

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ РЕОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЯХ

Медведев И.Н.* , Савченко А.П., Завалишина С.Ю., Краснова Е.Г., Кумова Т.А., Гамolina О.В., Скорятina И.А., Фадеева Т.С.

Курский институт социального образования – филиал Российского государственного социального университета

Несмотря на обширные исследования, посвященные различным аспектам патогенеза различных состояний, приводящих к тромбофилии, в том числе кардиологических заболеваний, до сих пор остается актуальным изучение реологических свойств крови, как основы сосудистых осложнений, и вопросы методических подходов к исследованию последних у кардиальных больных, что позволит своевременно и адекватно проводить коррекцию текучести крови по сосудам, предотвращая дисциркуляторные нарушения в жизненно важных органах [7, 9].

Безусловно, реологические дисфункции крови являются также и важным патогенетическим фактором развития многих заболеваний. В условиях патологии снижение текучести крови может стать первоосновой нарушения функций внутренних органов, что во многом способно определить тяжесть состояния больного и дальнейший прогноз. Все это подчеркивает диагностическую ценность лабораторной гемореологической оценки, повышающей патогенетическую направленность [7].

В настоящее время кровь принято считать двухфазной системой, исследование которой проводится как концентрированной суспензии форменных элементов в плазме [9]. При оценке макрореологии идет рассмотрение крови как целой, бесструктурной системы, вязкостные свойства которой характеризуются вязкостью цельной крови, вязкостью плазмы, гематокритной величиной и концентрацией гемоглобина.

Микрореологические позиции позволяют рассматривать реологические особенности крови с учетом реологических свойств её компонентов – в первую очередь эритроцитов (агрегация эритроцитов, деформируемость эритроцитов, цитоархитектоника эритроцитов) и тромбоцитов (адгезивно-агрегационная активность тромбоцитов, агрегация тромбоцитов с рядом индукторов и их сочетаний, внутрисосудистая активность тромбоцитов).

Наиболее важными показателями макроциркуляции являются вязкость, напряжение и скорость сдвига крови.

Вязкостью (η) называют внутренние силы “сцепления” и “трения”, определяющие текучесть крови (сПуаз, мПа • с).

Под скоростью сдвига (γ) понимают скорость, с которой могут смещаться относительно друг друга два слоя жидкости в потоке (сек⁻¹).

Напряжением сдвига (τ) является усилие, вызывающее смещение жидкостных пластов, находящихся друг против друга (дин/см², Н/м²).

Вязкость определяется как коэффициент пропорциональности между напряжением и скоростью сдвига:

$$\eta = \tau / \gamma$$

Основная особенность макрореологического поведения крови – ее нелинейность. Кессон описал реологию крови, перестроив кривую течения в кессоновские координаты ($\sqrt{\dot{\gamma}}$, $\sqrt{\tau}$).

Уравнение Кессона имеет вид:

$$\tau^{1/2} = \tau_0 + (K \cdot \dot{\gamma})^{1/2}$$

Кривая течения дает полную макрореологическую характеристику объекта, обладающего сложным строением, т. е. крови как дисперсной системы. Эта кривая в кессоновских координатах разбивается на два участка: кессоновский участок ($\dot{\gamma} = 0,5-25 \text{ с}^{-1}$), отражающий нелинейное поведение крови, и участок ньютоновского течения ($\dot{\gamma} > 100 \text{ с}^{-1}$), характеризующий линейное поведение крови.

В артериальном русле, где скорости велики (250-270 с⁻¹), эритроциты полностью дезагрегированы, начинается их деформация, дающая им форму эллипсоидов. Основное влияние на кровоток здесь оказывает работа сердца и механические свойства стенок сосудов [13]. В артериолах и прекапиллярах (70 с⁻¹) происходит сначала разрушение больших агрегатов на отдельные цепочки – монетные столбики, которые, ориентируясь вдоль потока, уменьшают свою длину в соответствии с ростом скорости, быстро распадаясь, тогда как самые крупные агрегаты задерживаются. В капиллярах эритроциты двигаются по одному. В области кессоновского течения (в венозном русле (2,5-10 с⁻¹)) происходит наиболее интенсивное агрегатообразование, после чего частично агрегаты разрушаются в сердце [15].

Традиционно с целью исследования вязкости крови преимущественно используется метод ротационной или капиллярной вискозиметрии [4], позволяющий оценить вязкости в диапазоне скоростей сдвига от 1 до 200 с⁻¹, т. к. в этом диапазоне наблюдаются все эффекты нелинейного поведения крови.

С описанием реологических свойств крови тремя интегральными параметрами:

τ_0 – предел текучести [дн/см²], [мПа];

K – кессоновская вязкость [сантипуазы], [мПа • с];

η_a^1 – кажущаяся вязкость при скорости сдвига 1 с⁻¹ [сантипуазы], [мПа • с].

