

О.М. Дацок, Е.Н. Жолонский, Н.Н. Кизилова, канд. физико-матем. наук

Анализ оседания эритроцитов в неоднородном поле сил

Sedimentation erythrocytes dynamics based on the experimental material and theoretical estimations is studied. Important diagnostic parameters received from the curve of the fractional erythrocytes sedimentation rate is discussed

В данной работе на основе экспериментального материала и теоретических расчетов исследуется динамика оседания эритроцитов и обсуждаются диагностически значимые параметры, которые можно получить на основе кривых фракционной реакции оседания эритроцитов (ФРОЭ).

Реакция оседания эритроцитов (РОЭ), являясь неспецифической реакцией общего характера, широко используется в повседневной медицинской практике в диагностических и прогностических целях, а также для контроля за лечением. В качестве основного показателя РОЭ измеряют скорость оседания эритроцитов (СОЭ). Поскольку оседание эритроцитов зависит от многих факторов, его можно рассматривать как ориентировочный дифференциально – диагностический тест.

Увеличение СОЭ происходит при появлении грубодисперсных белков (воспалительные заболевания); при уменьшении концентрации эритроцитов (различного рода анемии), при увеличении объема эритроцитов (макроцитоз); при увеличении концентрации холестерина (атеросклероз). Снижение СОЭ наблюдается при увеличении числа эритроцитов; а также при снижении кислотности крови pH. У здоровых лиц это сравнительно постоянная величина: у мужчин 2-10 мм/час, у женщин 2-15мм/час. В норме низкие значения характерны для новорожденных, высокие – для беременных.

Увеличение скорости оседания эритроцитов типично для большинства больных с острыми воспалительными заболеваниями, асептическими воспалениями, инфарктом миокарда. При этом СОЭ не может рассматриваться как ранний лабораторный тест. Нормализация СОЭ у больных значительно отстает от нормализации других клинико-лабораторных показателей. Тем не менее, величина СОЭ, особенно в динамике, в известной мере позволяет ориентироваться в особенностях течения патологического процесса.

При стандартной постановке теста стабилизированная от свертывания артериальная кровь помещается в аппарат Панченкова. За счет разницы в плотностях эритроцитов и плазмы крови и за счет объединения эритроцитов в агрегаты происходит оседание клеток в поле силы тяжести. При этом основным диагностическим показателем служит высота столбика чистой плазмы через час после начала оседания.

Существуют модификации стандартной методики, связанные с изменением длительности теста и расположением капилляра под некоторым углом к вертикали. Проведение фракционной реакции оседания эритроцитов (ФРОЭ) связано с дискретной регистрацией высоты столба чистой плазмы (каждые 5-15 мин в течение 2-3 ч), что позволяет оценить динамику процесса и ввести новые диагностические показатели. Кривые ФРОЭ указывают на немонотонность процесса оседания, на наличие периодов ускорения и замедления перемещения границы раздела между зонами оседающих агрегатов и чистой плазмы.

Вскоре после начала теста кровь разделяется на два слоя: верхний слой прозрачной плазмы и нижний - оседающих эритроцитов. В начале оседания, за время от одной до нескольких минут, четкая граница раздела между чистой плазмой и оседающими эритроцитами отсутствует. В дальнейшем весь столбик крови в капилляре постепенно разделяется на три зоны.

1) **Зона чистой плазмы**, которая начинается от верхнего мениска жидкости и доходит до границы раздела чистой плазмы и оседающих эритроцитов. Над поверхностью раздела имеются отдельные эритроциты (или маленькие агрегаты) в малой концентрации, по-видимому, отмытые от стенок трубки вторично после прохода верхней границы эритроцитарного столба, а также вынесенные из эритроцитарной зоны восходящими потоками.

2) **Зона оседающих эритроцитов**. Здесь при малых концентрациях на фоне общего движения вниз существуют нисходящие и восходящие потоки эритроцитов. При больших концентрациях касающиеся друг друга агрегаты создают впечатление единого эритроцитарного остова (сети). При этом вытесняемая плазма пробивает в остове извилистые ходы, по которым она поднимается с довольно значительной скоростью вверх, увлекая за собой небольшие агрегаты и отдельные эритроциты.

