их корреляции с другими факторами – размерами клеток, типом гемоглобина, возрастом и т.п. Достоинствами прямых методов являются возможность анализа вязко-упругих свойств единичной клетки как целостной конструкции и простота интерпретации полученных результатов.

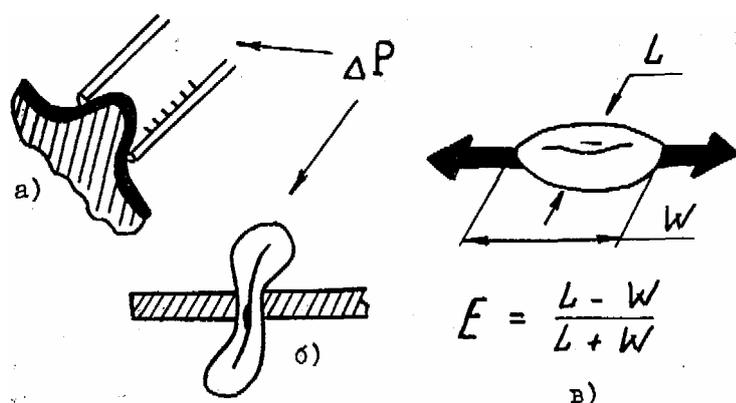


Рис. 2. Методы измерения деформируемости эритроцитов: а) втягивание мембраны в микропипетку; б) протискивание через микропоры; в) растяжение эритроцита в сдвиговом потоке

Пропускание эритроцитарной суспензии сквозь искусственный капилляр малого диаметра, или продавливание заданного объема суспензии через микропористый фильтр (метод фильтруемости) относится к косвенным методам. Минимальный диаметр трубки, по которому может проходить эритроцит человека, легко принимающий форму цилиндра, составляет 3 мкм, а гидравлическое сопротивление при этом почти не превышает сопротивления чистой плазмы. Регистрируемыми параметрами, определяющими деформируемость эритроцитов, является "скорость фильтрации", "время полуфильтрации" и другие, называемые показателями "фильтруемости".

Достоинствами косвенных методов является то, что непосредственно из измерений определяется способность клеток "протискиваться" по капиллярам периферийной кровеносной системы и, тем самым, оценивается способность эритроцитов снабжать ткани и органы кислородом. Благодаря существенному упрощению измерительной аппаратуры, "косвенные" методы до сих пор применяются в некоторых медицинских центрах и исследовательских лабораториях, занимающихся проблемами реологии крови. Однако интерпретация получаемых результатов и их связь с деформацией конкретных клеточных структур в данных измерениях весьма затруднена. Наблюдается сильная зависимость от объёма клетки, её формы, распределения эритроцитов по размерам. Серьёзным недостатком "косвенных" методов является частое засорение пор слабдеформируемыми эритроцитами.

Отметим, что все перечисленные способы определения деформируемости эритроцитов являются контактными, что сопряжено с риском неконтролируемых клеточных изменений и искажения результатов измерений. Например, при оседании эритроцитов на несиликонизированную стеклянную подложку возможно спонтанное изменение формы клетки: дискоцит через некоторое время превращается в сферу с шипиками на поверхности (сферозхиноцит). В микроаспираторном методе на входе в микропипетку может происходить компрессия мембраны на кромке и даже проскальзывание. При "протаскивании" клеток через капилляры и микропоры может происходить трансформация формы эритроцитов. Таким образом, в перечисленных методах имеет место нефизиологический характер силового воздействия на клетки и условий наблюдения клеточной реакции.

