



УДК 577-359; 612-117

В.Л. Воейков, Е.В. Буравлева, К.Н. Новиков

МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Российская Федерация,
119234, Москва, ГСП-1, Ленинские Горы, д.1, стр. 12, E-mail: vvl@soil.msu.ru

ПРИМЕНЕНИЕ ВИДЕОРЕГИСТРАЦИИ С ВЫСОКИМ ПРОСТРАНСТВЕННО- ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ ВЫЯВЛЯЕТ НЕМОНОТОННЫЙ ХАРАКТЕР ОСЕДАНИЯ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

АННОТАЦИЯ

Благодаря применению принципов системы технического зрения для детального анализа кинетики оседания красной крови были выявлены нелинейные динамические характеристики этого процесса. Видеорегистрацию оседания клеток цельной крови проводили в стеклянных пипетках и плоскопараллельной кювете с помощью цветной телекамеры с разрешением 470 линий, фоточувствительностью 0,1 люкс и скоростью 25 кадров/сек. Также был разработан автоматический компьютеризированный прибор, позволяющий регистрировать динамику оседания красной крови с высокой степенью временного разрешения. Положение границы между красными клетками и плазмой может регистрироваться каждые 30 секунд в нескольких стеклянных пипетках одновременно с точностью ± 10 мкм. Данные обрабатываются компьютером и представляются в виде РОЭ-грамм (графиков скорость-время) и кривых, описывающих временную эволюцию границы оседания клеток. В результате были выявлены макрокинетические закономерности оседания цельной крови, включающие несколько периодов наблюдаемого процесса. Обнаружены динамические изменения (размывание) границы плазма-красные клетки, проявляющиеся в колебательном характере изменений скорости процесса, явлениях «отрицательной седиментации». Видеосъемка процесса позволила обнаружить нано- и микро-пузырьки газа, выделяющиеся из крови в процессе ее оседания. Активное движение плазмы вверх, вдоль оседающей массы красных клеток приводит к активному движению клеток и пузырьков газа против сил гравитации, на границу между красными клетками и плазмой. Предложена гипотеза, представляющая кровь как сложную систему, состоящую, как минимум из трех фаз: плазмы, клеточных компонентов и газовой фазы, которая апеллирует к пересмотру многих понятий гематологии, реологии, сердечно-сосудистой физиологии.

**КРОВЬ, ОСЕДАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ, НЕЛИНЕЙНАЯ ДИНАМИКА, ГАЗОВАЯ ФАЗА,
ТРЕХФАЗНАЯ СИСТЕМА, ГЕОМАГНИТНЫЕ БУРИ**

ВВЕДЕНИЕ

Кровь – одна из наиболее интенсивно изучаемых тканей человека и животных. При всем том знания о крови, как о целостной ткани, как об органе весьма ограничены. Кровь представляет собой жидкую среду сложного состава, однако она относительно легко поддается фракционированию, и подавляющее большинство гематологических исследований направлено на изучение свойств отдельных компонентов крови. К сожалению, при таком подходе теряется информация о биологических свойствах крови, обусловленных как

сложными взаимодействиями ее частей, так и о физических ее особенностях как комплексной динамической системы. Набор методов, позволяющих исследовать свойства цельной крови в ее жизнеспособном состоянии, невелик. Одним из них является так называемая «реакция оседания эритроцитов» (РОЭ), известная в настоящее время как диагностический тест на скорость оседания эритроцитов (СОЭ). Тест основан на седиментации форменных элементов крови и заключается в том, что стабилизированную от свертывания кровь набирают в стеклянную пипетку до определенной высоты столбика, пипетку устанавливают вертикально и, через 1 час регистрируют положение границы между осевшими красными клетками и прозрачной плазмой. Этот тест используется как неспецифический индикатор состояния здоровья человека, позволяющий выявить скрытые заболевания, следить за ходом лечения пациента.

Несмотря на кажущуюся простоту теста, механизм оседания форменных элементов крови в цельной неразведенной крови остается неясным. Для объяснения седиментации создаются модели, описывающие седиментацию отдельных эритроцитов (заряженных макрочастиц) и их ассоциатов в вязкой среде сложного состава [1, 2]. В этих моделях используются, в основном, одни и те же параметры, характеризующие вязкость, плотность, гематокрит, концентрации некоторых белков и пр., при этом делаются попытки описать процесс оседания крови гладкими функциями [3, 4].

Один из ранних исследователей оседания цельной крови, С.Д. Балаховский, использовал микроскопический контроль для изучения поведения красной крови в процессе ее оседания. Он утверждал, что в вертикально установленной камере почти сразу после ее заполнения кровью возникает трехмерный «кровавый остов», в петлях которого находится плазма. Оседание столбика крови здорового донора главным образом обусловлено «проседанием петель» и сближением их друг с другом, а не седиментацией отдельных клеток и их ассоциатов. Скорость движения мениска между красной кровью и плазмой определяется прочностью эритроцитарного остова [5]. Таким образом, согласно Балаховскому, так называемая «седиментация» эритроцитов в цельной крови таковой не является, а движение границы между плотной массой клеток и плазмой отражает сложный коллективный процесс.

С целью изучения динамических особенностей оседания эритроцитов и более тонкого анализа протекающих в оседающей крови процессов, мы применили телерегистрацию оседания крови при большом увеличении. Кроме того, был создан компьютеризированный многоканальный прибор "Видеоседиментограф", основанного на принципе оптоэлектронной обработки информации («системе технического зрения») ([6]), а также метод, который назвали «РОЭ-графия» -- наблюдение за динамикой оседания красной крови с высокой степенью разрешения во времени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Телерегистрация

Кровь здоровых доноров получали пункцией пальца или из локтевой вены с использованием вакутейнера и стабилизировали от свертывания раствором цитрата натрия (3,5% цитрат натрия 1 часть к 9 частям крови). Немедленно после получения кровь помещали в плоскопараллельную стеклянную кювету (высота 50 мм, ширина 10 мм, толщина 0,8 мм) до высоты 40 мм или набирали в стеклянный капилляр для измерения гематокрита (внутренний диаметр 0,6 мм, внешний – 0,8 мм, высота 80 мм. Нижний конец стеклянного капилляра затыкали пробочкой из нейтрального материала. В ряде экспериментов капилляр заполняли кровью полностью и изолировали ее от контакта с атмосферой с обоих концов.