3) **Компактная зона**. В этой нижней зоне трубки все эритроциты касаются один другого, движение практически отсутствует, концентрация их максимальна. Параметры динамики оседания отличаются для крови здоровых доноров и больных и также могут использоваться для диагностики [1].

Оседание частиц агрегирующих суспензий неустойчиво по отношению к малым изменениям однородного распределения эритроцитов в сечении капилляра. Случайные внешние воздействия и флуктуации могут привести к образованию крупных агрегатов, которые будут быстро оседать, увлекая за собой мелкие, поскольку сила тяжести ($F_g \sim R^3$) растет быстрее силы сопротивления со стороны окружающей жидкости ($F_t \sim R^2$, где R - радиус агрегата). При этом и вид кривых ФРОЭ, и значения часового показателя будут сильно варьировать, затрудняя диагностику. В ряде случаев стабилизация оседания может быть достигнута за счет действия поля внешних сил (постоянное и переменное электрическое и магнитное поле, акустическое или механическое воздействие).

Оседание эритроцитов является сложным физико-химическим процессом. По данным многочисленных экспериментов имеются целый ряд факторов, существенно влияющие на процесс оседания:

1) Скорость агрегации эритроцитов G (изменение числа агрегатов в единице объема крови за единицу времени). С увеличением G оседание значительно ускоряется, с уменьшением – существенно замедляется или оседание не происходит вообще.

2) Начальная концентрация эритроцитов в исследуемом объеме крови. С ростом концентрации вязкость крови экспоненциально растет, а оседание замедляется.

3) Температура T . Повышение температуры, как правило, ускоряет оседание эритроцитов, а снижение -

замедляет (при 6°C СОЭ = 7 мм/ч, при 10, 16, 18, 26, 37° — соответственно 12, 20, 23, 28, 34 мм/ч). Особенно велико замедляющее влияние температур ниже 16°C. Высокие температуры (>40°), замедляя процесс агрегации, замедляют также и скорость оседания. Иногда отмечается более сложная зависимость оседания от температуры, например, существование двух максимумов скорости оседания и двух минимумов. Природа немоной зависимости оседания от температуры до конца не выяснена.

4) Кислотность крови pH, при снижении которой происходит ряд процессов на клеточном уровне и снижается суспензионная стабильность крови, вследствие чего оседание ускоряется.

5) Поверхностный заряд эритроцитов, величина которого может быть определена путем электрофореза и является отдельным диагностическим показателем крови.

6) Деформируемость эритроцитов, которая уменьшается при самых разных заболеваниях, а также после специальной обработке эритроцитов формальдегидом. При снижении деформируемости эритроцитов уменьшается плотность их упаковки их в компактной зоне, растет доля запертой в агрегатах плазмы и соответственно объем осадка. При сильном разбавлении крови ($H < 3\%$) жесткость эритроцитов практически не влияет на процесс оседания.

7) Внешнее магнитное поле. Содержащийся в эритроцитах гемоглобин проявляет парамагнитные свойства, поэтому внешние однородные и неоднородные, постоянные и переменные магнитные поля сильно влияют как на часовую показатель, так и на кривые СОЭ. Даже колебания геомагнитного поля могут привести к значительному разбросу седиментационных кривых, полученных для одной и той же пробы крови. Для сопоставления между собой разных методик СОЭ неоднократно проводились специальные эксперименты. Было обнаружено, что величина часового показателя СОЭ, а также поведение кривых ФРОЭ зависит от длины трубки. С увеличением длины трубки величина часового показателя возрастает.

Для ускорения процесса оседания используются стандартные центрифуги, в которых вращение происходит в горизонтальной плоскости, а капилляры расположены наклонно. СОЭ при центрифугировании зависит от тех же факторов, что и оседание в поле гравитации, но относительное значение этих факторов изменяется. В большей мере выявляется зависимость от деформируемости эритроцитов. Показатель центрифугирования - относительный объем массы форменных элементов - является конечным результатом измерения, когда промежуточная зона седиментационной трубки (кроме зон чистой плазмы и компактной зоны) отсутствуют, а формирование компактной зоны происходит под действием повышенных напряжений. Поэтому результаты определения показателя гематокрита при центрифугировании по оседанию при нормальной гравитации различны.