Особое место занимает метод определения деформируемости эритроцитов, в котором в качестве приложенной нагрузки используется напряжение сдвига, действующее на клетки, движущиеся в сдвиговом потоке, а в качестве регистрируемого параметра – удлинение эритроцитов. Он относится к "прямым" методам, и обладает рядом преимуществ: бесконтактностью регистрации, физиологичностью силового воздействия. Известно несколько различных устройств, реализующих указанный способ. В реоскопе (*Rheoscope*) создаётся течение Куэтта в зазоре между двумя прозрачными полированными пластинами, одна из которых имеет форму тупого конуса и вращается, а другая, плоская, покоится. Деформированные в сдвиговом потоке эритроциты фотографируют через микроскоп, и по их изображению на фотографии определяют относительное удлинение. К сожалению, данное устройство не обладает высокой точностью, что обусловлено замыканием краёв клетки на фотографии, сложностью конструкции и длительностью обработки результатов.

Вязкоупругие свойства эритроцитов можно охарактеризовать достаточно большим количеством экспериментально измеряемых величин; модуль изотермического сжатия мембраны (модуль Юнга), модуль сдвиговой упругости мембраны, показатель фильтруемости, а также удлинение клетки под действием сдвиговых напряжений. Абсолютного метода исследования деформируемости эритроцитов пока нет, но названные эксперименты дают правдоподобные сведения о свойствах эритроцита. Однако, многие данные, полученные различными методами, не согласуются друг с другом, что объясняется различным вкладом клеточных компонентов в регистрируемый параметр.

В последние два десятилетия самым точным в мире устройством для измерения деформируемости эритроцитов считается эктацитометр (*Ektacytometer*) (рис. 3). В нем использован оптический метод регистрации относительного удлинения клетки. Суспензия эритроцитов загружается в узкий зазор между двумя коаксиальными стеклянными цилиндрами оптического качества. Внешний цилиндр вращается относительно покоящегося цилиндра, создавая в зазоре течение чистого сдвига. В таком потоке эритроциты ориентируются своими дисками параллельно стенкам. Световой пучок от *He-Ne* лазера пересекает цилиндры по нормали к поверхности и рассеивается на клетках. За камерой на оси лазерного луча располагается анализатор, состоящий из маски, подвижной шторки и объектива, собирающего на фотоприемник всё рассеянное эритроцитами излучение. Картина рассеянного излучения в плоскости маски имеет форму дифракционного эллипса, повернутого на $\pi/2$ относительно удлиненной, ориентированной перпендикулярно лазерному лучу клетки. На большой и малой оси эллипса в маске

имеются два отверстия, расположенные на одинаковом расстоянии R от центра. Отверстия попеременно открываются с помощью подвижной шторки. Относительное удлинение клетки определяется по формуле: $\varepsilon = (I_1 - I_2) / (I_1 + I_2)$, где I_1 и I_2 – величины регистрируемых на фотоприемнике токов при различных положениях шторки. Расстояние R подбирается таким образом, чтобы соответствовать удлинению, измеряемому микроскопически в тех же условиях.

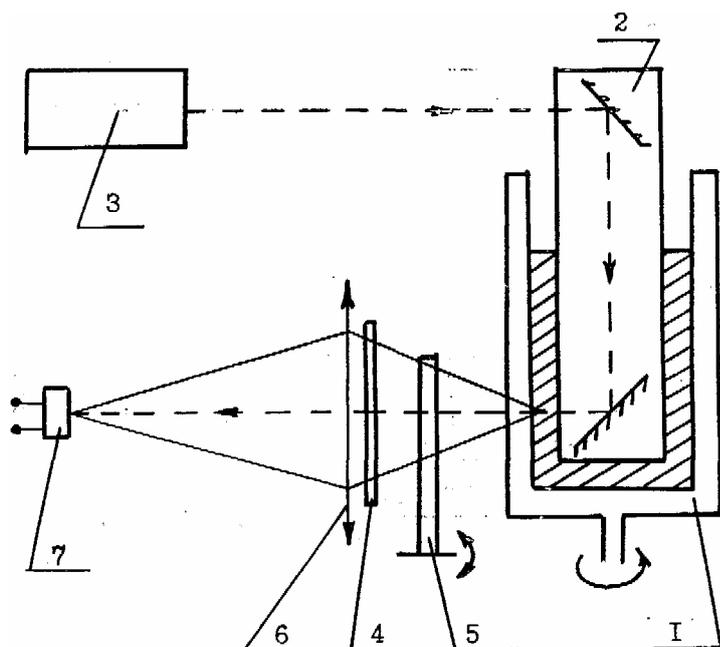


Рис. 3. Принципиальная схема эктацитометра. 1,2 – оптические коаксиальные цилиндры, 3 – лазер, 4 – маска, 5 – подвижная шторка, 6 – объектив, 7 – фотоприёмник