Кювету или капилляр фиксировали в вертикальном положении на предметном столике горизонтального микроскопа МБР-1К (рис. 1). С помощью микрометрических винтов столик мог плавно перемещаться в двух координатах. На тубусе микроскопа была зафиксирована

цветная безкорпусная телекамера ACE-S110CHB (разрешение 470 линий, fotocувствительность 0,1 люкс). Между осветителем и объектом устанавливали кювету с водой для предотвращения нагревания крови.

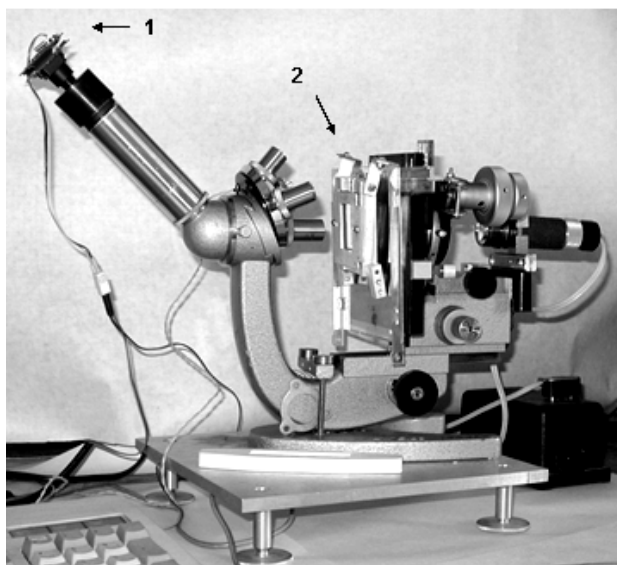


Рис. 1 Горизонтальный микроскоп для телерегистрации оседания крови с телекамерой (1) и установленной на подвижном столике кюветой для крови (2)

Сигнал с телекамеры (25 кадров/сек) поступал на видеомагнитофон. Использовали объективы, позволяющие вести наблюдение в полях зрения 800x600 мкм, 340x255 мкм и 167x125 мкм.

РОЭ-графия

Для исследований использовали как венозную, так и капиллярную (взятую из пальца) кровь здоровых доноров, а также венозную кровь больных различными заболеваниями, стабилизированную цитратом натрия (3,2%) в соотношении 9:1. С помощью микропипетки пробы крови объемом 180 мкл вносились в лунки иммунологической плашки и перемешивались в течение трех минут на иммунологической качалке при постоянно фиксированном значении числа оборотов. После этого кровь из каждой лунки набиралась в стеклянную пипетку Панченкова с внутренним диаметром 1,0 – 1,3 мм, внешним 5,2 – 5,6 мм, общей длины 150 мм) до высоты 100 мм. Стеклопипетки фиксировали в строго вертикальном положении. Наблюдение за процессом оседания крови проводили с помощью прибора: «Видеоседиментографа». Прибор разработан на основе принципов оптоэлектронной обработки информации, известной как «система технического зрения» (СТЗ) и позволяет регистрировать динамику оседания красной крови с высокой степенью временного разрешения (1 считывание за 30 сек) и в течение длительного периода времени (до 10 часов) [6].

"Видеоседиментограф" состоит из следующих элементов:

1. Сцена анализа – плоский ряд до 10 пипеток с кровью, каждая фиксирована в специальном держателе;
2. Матрица светодиодов зеленого свечения ($\lambda = 567$ нм), фиксированная внутри подсвечивающего экрана со светорассеивающим покрытием для равномерности подсветки. Зеленый свет обеспечивает наилучший контраст расположения границы красная кровь/плазма, так как гемоглобин наименее прозрачен в этой спектральной области.

3. Телевизионная камера с ПЗС матрицей 768×576 пикселей (в двух-полукадровом режиме) со специальным объективом;
4. Телевизионный порт для аналогово-цифрового преобразования и последовательного ввода данных в ПК, оборудованный специальным программным обеспечением.

Программное обеспечение позволяет выполнение многих функций, среди которых: регистрация начальной позиции интерфейса кровь/воздух, и сравнение всех дальнейших изменений в позиции границы красная кровь/плазма с этой стартовой позицией; вычисление мгновенных скоростей оседания; построение графиков временной эволюции граничной позиции относительно соответствующей начальной позиции раздела кровь/воздух (седиментограммы), и графиков изменения скорости – время ($V = f(t)$) (РОЭ-граммы).

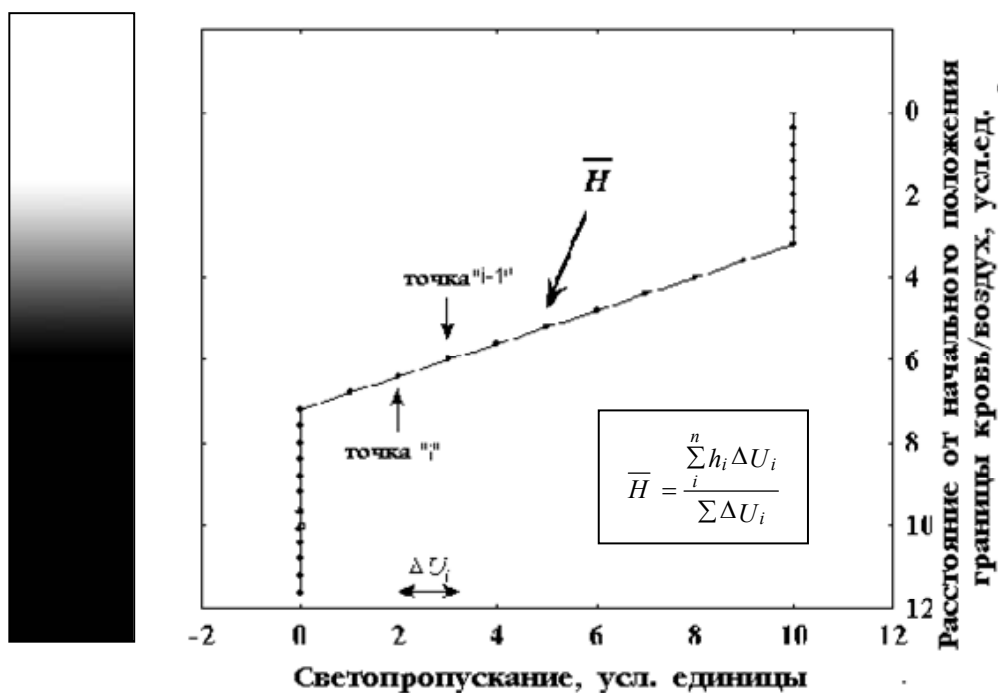


Рис. 2. Схематическое изображение границы красные клетки/плазма и принцип определения ее взвешенного среднего (\bar{H}). h_i - высота в точке «i» фронта, ΔU_i - разность в интенсивности света между точками «i» и «i-1»

Вертикальная фотометрия капилляра с кровью позволяет идентифицировать фактическую позицию границы "красная кровь/плазма", оценивать степень размытости границы, которая не является математической линией и характеризуется многими параметрами. Эта позиция (\bar{H}) была определена как величина средневзвешенного распределения сигнала по фронту, отделяющему непрозрачный столб красной крови и чистой плазмы (см. рис. 2).