Деформируемость эритроцитов влияет на оседание при центрифугировании уже при ускорениях 200—800 г. «Плотная» упаковка нормальных эритроцитов человека (максимально достижимая без повреждения) происходит при 10—12-минутном центрифугировании с ускорением 12000 g или в течение 30—40 мин при 3000 g. Агрегация оседающих эритроцитов в очень быстро вращающейся центрифуге едва ли происходит, видимо из-за высоких скоростей оседания эритроцитов и изменений их формы.

Основой для теоретического анализа процесса оседания служит обобщенная формула Стокса в виде [2]:

$$u_s - u_f = \lambda(\rho_s - \rho_f)g \frac{w^{2/3}}{\mu}, \quad (1)$$

где $u_s(t, x)$ и $u_f(t, x)$ — скорости эритроцитов и плазмы в сечении x седиментационной трубки, ρ_s и ρ_f - плотности эритроцитов и плазмы соответственно, μ — вязкость плазмы, λ — коэффициент, зависящий от среднего размера и формы агрегатов и их объемной концентрации H , w — средний объем агрегата, g — ускорение силы тяжести. При $\lambda = \frac{2}{9}$, $u_f = 0$ и $w = R^3$

из (1) получается формула Стокса для сферической частицы радиуса R , оседающей в безграничном объеме жидкости.

Расчет с привлечением простой модели кинетики агрегации по Смолуховскому дает S-образную седиментационную кривую и позволяет при сопоставлении с опытом оценить коэффициент λ , а также скорость изменения числа агрегатов в единице объема. Данная теория не учитывает процесса медленного уплотнения компактной зоны и некоторых других особенностей оседания эритроцитов в крупномасштабных сосудах. Существование крупномасштабных движений учитывается только в среднем — в коэффициенте λ и в уравнении кинетики агрегации. Также в среднем учитываются и мелкомасштабные движения (вращение и флуктуации оседающих частиц). Восходящие и нисходящие, потоки при седиментации, по-видимому, представляют собой проявление механической неустойчивости процесса оседания.

Такой подход не описывает динамики изменения скорости и, в частности, неприменим к анализу кривых СОЭ. Так как ускорение оседания в начальный момент времени определяется процессом агрегации, а последующее замедление вызвано уплотнением (повышением концентрации) эритроцитов, то более детальный подход должен включать моделирование динамики процессов агрегации и уплотнения. Такое описание может быть достигнуто, если, рассматривая кровь как двухфазную среду (эритроциты и плазма), исходить из общих уравнений движения сплошной среды.

Континуальная модель суспензии агрегирующих частиц, оседающих в поле силы тяжести, была построена в работах Лосева Е.С.[3]. Расчеты показали, что модель правильно описывает различные аномалии седиментационных кривых, позволяет учесть влияние начальной концентрации, длины трубки и скорости агрегации эритроцитов на процесс оседания.

Модели оседания эритроцитов, основанные на представлениях механики сплошных сред, построены для стационарных одно- и двумерных движений крови как многофазной среды [3]. Используя эти модели, можно на основе кривых ФРОЭ рассчитывать значение безразмерного параметра k , характеризующего скорость агрегации эритроцитов. При этом основным диагностическим показателем ФРОЭ является время достижения максимальной скорости оседания t_{max} .

При экспериментальном исследовании капилляры с пробой крови из локтевой вены донора (разведение 4:1) размещали в аппарате Панченкова. Границу раздела между зонами эритроцитов и плазмы фиксировали каждые 5 мин в течение 4 ч. По полученным данным строились графики зависимости от времени высоты столба плазмы $h(t)$ и скорости оседания $h'(t)$. Характерные для здоровых

доноров графики $h(t)$ при одновременном проведении теста с кровью одного донора в 9 капиллярах приведены на рис.1, а зависимости $h(t)$ и $h'(t)$ для одного из тестовых капилляров – на рис.2.