Межэритроцитарные поверхностные взаимодействия определяются пространственной плотностью и качественным составом мембраны (фосфатные, аминные, карбоксильные и др. химические группы) [2, 5]. Понижение плотности поверхностного отрицательного заряда эритроцитов приводит к дестабилизации их суспензии, возможно, за счет сорбции на поверхности мембраны эритроцита макромолекул (чаще всего фибриноген) [16, 17].

Физиологическая агрегация эритроцитов имеет характер линейных цепочек в виде монетных столбиков, состоящих из 5-6 клеток с полной гидродинамической дезагрегацией эритроцитов в сосудистом русле. При очень низких скоростях сдвига эритроциты даже в норме почти полностью объединены в монетные столбики. При повышении скорости сдвига монетные столбики полностью разрушаются и кровь течет по сосудам, состоя из отдельных клеток [6].

Основным признаком патологической агрегации эритроцитов является их глыбчатая агрегация с увеличением прочности сцепления между эритроцитами, сохраняющаяся даже при $\dot{\gamma} = 250$ с⁻¹ и циркулирующая по крови благодаря системе шунтов, минуя капиллярное русло, обеспечивая, тем самым, непрерывность кровотока, централизацию кровотока и недостаточность тканевой перфузии [14].

Динамика формы эритроцитов от дискоидной до сферической приводит к невозможности свободной упаковки эритроцитов, что ведет к увеличению площади соприкосновения (следовательно, агрегации). Эхиноцитарная трансформация существенно увеличивает прочность агрегатов.

Изменение соотношения альбумина и фибриногена в плазме является дополнительным показателем суспензионной стабильности крови. Альбумин – наиболее эффективный дезагрегант и естественный антагонист фибриногена [1, 18]. При уменьшении соотношения между концентрацией альбумина и крупномолекулярными белками (глобулинами, фибриногеном и продуктами деградации фибрина) ослабляется суспензионная стабильность крови.

Спонтанная агрегация эритроцитов оценивается по степени агрегируемости эритроцитов, т. е. по среднему размеру агрегатов и отношению неагрегированных эритроцитов к агрегированным, а также по кинетике процесса агрегации [6, 7, 10, 15]. Чаще всего используемым методом количественных микрореологических исследова-

ний суспензий эритроцитов в потоке является регистрация светорассеяния при отражении или пропускании через слой крови света с помощью автоматического эритроагрегометра МА1, разработанного на основе метода Schmidt-Schonbein Н. (Mugenne, Германия). При этом оцениваемый образец крови подвергается вращению с высокой скоростью сдвига – 600 с⁻¹, при которой наблюдается полная дезагрегация. Затем производится либо полная остановка вращения, либо устанавливается малая скорость сдвига – 3 с⁻¹.

Прямой оптический метод определения агрегации эритроцитов позволяет оценить медленный процесс агрегации, связанный с укрупнением агрегатов и формированием крупных многомерных образований. Прямой оптический метод, помимо вычисления индекса агрегации, позволяет определить средний размер агрегата и долю неагрегированных эритроцитов (через 4 минуты после начала спонтанной агрегации).

Показатель деформируемости эритроцитов весьма важен, т. к. определяет движение крови в капиллярах и крупных артериальных сосудах.

Деформируемость эритроцитов зависит от вязко-эластических свойств их мембраны, вязкости их внутреннего содержимого (содержание гемоглобина) и формы и размера клеток.

В настоящее время в практике широко используются методы изучения деформационных свойств эритроцитов путем втягивания мембраны в пипетку, метод фильтрации эритроцитов через микрофильтры с диаметром пор 3-5 мкм, который был обоснован экспериментально Schmidt-Schönbein Н. в 1969 году, и дифрактометрия лазерного луча на суспензии эритроцитов в сдвиговом потоке с расчетом индекса эллиптичности [3, 8].

Нашел широкое применение метод фильтрации через поры известного размера, позволяющий получать объективную информацию о деформационных свойствах эритроцитов и его доступности. В сущности, фильтрационная способность – это интегральная способность проходить через искусственные каналы.

Оценка реологических свойств крови немислима без определения АТ, осуществляющейся следующим способом [11].

Кровь забирают с цитратом натрия 3,8% в соотношении 9:1, центрифугируют 5 мин. при 1000 об/мин. для получения богатой тромбоцитами плазмы (БТП). Часть плазмы отбирают, а оставшуюся центрифугируют при 3000 об/мин. в течение 20 мин., получают бедную тромбоцитами плазму (БеТП). БТП стандартизируют по числу тромбоцитов (до $200 \cdot 10^9$ /л.).