Применение расчетного параметра средневзвешенной высоты позволило наблюдать процесс седиментации с высокой достоверностью получаемой информации и следить за всеми происходящими изменениями оптической плотности границы раздела с высокой точностью. Если прибор регистрирует монотонное уменьшение плотности клеток на границе раздела, то графически мы наблюдаем положительную скорость оседания, но если плотность клеток на границе раздела увеличивается, то прибор регистрирует отрицательную скорость седиментации.

Чувствительность аппарата «Видеоседиментограф» и погрешность прибора при измерении положения границы и моментальных скоростей ее движения были вычислены из продолжительных записей изменений положения границы между воздухом и раствором красной краски, набранной в стандартные пипетки. Максимальные вариации "скоростей"

изменения оптической плотности границы за 30-секундные периоды не превышали $\pm 1,5$ мм/час, рассчитанное стандартное отклонение от нулевого значения составляло 0,48%, а вероятность отклонения скорости оседания от нулевого значения на 0,04 мм/час была ниже 5%. Таким образом, полученные в реальных экспериментах с оседающей кровью значения изменений положения границы кровь-плазма и скоростей оседания крови за дискрету времени 30 сек, превышающие указанные выше, высоко достоверны и отражают скорее собственные свойства крови, чем экспериментальные артефакты. Сходимость результатов при параллельной постановке 10 капилляров была рассчитана из данных, полученных при оседании крови, разведенной 1:1 физиологическим раствором. Относительная погрешность измерения уменьшается с увеличением абсолютных значений оседания крови и, при величинах выше $2,45 \pm 0,24$ мм не превышает 10%, а при значениях оседания более $6,1 \pm 0,3$ мм – 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характер процессов, протекающих в крови в вертикально установленных сосудах, отличался в зависимости от того, была ли это плоскопараллельная кювета, тонкий капилляр, закрытый с одного конца или тонкий капилляр, полностью заполненный кровью и герметично закупоренный с обоих концов.

Поведение клеток крови в плоскопараллельной кювете

В открытой плоскопараллельной кювете, заполненной свежесобранной кровью (площадь поверхности крови составляла $10 \times 0,8$ мм), движение форменных элементов начиналось сразу после ее заполнения. Подавляющее большинство форменных элементов представляло собой ассоциаты эритроцитов, которые в первые несколько минут быстро передвигались вдоль границы между оседающей массой клеток и освобождающейся от них плазмы. При этом горизонтальная скорость передвижения отдельных эритроцитов превышала 50 мкм/сек. Фрагмент видеопленки, иллюстрирующей эту картину, представлен на рис. 3. Между более темными областями, окаймляющими кадры сверху и снизу, заключена более светлая область. В ней видны отдельные эритроциты (один из них на первых четырех кадрах отмечен стрелкой) и их ассоциаты, включающие в себя очень большое число клеток (один из таких ассоциатов помещен в круг). Нижняя темная область – граница между оседающей массой клеток и просветляющейся плазмой исчезает из поля зрения после 5-го кадра.

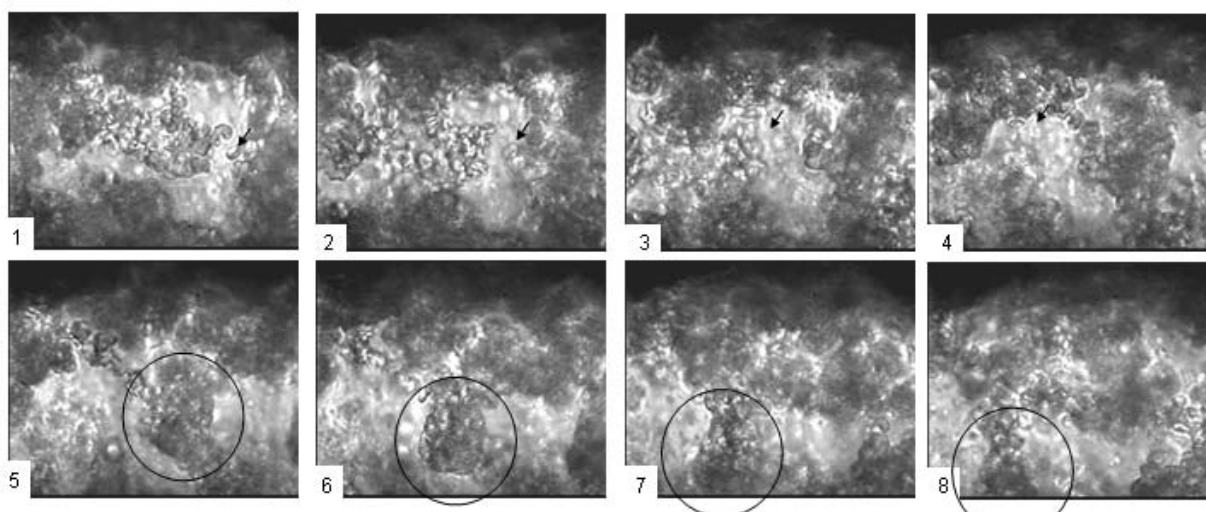


Рис. 3. Фрагмент видеофильма, иллюстрирующий движение форменных элементов цельной крови через 3 минуты после внесения крови в плоскопараллельную кювету. Промежуток между отдельными кадрами – 2 сек., размеры кадра: 167x125 мкм. На кадрах 1-4 стрелкой отмечен один из эритроцитов, движущийся справа налево и несколько вверх; на кадрах 5-8 в кружке заключен ассоциат из многих эритроцитов, движущийся справа налево и постепенно спускающийся вниз

В этом фрагменте видно, что эритроциты и их ассоциаты движутся в основном однонаправленно, справа налево. Большая часть крупных ассоциатов имеет тенденцию двигаться вниз, но некоторые ассоциаты, а особенно отдельные эритроциты всплывают наверх. Именно они формируют верхнюю темную область, которая сохраняется достаточно длительное время после начала оседания основной массы клеток и их ассоциатов.