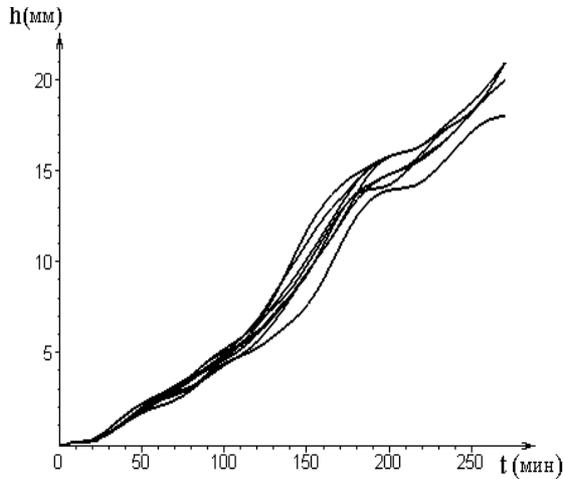


Рис.1

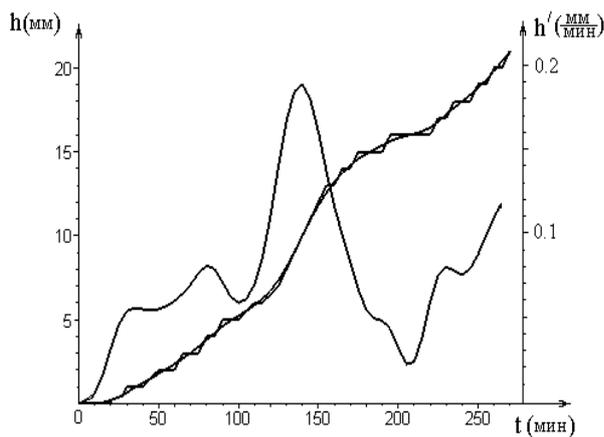


Рис.2

Поскольку в результате экспериментов были получены таблицы значений функции $X(T)$, соответствующие значениям аргумента T_0, T_1, \dots, T_N , то для получения плавной функции необходимо применить процесс сглаживания [4].

Рассмотрим способ сглаживания, основанный на методе наименьших квадратов, для случая, когда значения T_0, T_1, \dots, T_N равноотстоящие, а все значения $X(T_i)$ имеют одинаковую точность. Предполагается, что функция $X(T)$ на некотором участке, охватывающем $n+1$ значений аргумента T может быть достаточно хорошо приближена многочленом степени m ($m \leq n$). Для того, чтобы найти сглаженные значения $\bar{X}(T_i)$ в точке T_i , выбирают $n+1$ значений аргумента (из заданных T_i) так, чтобы T_i , по возможности, находились посередине. По табличным значениям функций в этих точках методом наименьших квадратов строят многочлен степени m , приближающий функцию $X(T)$, и за значение $\bar{X}(T_i)$ принимают значение этого многочлена в T_i . Полученные при этом значения

довольно близки к истинным. Для практического использования заранее найдены выражения $\bar{X}(T_i)$ через табличные значения $X(T)$ при заданных m и n . Рассмотрим несколько таких выражений (для краткости обозначим: $X(T_i) = X_i$):

$$M=1, n=2: \bar{X}(T_0) = \frac{1}{3}(X_{i-1} + X_i + X_{i+1}); \quad (2)$$

$$M=1, n=4: \bar{X}(T_0) = \frac{1}{5}(X_{i-2} + X_{i-1} + X_i + X_{i+1} + X_{i+2});$$

$$M=1, n=6:$$

$$\bar{X}(T_0) = \frac{1}{7}(X_{i-3} + X_{i-2} + X_{i-1} + X_i + X_{i+1} + X_{i+2} + X_{i+3})$$

Аналогичные выражения можно привести для $m=3$ и $m=4$. Опытным путем было установлено, что для сглаживания полученных в результате экспериментов кривых наиболее оптимальное выражение (2).

При одновременном проведении теста динамика оседания (кривые $h'(t)$) отличается (рис.3), однако значения t_{\max} для всех кривых лежат в узком диапазоне значений (на рис.3 выделено). В соответствии с математической моделью гравитационного оседания эритроцитов параметр t_{\max} является решением уравнения:

$$kH_0^{t_{\max}} + 1 = \left(1 + \frac{5k}{13.5(1-H_0)^{3.5}}\right)^{0.6}, \quad (3)$$

где H_0 - начальная концентрация эритроцитов в пробе крови.