Метод эктацитометрии имеет ряд более поздних модификаций. Основным его достоинством является возможность бесконтактного определения удлинения клетки с высокой точностью. Однако, помимо конструктивной сложности, что лишило возможности использовать эктацитометр в клиниках, он имеет принципиальный недостаток. Измеренные с его помощью параметры соответствуют фиксированному стационарному режиму («что залито в зазор, то и даст одну цифру»). Динамические характеристики эритроцитов, представляющие наибольший практический и фундаментальный интерес, не могут быть исследованы. Например, невозможно наблюдать переходные режимы при воздействии на эритроциты физических факторов или химических препаратов. Время замены пробы велико, поэтому кинетика быстрых изменений, происходящих в крови пациентов, например, во время кризисов, врачу недоступна.

В Физическом институте разрабатывается новое поколение прецизионных анализаторов деформируемости эритроцитов (эрицифраскопы) для измерения в плоской проточной кювете (рис. 4) [7]. Эрицифраскоп позволяет видеть и записывать развитие реакции эритроцитов конкретного человека на физико-химические тесты в реальном времени, другими словами, бесконтактно исследовать переходные процессы в клетках. Для измерений используется принцип дифракции плоской монохроматической волны

на клетках. Пучок *He-Ne* лазера падает по нормали на плоскопараллельную оптическую кювету с зазором 130 мкм, в которой при заданной скорости сдвига ($700 \div 1100 \text{ с}$) протекает суспензия эритроцитов. При напряжении сдвига $7 \div 11 \text{ дин/см}^2$, что близко к физиологическим значениям в кровеносных капиллярах, все эритроциты ориентируются в кювете по потоку параллельно ее стенкам и удлиняются вдоль потока. В отличие от эритроцита, скорость потока в плоской кювете неодинакова в поперечном направлении: у стенок скорость минимальна, а в середине максимальна. Несмотря на это, эритроциты удается ориентировать и направить в очень узкий слой, промежуточный между стенкой и центром.

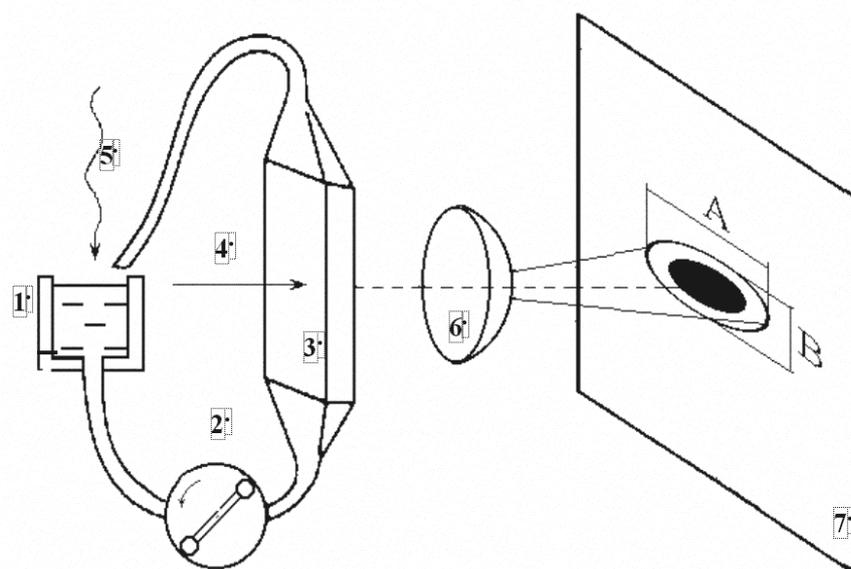


Рис. 4. Принцип эридифраксии: 1 – смеситель, 2 – перистальтический насос, 3 – проточная оптическая кювета, 4 – лазерный луч, 5 – внешнее воздействие, 6 – объектив, 7 – экран