Из получившегося объема стандартизированной плазмы отбирают из расчета по 0,02 мл. плазмы

на каждый исследуемый индуктор и их комбинацию. Оставшийся объем плазмы можно использовать для других гематологических и биохимических исследований. Из отобранного объема стандартизированной плазмы на предметное стекло наносят 0,02 мл. плазмы и разными пипетками по 0,02 мл. р-ра индуктора. В качестве агонистов возможно применение АДФ ($0,5 \times 10^{-4}$ М.), коллагена (разведение 1:2 основной суспензии), тромбина (0,125 ед/мл.), адреналина ($5,0 \times 10^{-6}$ М.), ристомицина (0,8 мг/мл.), перекиси водорода ($7,3 \times 10^{-3}$ м.). Стекло палочкой смешивают плазму с индукторами и включают секундомер. Смесь перемешивают так, чтобы жидкость занимала окружность диаметром около 2 см. Покачивая стекло круговыми движениями в проходящем свете осветителя, на черном фоне следят через лупу за возникновением агрегатов. При появлении отчетливых агрегатов, просветлении раствора и прилипанию части агрегатов к стеклу секундомер отключают и фиксируют время агрегации тромбоцитов. Реакцию повторяют 2 – 3 раза с каждым индуктором и находят среднее арифметическое из полученных результатов.

Нормативные значения АТ при концентрации тромбоцитов $200 \cdot 10^9$ /л. составляют для АДФ – 37-50 с., коллагена – 27-36 с., ристомицина – 38-50 с., тромбина – 48-59 с., адреналина – 81-106 с., перекиси водорода – 40-60 с.

Определение внутрисосудистой активности тромбоцитов возможно по методу [12], когда из локтевой вены берут 2 мл. в силиконированную центрифужную пробирку с 8 мл. раствора 0,125% глутаральдегида и сразу центрифугируют 6 мин. при 1000 об/мин. Супернатант разводят раствором глутаральдегида в четыре раза (0,1 мл. + 0,3 мл. раствора), перемешивают пипеткой 5 раз и заполняют камеру Горяева, которую помещают на 20 мин. в увлажненную чашку Петри.

Под фазовоконтрастным микроскопом определяют процентное распределение описанных выше форм тромбоцитов на 200 клеток.

Первым видимым проявлением активации кровяных пластинок является изменение их формы, которое может служить для адекватной оценки этого процесса как индуцируемого *in vitro*, так и развивающегося в организме. В сосудистом русле при отсутствии патологических активирующих влияний подавляющее большинство интактных тромбоцитов, называемых дискоцитами, имеет характерную дискоидную форму или форму чечевицы и практически гладкую поверхность. Интактное состояние тромбоцитов, сопряженное с формой дискоцита, – один из важнейших факторов, препятствующих неоправданному развитию

внутрисосудистого тромбоза. Механизмы его обеспечения достаточно сложны. Это, отчасти, связано с тем, что интактное состояние этих клеток сочетается с потенциальной возможностью быстрых и специфичных преобразований при появлении в кровотоке активирующих стимулов. Характерное изменение формы при индуцировании гемостатических реакций кровяных пластинок отражает определенные процессы их внутренней ультраструктурной и биохимической перестройки. При этом развивается типичная последовательность изменений: от формы интактного тромбоцита – дискоцита к активированным клеткам – дискоэхиноциту, т. е. Д, у которого на поверхности появляются отростки, и далее к сфероциту или сфероэхиноциту. У последнего не только форма становится все более сферичной, но и возрастает число отростков.

Оценка степени агрегации осуществляется также по относительному числу всех тромбоцитов, вовлеченных в агрегационную реакцию. Последнее может быть выявлено по процентному отношению числа агрегировавших тромбоцитов к общему их числу в препарате (т. е. к сумме свободно лежащих клеток и вовлеченных в агрегацию) по формуле:

$$\frac{2x + 3y + 4z + \dots}{500 + 2x + 3y + 4z + \dots} \times 100\%$$

где x , y , z и т. д. – число агрегатов соответствующего размера на 500 свободных тромбоцитов.

Исследование нарушений микроциркуляторных изменений в крови не требует дорогостоящего оборудования, дает полную информацию о динамике процесса, позволяет определить активность эритроцитов и тромбоцитов. На результаты исследования не влияет агрегация, которая четко дифференцируется и одновременно оценивается количественно. При применении данных морфофункциональных методов установлено, что и у здорового человека в циркулирующей крови небольшая часть эритроцитов и тромбоцитов активирована. Однако в патологических условиях изменения этих показателей более выражены вследствие внутрисосудистой активации эритроцитов и кровяных пластинок. При патологических состояниях микроциркуляция в значительной мере ухудшается, в т.ч. при артериальной гипертензии в кровотоке увеличивается не только доля эритроцитов и тромбоцитов с измененной формой, но и возрастает процент их внутрисосудистых агрегатов. У таких больных наблюдается также повышенная тенденция клеток крови к спонтанному изменению формы даже в стабилизированной крови.