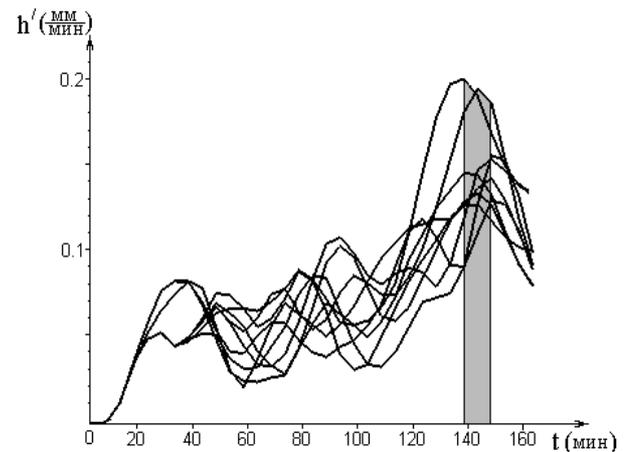


Рис.3

В отличие от стандартного часового показателя, который сильно зависит как от реологических свойств крови [5], так и от длины капилляра и от H_0 , показатель t_{\max} сильно зависит от скорости агрегации эритроцитов k и слабо - от H_0 в физиологическом диапазоне значений $H_0 = 0.2 - 0.4$ для стабилизированной крови (рис.4).

Зная величину H_0 для исследуемой пробы (например, по предварительным данным клинического анализа крови) и, определяя по графику $h'(t)$ величину t_{\max} , можно по (2) рассчитать значение диагностически значимого параметра k . По данным многочисленных экспериментов с кровью человека $k = 10^4 - 10^8$.

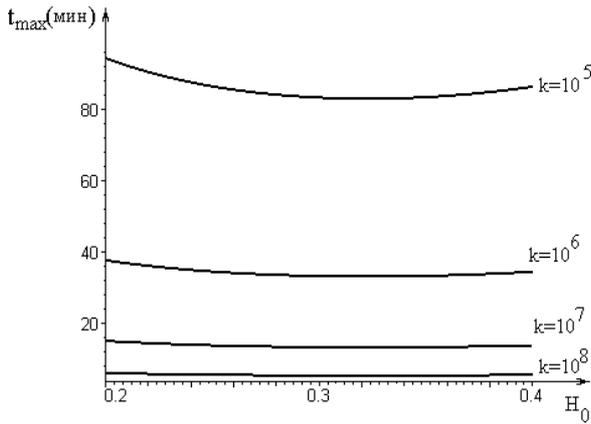


Рис.4

Для упрощения процедуры построения седиментационных кривых предложены методики автоматической регистрации границы между зоной чистой плазмы и оседающих эритроцитов, основанные на различии оптических свойств зоны чистой плазмы и зоны, заполненной оседающими агрегатами. Оптические методы исследования свойств крови позволяют получать информацию при минимальном воздействии на пробу, не меняя ее электрических, магнитных, биохимических свойств. Оптическая аппаратура малоинерционна и удобна для непрерывной регистрации как в экспериментах *in vitro*, так и в условиях *in vivo*.

Для автоматической регистрации распределения эритроцитов в процессе седиментации может быть использован гелий-неоновый лазер[5]. Результат действия такого аппарата представляется как функция распределения эритроцитов от высоты и ширины столбика крови. Лазерный луч $d = 1$ мм фокусируется на выпуклую линзу с фокусным расстоянием 100 мм, в результате получается пятно диаметром 0.5 мм в центре капилляра с кровью. Фотоэлемент улавливает луч лазера, после этого сигнал поступает на усилитель и прибор для измерения.

Прибор, созданный на базе Московского государственного университета, позволяет автоматически регистрировать границу для одного капилляра с кровью. При этом оказалось, что вид кривых сильно отличается и качественно, и количественно для пробы крови одного пациента и в норме и при патологии. Численное дифференцирование исходных кривых позволяет получать графики $v(t)$ в динамике. В большинстве случаев кривая $v(t)$ имеет один четко выраженный максимум. При разных видах патологий кривая имеет нерегулярный характер с большим числом локальных максимумов и минимумов.

На кафедре Биомедицинских электронных устройств и систем Харьковского национального университета радиоэлектроники создан экспериментальный образец аппарата для исследования центробежной седиментации эритроцитов. Наряду с автоматизацией процесса получения информации о ходе седиментации, прибор позволяет существенно уменьшить время исследования, причем одновременно можно проводить исследование до 15 проб.