Излучение, рассеянное на эритроцитах (режим однократного рассеяния) попадает на расположенный вдоль оси лазерного луча объектив, который отображает его в виде дифракционной картины на матовом экране в фокальной плоскости этого объектива. Если эритроциты, находящиеся в зазоре кюветы, деформированы, то первый дифракционный минимум имеет эллиптическую форму, причём его полуоси однозначно связаны с полуосями деформированной клетки. Таким образом, по первому дифракционному минимуму определяют параметр удлинения $\varepsilon = (a-b)/(a+b)$, где a и b – большая и малая полуоси "дифракционного" эллипса. На рис. 5, для примера, показаны дифракционные картины деформированных под действием сдвиговых напряжений (11 дин/см^2) и недеформированных (обработанных глутаровым альдегидом) эритроцитов. В первом случае $\varepsilon = 0,40$, во втором – 0.

Существенным элементом эридифраксопа является термостатированный смеситель. Помимо чисто утилитарного назначения (заливка суспензии) он выполняет важную функцию, которой недоставало в прежних приборах. Контур заполняется таким образом, чтобы в смесителе всегда присутствовала большая часть объема всей суспензии. Другими словами, эритроциты очень быстро проходят через тонкую кювету и медленно через смеситель, благодаря чему устройство становится открытым. Через смеси-

тель теперь возможно осуществлять ввод различных физических и химических факторов (оксигенация-деоксигенация, СВЧ, лазерное излучение, магнитное поле, введение лекарств и т.д.) и регистрировать переходные процессы в реальном времени с задержкой несколько секунд.

Все эти особенности эридифраскопа обеспечивают ему существенные преимущества и создают необходимые предпосылки для проведения широкой программы исследований и практических применений в медицинской диагностике.

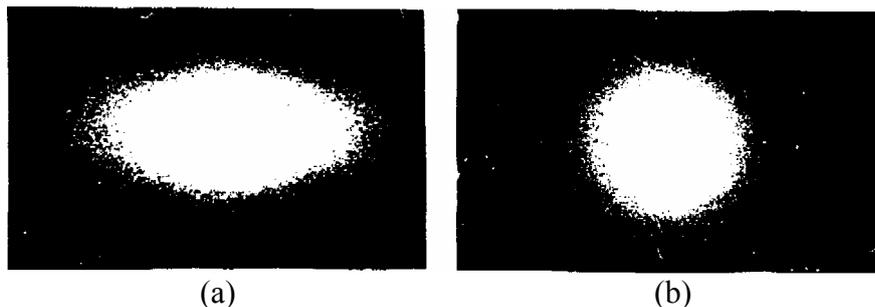


Рис. 5. Дифракционные картины деформированных (а) и недеформированных (б) сдвиговым потоком эритроцитов

Рис. 6 иллюстрирует применение эридифраскопа в клинических исследованиях при отработке оптимального режима физиотерапевтического лечения заболеваний ишемической болезни сердца – внутривенного лазерного облучения крови на конкретном пациенте в городской клинической больнице № 13 (Москва). Курс состоял из 5 процедур, проводимых через день. Анализ кинетики деформируемости во время облучения по ходу каждой процедуры и итоговые данные показывают, что к концу курса деформируемость эритроцитов больного заметно улучшилась. Общее улучшение было подтверждено стандартными тестами и самим пациентом.