Постепенно граница между оседающей массой форменных элементов крови и плазмой становится более четкой, но при этом она постоянно нарушается за счет выброса из нее отдельных клеток и даже крупных их ассоциатов. Пример такого «бурления» крови приведен в Видеофильме 1. Здесь хорошо заметно, что движение форменных элементов крови в светлой области имеет турбулентный характер, создающий впечатление «вьюги» (см. Видеофильм 1, 100 кадров/сек, 11 – 12 минут после начала наблюдения). Тогда как общая масса клеток опускается вниз, выброшенные из нее ассоциаты поднимаются вверх и относительно долго находятся во взвешенном состоянии. Нередко в одном поле зрения можно наблюдать, что один из ассоциатов находится во взвешенном состоянии, тогда как другой, находящийся рядом с ним опускается вниз под действием силы тяжести. При просмотре видеофильма видно также, что некоторые мелкие ассоциаты и отдельные частицы всплывают вверх, полностью исчезая из кадра.

Встречное движение отдельных частиц хорошо видно в плазме крови в нескольких миллиметрах над оседающей границей между плазмой и эритро массой (рис. 4). В одном поле зрения можно наблюдать седиментацию группы эритроцитов (заключены в круг), отдельного эритроцита (вертикально направленная стрела в правом верхнем углу) и флотацию мелких частиц, выглядящих как яркие пятнышки в проходящем свете. Начальное положение одной из таких частиц отмечено маленькой стрелкой №1. Заметно увеличение расстояние между кончиком вертикально направленной стрелкой и частицей за 10 сек наблюдения. Также бурный восходящий поток светлых частиц хорошо виден в кадрах Видеофильма 1.

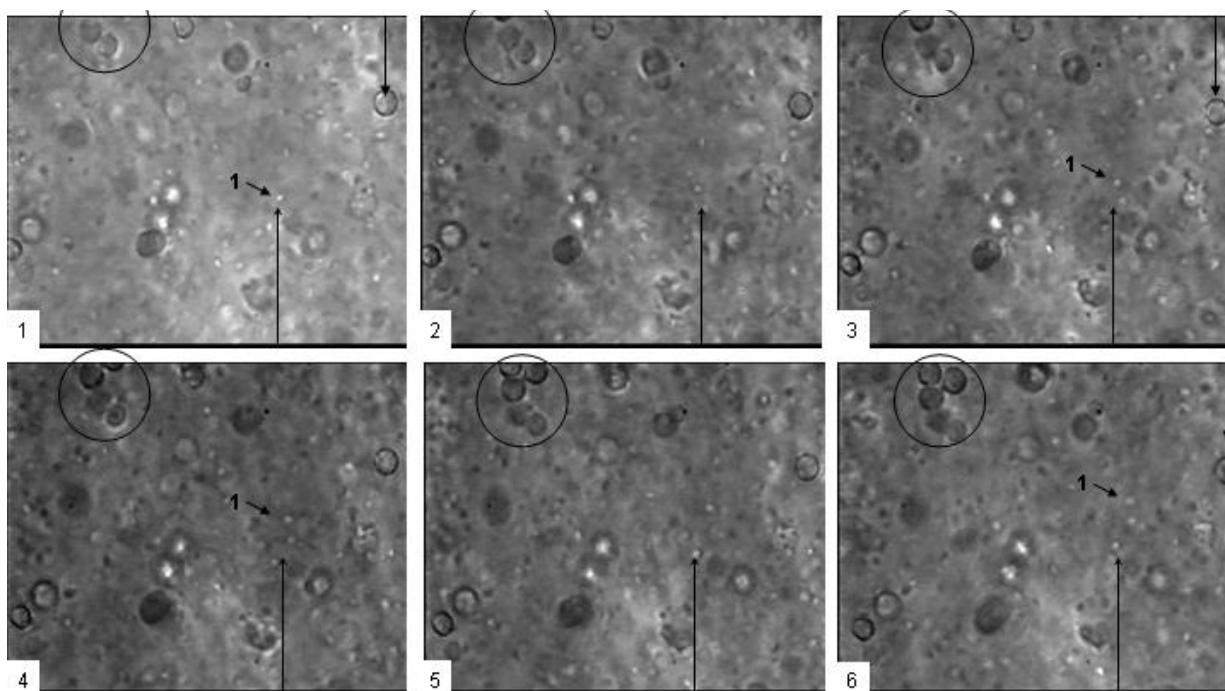


Рис. 4. Движение форменных элементов в плазме на высоте нескольких миллиметров от границы плазма/эритро масса через 20 мин после начала оседания. Промежуток между кадрами (167x125 мкм) – 2 сек. В кружке – группа оседающих эритроцитов; стрелка направленная вниз в правом верхнем углу указывает на

отдельный оседающий эритроцит. Маленькой стрелкой №1 выделена одна из флотирующих мелких частиц (это видно по изменению ее положения относительно кончика направленной вверх стрелки).



Видеофильм 1

Поведение клеток крови, помещенной в узкий капилляр

Кадры Видеофильма 2 (скорость 150 кадров/с, размер кадра 340×255 мк) демонстрируют движение частиц и их ассоциатов в крови, помещенной в узкий капилляр (первые 3 мин оседания эритромаcсы в капилляре).

Отрыв границы между плазмой и оседающими форменными элементами крови в капилляре происходит позднее, чем в плоскопараллельной камере. В течение некоторого времени граница остается довольно четкой, однако примерно через 4 мин после начала установки капилляра на столик микроскопа у стенки капилляра возникает восходящий ток жидкости, увлекающий за собой эритроциты и их ассоциаты различного размера. Тяжелые частицы выбрасываются на границу раздела плазма/эритромаcса. В восходящем потоке видны светлые частицы. Со временем их число и размеры растут, как возрастает и интенсивность потока, прорывающегося вверх у стенки капилляра. При просмотре этого видеофильма заметно, что концентрация рассеивающих свет частиц у стенки капилляра в чистой плазме со временем увеличивается, причем многие из них возникают в этом районе, по-видимому, спонтанно, увеличиваясь после появления в размерах.

С появлением восходящего тока вдоль стенки капилляра скорость оседания границы плазма/эритромаcса резко возрастает. В данном случае – с 18 мкм/мин до 40 мкм/мин с тенденцией к дальнейшему увеличению скорости.