При быстром сканировании капилляров наиболее приемлемо снимать информацию посредством линейного источника света и линейки фотоприемников, обеспечивающих регистрацию максимальной глубины оседания 80 мм с шагом 2мм (рис. 5).

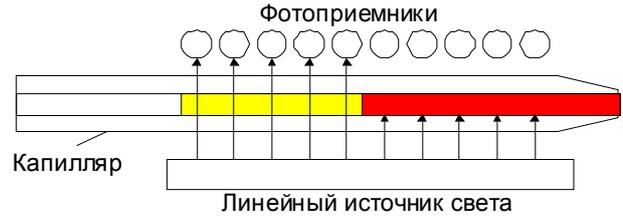


Рис.5

Свет источника через коллимирующую щель попадает на канал капилляра, проходит через участок, занимаемый плазмой, и формирует на фотоприемниках электрические сигналы, соответствующие уровню логической единицы. На участке, занимаемом эритроцитами, интенсивность света меньше пороговой, что соответствует уровню логического нуля.

Механическая часть комплекса представляет собой центрифугу, на которой установлен ротор в виде цельнометаллического диска с пазами под 15 стандартных капилляров и соответствующими идентификационными отверстиями (рис.6). Частота вращения центрифуги подобрана таким образом, чтобы обеспечить седиментацию форменных элементов крови в пределах 25..40g (g – ускорение свободного падения).

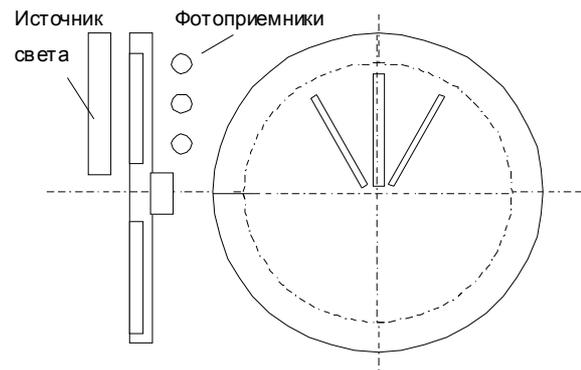


Рис.6

Электронный блок выполнен на основе параллельного программируемого интерфейса и логических устройств, обеспечивающих получение информации с измерительных и адресных фотоприемников, управление электроприводом и обмен данными с ЭВМ (рис. 7).

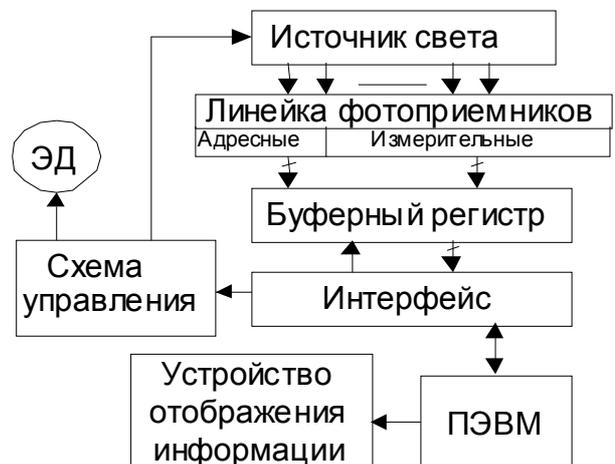


Рис.7

Программное обеспечение комплекса позволяет отслеживать динамику изменения высоты столбика плазмы для каждого капилляра в течение заданного промежутка времени и производить построение седиментационных кривых.

Результаты исследования оседания эритроцитов при 12-минутном центрифугировании приведены на рис.8.