Литература

1. Борисов Д.В., Тихомирова И.А., Муравьев А.В. Анализ влияния плазменных факторов на агрегацию эритроцитов разных возрастных популяций // Физиология человека.- 2002.- №4.-Т.28.- С.118-122.
2. Гольцов А.Н., Каданцев В.Н. Исследование влияния липидного состава клеточных мембран на доменную структуру бислоя и латеральный транспорт // Физиология человека.- 1995.- Т. 21, № 6.- С.113 – 125.
3. Зинчук В.В. Методика измерения деформируемости эритроцитов //Здравоохранение Белоруссии.- 1989.- № 12.- С. 97-98.
4. Катюхин Л.Н. Реологические свойства эритроцитов. Современные методы исследования // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.- 1995.- Т. 81, № 6.- С.122-129.
5. Козлов М.М., Маркин В.С. Мембранный скелет эритроцита. Теоретическая модель // Биологические мембраны.- 1986.- Т.3, №4.- С. 404-422.
6. Мchedlishvili Г.И., Бериташвили Н.И., Ломинадзе Д.Г. Количественная оценка агрегируемости эритроцитов в пробах крови человека // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 1992. – N3. -С.50-51.
7. Ройтман Е.В. Клиническая гемореология. // Тромбоз, гемостаз и реология.- 2003.- № 3.- С.13-27.
8. Сигал В.Л. Фильтрационные методы определения деформационных (вязкоупругих) свойств мембраны биологических клеток // Лаб. дело.- 1989.- № 5.- С.4-9.
9. Фирсов Н.Н. Реологические свойства крови и здоровье // Вестник секции физики РАЕН.- 2000.- №6.- С.66-78.
10. Фирсов Н.Н., Сирко И.В., Приезжев А.В. Современные проблемы агрегометрии цельной крови // Тромбоз, гемостаз и реология.- 2000.- №2 (2).- С. 9-11.
11. Шитикова А.С. Визуальный микрометод исследования агрегации тромбоцитов. В кн.: Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний/ Под ред. Петрищева Н.Н., Папаян Л.П. СПб.: 1999. С.49-52.
12. Шитикова А.С., Беязо О.Е., Тарковская Л.Р. и др. Метод определения внутрисосудистой активности тромбоцитов и его значение в клинической практике. // Клиническая лабораторная диагностика.-1997.-№2.-С.23-35.
13. Baskurt O.K., Edremitlioglu M., Temiz A. Effect of erythrocyte deformability on myocardial hematocrit gradient // Amer. J. Physiol.- 1995.- Vol.268, N 1.- P.H260-H264.
14. Bishop J., Nance P., Popel A. et al. Relationship between erythrocyte aggregate size and flow rate in skeletal muscle venules // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2004.– Vol. 286. – P. 113-120.
15. Kim S., Popel A. S., Intaglietta M. et al. Aggregate formation of erythrocytes in postcapillary venules //Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2005. – Vol. 288. – P. 584-590.
16. Maeda N., Seike M., Nakajima T. et al. Contribution of glycoproteins to fibrinogen – induced aggregation of erythrocytes // Biochim. biophys. acta. Biomembranes.- 1990.- Vol.1022, N 1.- P.72-78.
17. Reinhart W.H., Singh-Marchetti M., Straub P.W. The influence of erythrocyte shape on suspension viscosities // Eur. J. Clin. Invest.- 1992.- Vol.22, N 1.- P.38-44.
18. Singh A., Reinhart W.H. The influence of fractions of abnormal erythrocytes on aggregation // Eur. J. Clin. Invest. – 1991.- Vol.21, N 6.- P.597-600.

Поступила 29/01-2009

© Коллектив авторов, 2009

305035, г. Курск, ул. Пирогова, дом 126

Тел.: 8-910-273-22-63

[Медведев И.Н. (*контактное лицо) – профессор, зав. кафедрой адаптивной физкультуры и спорта, Савченко А.П. – доцент кафедры истории, теории и методики социальной работы, Завалишина С.Ю. – старший преподаватель кафедры, Краснова Е.Г. – провизор ООО “Социальная аптека-29”, г.Калуга Кумова Т.А –доцент кафедры, Гамолина О.В.- врач-терапевт МУЗ ГБ №3 г.Курска, соискатель кафедры адаптивной, Скорятина И.А. – врач-терапевт Областного противотуберкулезного диспансера г.Курска, соискатель кафедры, Фадеева Т.С. – делопроизводитель кафедры].