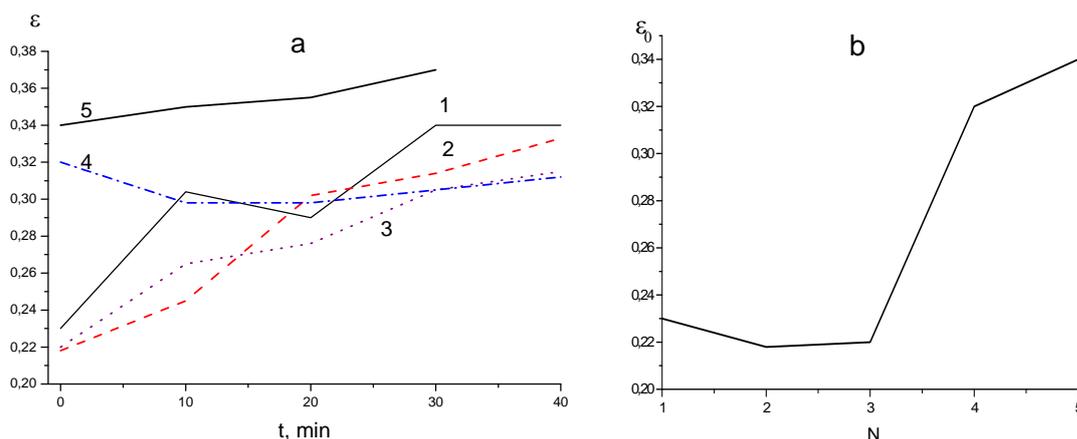


Рис. 6. Динамика деформируемости эритроцитов крови (пациент В-в, ишемическая болезнь сердца) во время проведения курса внутривенной лазерной терапии крови; *He-Ne* лазер, 632,8 нм, 1 мВт.

а) Изменения $\epsilon(t)$ во время последовательных лазерных процедур 1 –5 (через день).

б) Итоговые изменения начальной деформируемости $\epsilon_0(t)$ по всему курсу; по горизонтальной оси указан номер процедуры

Работа поддержана ДЦ «Деловой мир» и Фондом поддержки малого предпринимательства РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С.Д. Захаров. Энтропийная упругость живой клетки (эритроцита). Краткие сообщения по физике ФИАН. 1986. №2. С. 1-3.
2. М.М. Kozlov, V.S. Markin. Model of red blood cell membrane skeleton: Electrical and mechanical properties. J. Theor. Biol.. 1987. Vol. 129. P. 439-452.
3. A. Elgsaeter, B.T. Stokke, A. Mikkelsen, D. Branton. The molecular basis of the erythrocyte shape. Science.1986. Vol. 234. P.1217-1223.
3. A. H. Swihart, J. M. Mikrut, J. B. Ketterson, R. C. Macdonald. Atomic force microscopy of the erythrocyte membrane skeleton. Journal of Microscopy. 2001. Vol. 204, P.212-225.
4. S. Paramore, G. S. Ayton, D. T. Mirijanian, and G. A. Voth. Extending a spectrin repeat unit. I: Linear force-extension response. Biophys. J. 2006. Vol. 90. P.92-100.
5. С.А. Сторожок, А.Г. Санников, Ю.М. Захаров. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. Изд-во Тюменского университета, Тюмень. 1997, 140 С.
6. S.D. Zakharov, A.V. Ivanov. Light-oxygen effect as a physical mechanism for activation of biosystems by quasi-monochromatic light (a review). Biophysics. 2005. Vol.50, Suppl.1. P. 64-85.

ERYTHROCYTES IN SHEAR FLOW: MECHANISMS OF DEFORMABILITY, MEASUREMENT TECHNIQUE, MEDICAL APPLICATIONS

Sverbil V. P., Zakharov S. D.

Modern representations about a physiological role of the human erythrocyte deformability and molecular mechanisms providing this unique property are considered. The review of technique for measuring this parameter is presented. The description of a new device for the deformability dynamics measurements under conditions modeling the red cell movement in vivo is given. An example of the method clinical application is described