Было отмечено также, что положение мениска – границы между кровью (плазмой) и воздухом, который виден в верхней части кадров как обращенная вниз черная полусфера,

также меняется. За 4 минуты наблюдения мениск опустился на 6,5 мкм. За это же время граница между плазмой и эритро массой опустилась на 100 мкм.

Поведение клеток крови в герметично закрытом капилляре. Если капилляр заполняли кровью и затем изолировали от контакта с атмосферным воздухом, оседание границы плазма/эритро масса происходило намного медленнее, чем той же крови в открытом капилляре. Телерегистрация поведения крови в закрытом капилляре показала, что «бурление» на границе эритро масса/плазма практически отсутствует, а сама граница формируется очень долго и даже после длительного периода времени выглядит намного более рыхлой, чем в капилляре с открытым верхним концом. На рис. 5 приведены типичные графики регистрации изменения положения границы эритро масса/плазма в двух одинаковых капиллярах, в которые одновременно набрали одну и ту же кровь. Видно, что скорость оседания границы в капилляре с открытым верхним концом резко возрастает между 15-й и 20-й минутами регистрации, тогда как в закрытом капилляре она в этот же период возрастает незначительно.

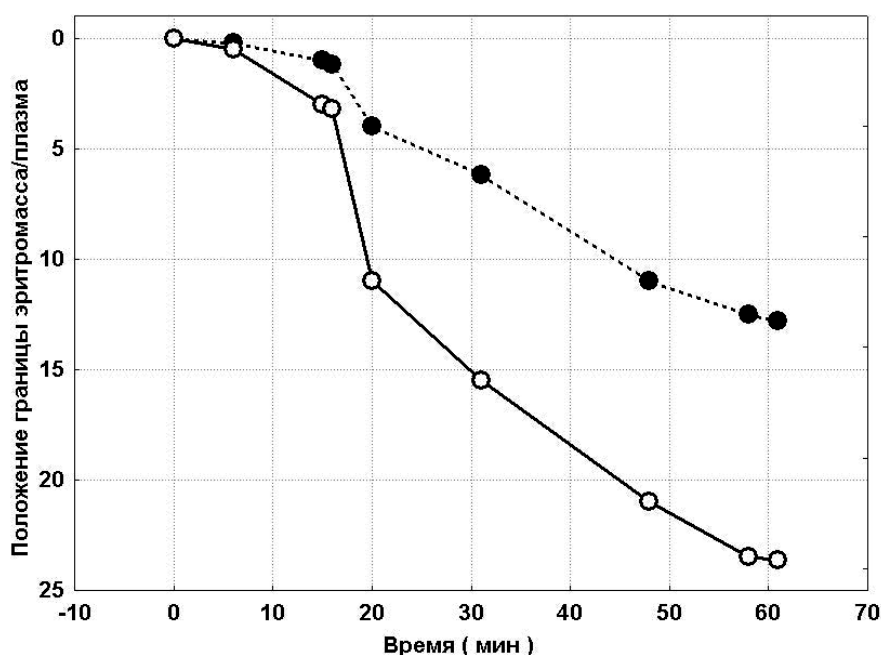


Рисунок 5. Динамика оседания границы эритро масса/плазма в двух одинаковых капиллярах заполненных одной и той же кровью. --- Капилляр изолирован от атмосферы; — о — кровь в контакте с воздухом. Положение границы регистрировали относительно исходного уровня крови на фотографиях капилляров, сделанных в указанные моменты времени после набора в капилляры крови и их установки в вертикальном положении.

РЕГИСТРАЦИЯ ДИНАМИКИ ОСЕДАНИЯ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ «ВИДЕОСЕДИМЕНТОГРАФА».

Применение прибора «Видеоседиментограф» с его программным обеспечением позволило графически отобразить многие визуально наблюдаемые явления, происходящие в оседающей цельной крови.

На рис. 6 представлена типичная РОЭ-грамма, полученная при видеорегистрации оседания цельной крови здорового пациента. Многочисленные проведенные эксперименты с кровью здоровых доноров и больных различными заболеваниями позволили выделить несколько макрокинетических периодов оседания крови: лаг-период, в течение которого кровь вообще не оседает [τ_1]; период [τ_2] – постепенное ускорение оседания; период [τ_3] со скачкообразным увеличением средней скорости процесса и период [τ_4], где СОЭ достигает своего максимума и постепенно снижается. При этом длительность и выраженность периодов зависит от физиологического состояния индивидуума (см. рис.7). Как правило, при

ухудшении состояния здоровья наблюдается «левый сдвиг», проявляющийся в укорочении всех регистрируемых периодов, тогда как у здоровых доноров, например, «лаг-период» может длиться десятки минут.

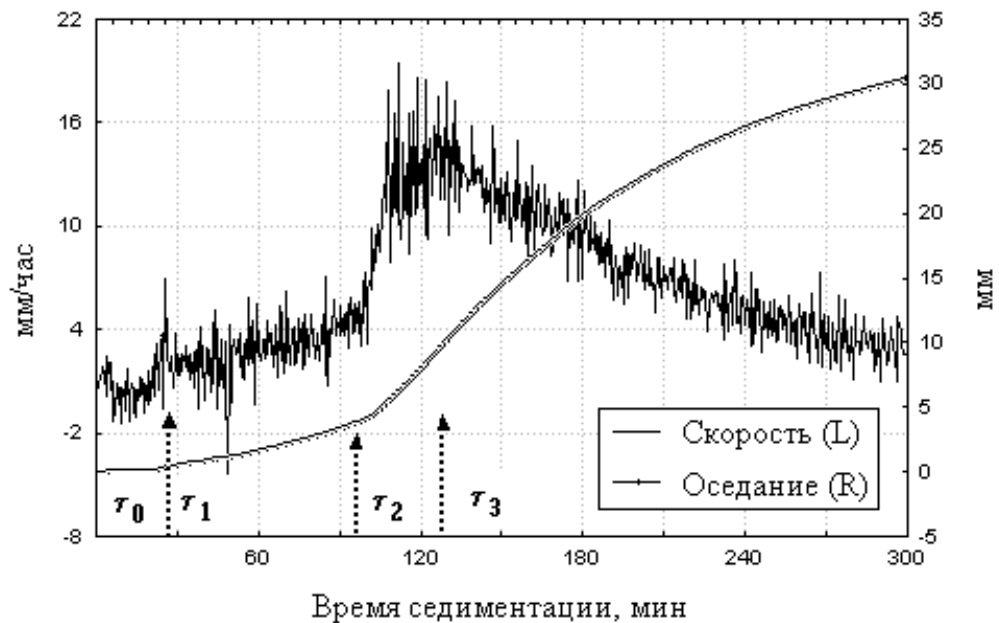


Рис. 6. Характерные этапы динамики оседания крови практически здорового донора, представленные на РОЭ-грамме (скорость, левая ось ординат) и седиментограмме (положение границы, правая ось ординат)