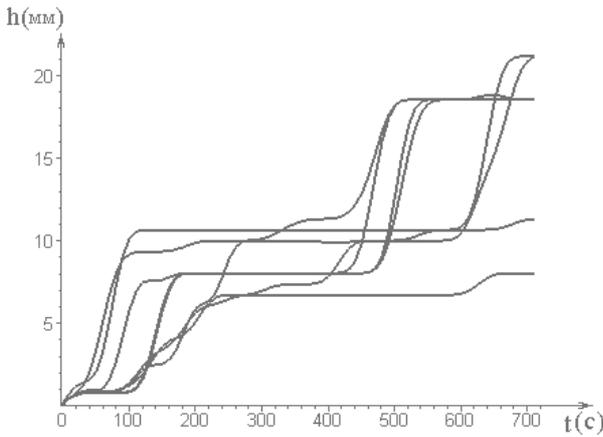


Рис.8

Неустойчивость оседания приводит к различию в виде кривых и разбросу значений показателя h для каждого момента времени t . Далее по полученным зависимостям $h(t)$ строились кривые скорости оседания $h'(t)$, на каждой из которых определялось значение t_{max} , а затем по (2) рассчитывались значения скорости агрегации эритроцитов k . При этом и стандартный тест ФРОЭ, и оседание в центрифуге проводились с пробой крови одного донора. Результаты расчетов, включая средние по всем капиллярам значения $\langle t_{max} \rangle$ и стандартные отклонения $\delta = \frac{1}{n} \sqrt{\sum_{j=1}^n (t_{max}^j - \langle t_{max} \rangle)^2}$, где n – общее число капилляров в эксперименте, приведены в табл.1.

Табл.1

	Стандартная ФРОЭ		Центрифугирование	
	t (мин)	k	t (с)	K
1	140	38670	120	57360
2	138	39296	78	69700
3	138	39296	90	64200
4	140	38670	92	64500
5	142	38063	76	67600
6	139	38980	80	66500
7	148	36353	108	60100
8	144	37476	102	62200
9	140	38670	94	63300
$\langle t_{max} \rangle$	141	38386	93	63940
δ (%)	2.3	2.5	15.7	5.9

При расчетах показателя k , отражающего патологические свойства крови, для данных стандартного теста и для оседания в центрифуге получены значения, лежащие в пределах одного порядка ($k \sim 10^4$). При этом проведение теста в центрифуге позволяет автоматически получать кривые $h(t)$ одновременно для всего набора капилляров и существенно ускоряет процесс диагностики.

В качестве основного диагностически значимого показателя седиментационной кривой следует считать время достижения максимальной скорости оседания t_{max} .

При этом разброс значений t_{max} в разных капиллярах отражает суспензионную нестабильности крови и может служить дополнительным диагностическим показателем, интерпретация которого должна также проводиться в рамках реологической модели крови как многофазной суспензии агрегирующих частиц.

В результате проведенных исследований было показано следующее:

- СОЭ – важный диагностический показатель, позволяющий судить о наличии и особенностях течения патологического процесса в организме человека;

- процесс седиментации форменных элементов крови является неустойчивым и зависит от степени воздействия полей внешних сил;

- особый интерес в клинической медицине представляет исследование динамики оседания эритроцитов, однако этот процесс чрезвычайно трудоемкий;

- до настоящего времени не создан универсальный прибор, позволяющий автоматизировать исследование СОЭ, сократив при этом трудовые и временные затраты;

- использование аппарата центробежной седиментации эритроцитов позволяет автоматизировать определение динамики СОЭ и существенно уменьшить время проведения исследования;

- в качестве основного диагностически значимого показателя при исследованиях седиментационной кривой предлагается считать время достижения максимальной скорости оседания, а разброс его значений может служить дополнительным диагностическим показателем, повышающим эффективность седиментационных исследований.

Литература.

- 1.Воейков В.Л. Дмитриев А.Ю. О биофизических механизмах реакции оседания эритроцитов. //Биофизика .- 1998.-Т.43,вып.4.-С.575-579.
- 2.Левтов А.В., Регирер С.А., Шадрин Н.Х. Реология крови. – М.:Медицина. – 1982. – 272с.
- 3.Лосев Е.С. Моделирование оседания агрегирующих частиц //Изв. АН СССР. Сер.МЖГ. – 1983. - №3. – С.71-78.
- 4.Березин И.С. Жидков Н.П. Методы вычислений. в 2-х тт. - М.Наука. - 1960.
- 5.Muralidharan E., Tateishi N., Maeda N. A new laser photometric technique for the measurement of erythrocyte aggregation and sedimentation kinetics. // Biorheology. – 1994. – v.31,№3. – P.277-285.