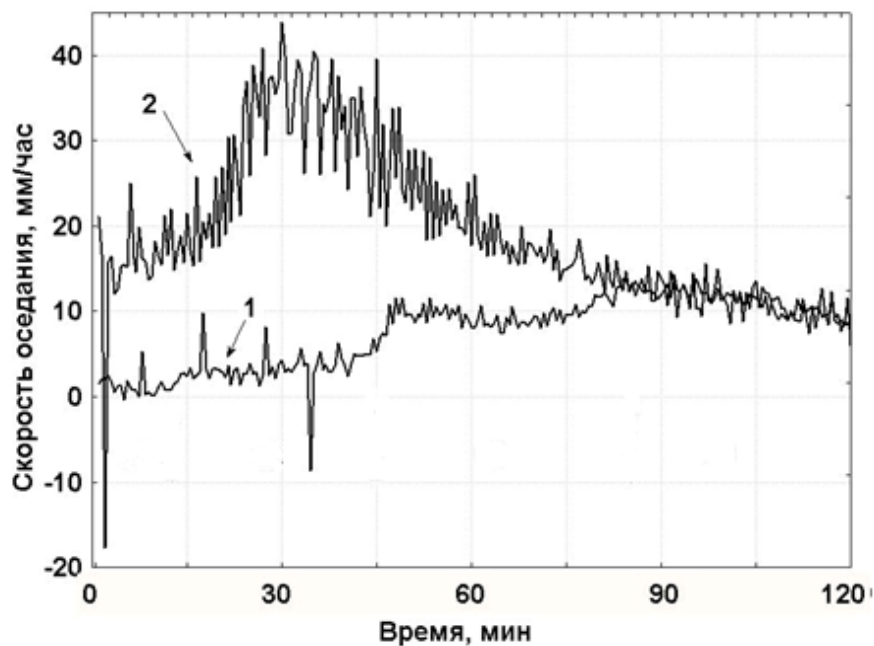


Рис. 7. Динамика оседания красной крови (РОЭ-грамма) практически здорового донора (кривая 1) и больного диабетом (кривая 2)

Также мы наблюдали укорочение всех периодов (особенно «лаг-периода») при уменьшении высоты столбика крови, набираемой в капилляр, либо даже при незначительном его наклоне.

Кроме того, на полученных РОЭ-граммах хорошо видно что явления, наблюдаемые визуально при телерегистрации, нашли свое отражение в характере микрокинетики процесса. На дифференциальной кривой скорости движения границы (РОЭ-грамме) это

проявляется в отклонениях реальной скорости процесса от средних значений, то есть в возникновении периодических колебаний. В результате и получается РОЭ-грамма, характерная для конкретного индивидуума. Эти колебания скорости могут быть разной частоты и интенсивности и носить периодический характер. При этом, при параллельной постановке нескольких пипеток с кровью одного и того же индивидуума мы отметили удивительное подобие (хотя и не тождество) в колебательном поведении моментальных скоростей оседания крови в независимых пипетках.

На большинстве полученных РОЭ-грамм, и, соответственно, на уже представленных выше рисунках, отразились и наблюдаемые визуально явления вымывания оптически плотных частиц и их агрегатов вверх, на границу между оседающими клетками и плазмой. Такое регистрируемое «уплотнение» границы на полученных РОЭ-граммах выглядит как скачкообразная «отрицательная скорость седиментации». Такие скачки возникают наиболее часто на начальной стадии оседания крови. В этот период оседания граница между красными клетками и плазмой обычно очень четкая, с минимальным разбросом моментальных скоростей оседания. Кривые временной эволюции граничной позиции демонстрируют, что события «отрицательной скорости седиментации», видимые на РОЭ-грамме, отражают действительное быстрое поднятие границы также потому, что после этого граница начинала снижаться с новой, более высокой позиции (см. рис.8).

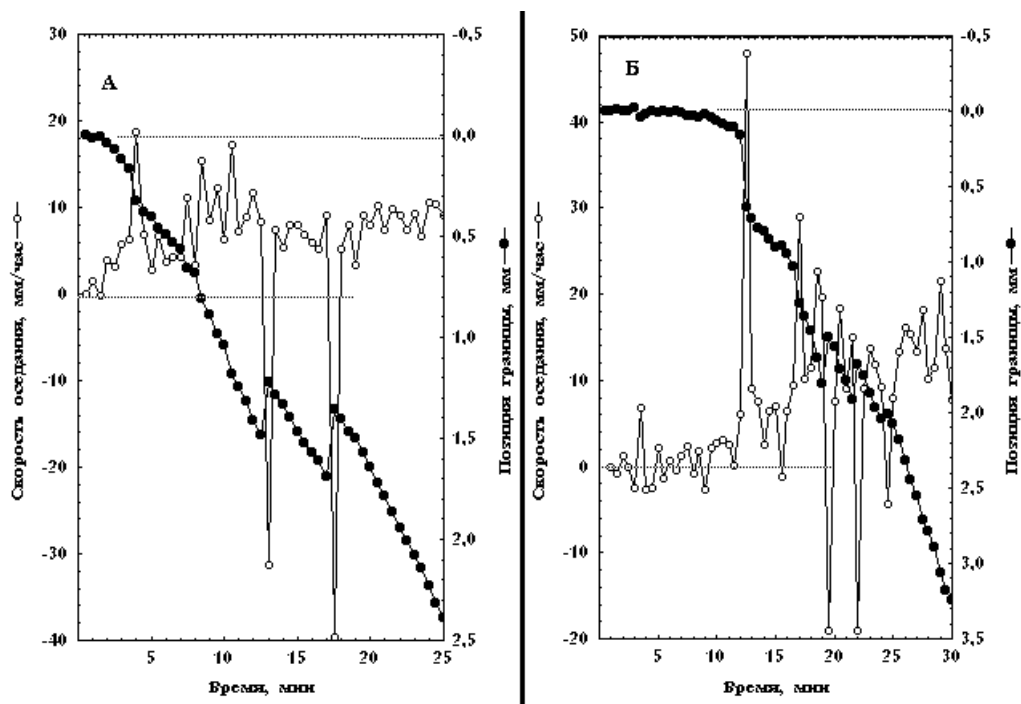


Рис. 8. События «отрицательной скорости седиментации» в пробах крови доноров с различными заболеваниями: А – хроническим бронхитом и Б - остеохондрозом. Кривые 1 – РОЭ-граммы (левые оси-Y), кривые 2 – временная эволюция граничной позиции (правые оси-Y)

Интересной частью работы было также наблюдение за характером оседания клеток крови у больных ИБС в дни с повышенной геомагнитной активностью и во время геомагнитных бурь, когда состояние пациентов существенно ухудшалось. В такие дни характер РОЭ-грамм всех пациентов сильно менялся по сравнению с тем, что наблюдался в «спокойные» дни. Типичный набор РОЭ-грамм больного Д., полученных в дни с различной геомагнитной активностью, приведен на рис. 9. На этом рисунке все РОЭ- и седиментограммы представлены в одних координатах. И, можно заметить, как многократно увеличился разброс мгновенных скоростей оседания относительно средних значений при том, что стандартный показатель измерения скорости оседания красных клеток крови за 1 час (см положение границы) в эти дни практически не менялся.

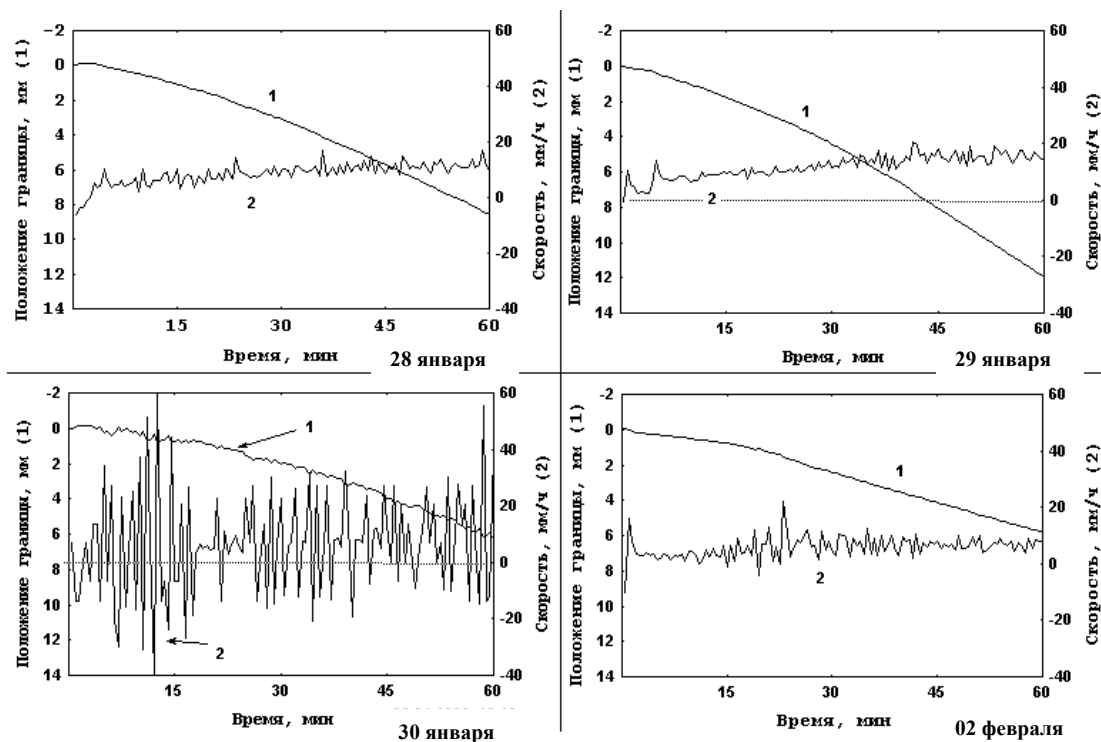


Рис. 9. РОЭ-граммы и графики изменения положения границы красная кровь/плазма, полученные в 4 разных дня для крови пациента Д. 30 января – день геомагнитной бури

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Наблюдения за процессами, протекающими в цельной, стабилизированной от свертывания крови, помещенной в сосуды, в которых форменные элементы крови должны оседать в плазме под действием силы тяжести свидетельствуют, что разворачивающиеся в крови события имеют мало общего с обычной седиментацией взвешенных частиц, плотность которых выше, чем плотность среды. В рамках стандартных представлений о седиментации эритроцитов трудно объяснить и обнаруженную нами зависимость длительности лаг-периода, а также других выявленных периодов динамики оседания крови от физиологического состояния индивидуума. Кроме того, явления «отрицательной скорости седиментации», регистрируемые пульсации мгновенных скоростей оседания, восходящий ток плазмы и клеток вдоль стенки пипетки отражают активные процессы, происходящие во всем объеме оседающей крови.

Полученные в данной работе результаты говорят о нелинейном, немонотонном, динамическом и кооперативном характере процесса оседания человеческой крови. Эти явления были уже отмечены нами и другими авторами [7 – 15].

При этом все регистрируемые явления находят логичное объяснение, если рассматривать кровь как сложную систему, состоящую, как минимум из трех фаз: плазмы, клеточных компонентов и газовой фазы в виде нано- и микропузырьков. Ранее было показано, что как только поток крови в организме замедляется или останавливается, ассоциаты эритроцитов формируют длинные «монетные столбики» или рулоны, которые объединяются друг с другом, формируя трехмерную сеть [16].

Прочность образовавшейся клеточной сети, по всей видимости, определяется качественным и количественным составом участвующих в ее формировании фаз. В частности, составом и соотношением компонентов плазмы, свойствами мембран эритроцитов, насыщенности их кислородом и способности отдавать его другим клеткам, уровнем метаболической активности кислород-потребляющих клеток, а также скоростью высвобождения микропузырьков газов. При многих патологических состояниях эритроциты

объединяются в конгломераты, «сладжи», имеющие неправильную форму и нарушающие таким образом устойчивость клеточной фазы [17].

Основные газы, присутствующие в крови – это кислород (практически полностью ассоциированный с гемоглобином), углекислый газ (также связанный эритроцитами в виде бикарбоната) и азот. Содержание азота во вдыхаемом воздухе составляет более 79%, а растворимость в воде мало отличается от растворимости кислорода. По-видимому, азот представляет собой основной газ, который способен образовывать нано- и микропузырьки, а также существовать в виде газового слоя на границе между водной фазой и твердыми компонентами крови.

Насколько нам известно, впервые идея о том, что газы в нормальных физиологических условиях могут выделяться в отдельную газовую фазу (микропузырьки) в крови, была высказана А.И. и С.А. Гончаренко [18]. Они исходили из давно известных анатомам и физиологам человека фактов о том, что емкость сосудистой системы превышает максимальный объем крови в несколько раз и что объем крови в организме может быстро меняться в зависимости от физиологического состояния и нагрузок. Непротиворечивых объяснений этим феноменам не существует, и в литературе по физиологии крови и сердечно-сосудистой системы явление переменного объема крови в организме человека практически не обсуждается.

Хорошо известно, что при резком снижении давления в крови могут возникать газовые пузырьки, которые могут вызывать газовую эмболию, что является одной из причин кессонной болезни. Сравнительно недавно выяснилось, что микроскопические газовые пузырьки могут возникать в крови при действии ультразвука или при облучении крови лазером [19 – 21]. Исходя из того, что образование и схлопывание газовых пузырьков в жидкости сопровождается возникновением интенсивных энергетических явлений, вплоть до появления световых вспышек (сонолюминесценция), кавитацию в крови рассматривают исключительно с точки зрения их повреждающего действия [22, 23].

В настоящей работе впервые показано, что такие пузырьки существуют в свежeweделенной крови. Их присутствие проявляется особенно ярко, когда кровь помещена в плоскопараллельную кювету с достаточно большим отношением площади поверхности контактирующей с воздухом крови, к высоте столбика крови. В этом случае гидростатическое давление столба жидкости невелико, что способствует росту пузырьков, а большая площадь поверхности обеспечивает быструю эвакуацию из крови газа. Все это наглядно иллюстрируют явления «вьюжного» движения частиц над формирующимся слоем оседающей эритроцитной массы, наблюдаемые в первые моменты после начала оседания, бурление поверхностного слоя эритроцитной массы, разнонаправленные движения частиц в плазме высоко над слоем эритроцитной массы (рис. 3, Видеофильм 1, 2).

В тонком капилляре процесс оседания эритроцитной массы выглядит по-другому из-за значительно меньшего отношения площади контактирующей с воздухом поверхности крови к высоте ее столбика. Более высокое гидростатическое давление в нижней части капилляра, небольшая площадь поверхности тормозят рост присутствующих в крови пузырьков, а освобождение газов становится возможным только за счет тока обогащенной пузырьками и «газированными» частицами вдоль стенки капилляра. Из-за этого выделение газов наблюдается после латентного периода, в течение которого плавучесть пузырьков достигает, по-видимому, критического значения, позволяющего им пробиваться вверх сквозь вязкую эритроцитную массу. Также резкое ускорение оседания эритроцитов даже при незначительном наклоне пипетки или при уменьшении высоты столбика крови вполне объяснимо с точки зрения уменьшения гидростатического давления и ускорения освобождения газов из крови.

Наблюдения за оседанием крови в капиллярах впервые позволило подтвердить высказанное ранее положение [18] и о том, что объем крови обусловлен не только объемом ее жидкой фазы и твердыми включениями в ней, но и газовой фазой переменного объема: опускание мениска на границе между кровью и воздухом однозначно свидетельствует об уменьшении объема набранной в капилляр крови в процессе ее оседания. Сравнение

поведения крови при ее оседании в герметичных капиллярах и при наличии контакта с атмосферой показывает, что одним из существенных факторов в скорости оседания эритроцитов, определяемом в стандартном тесте СОЭ является освобождение из крови газов. Другими словами, плавучая плотность взвешенных в плазме твердых частиц – это величина переменная, определяемая не только и не столько средневзвешенной плотностью их молекулярных компонентов, но и захваченной этими частицами газовой фазой. Чем больше объем сорбированного на частице газового слоя, чем ниже плотность газа, тем ниже плотность частицы. Поэтому частица, будь то белковая и протеолипидная мицелла, клетка крови или агрегат клеток могут как оседать, так и всплывать в плазме, что хорошо видно по встречному движению частиц в одном и том же поле зрения микроскопа.



Видеофильм 2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие того, что кровь человека представляет собой не сплошную жидкую коллоидную систему, а многофазный коллоид, существенная часть которого представлена дисперсной газовой фазой, требует переосмысления многих представлений гематологии, реологии, физиологии сердечно-сосудистой системы и разработки моделей крови, учитывающих ее особые газо-жидкостные свойства

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ

- λ – длина волны, нм;
- V – скорость, мм/ч;
- f – функция;
- t – время, сек, мин, час;
- \bar{H} – взвешенное среднее, мм;
- h_i – высота в точке «i» фронта расслоения фаз, мм;

ΔU_i – разность в интенсивности света (светопропускание) между точками «i» и «i-1», у.е.;
 $\tau_1 - \tau_4$ – выделенные макрокинетические периоды оседания, мин;

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Чижевский А.Л.**, Биофизические механизмы реакции оседания эритроцитов. // Наука, -Новосибирск, 1980, -С.4.
2. **Steck T.L., Dawson G.** Topographical distribution of complex carbohydrates in the erythrocyte membrane. // J. Biol. Chem., 1974. -V. 249. -P. 2135-2142.
3. **Fabry T.L.**, Mechanism of erythrocyte aggregation and sedimentation. Blood, v.70, N5, 1987, P.1572-6.
4. **Ismailov R.M., Shevchuk A.N., Khusanov H.** Mathematical model describing erythrocyte sedimentation rate. Implications for blood viscosity changes in traumatic shock and crush syndrome. // Biomed Eng Online. 2005; 4: 24, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1090599/>
5. **Балаховский С.Д.** Реакция оседания эритроцитов. // ГИЗ, -М.-Л., 1928. -С. 136.
6. **Воейков В.Л., Гурфинкель Ю.И., Дмитриев А.Ю., Кондаков С.Э.** Способ контроля физиологического состояния человека. // Патент РФ № 2,103,672, 1998а. 27 янв.
7. **Бабкин А.П., Зыков П.М.** Установка для автоматической регистрации РОЭ и ее применение в кардиологии. // Электроника и химия в кардиологии, -Воронеж, 1976. -В. 9. -С. 69-72.
8. **Пирузян Л.А., Серeda А.П., Юртаев В.В., Ломоносов В.А., Голиков Ю.В.** Биомедицинские подходы к электрокинетической характеристике осаждения эритроцитов. // Известия Академии наук СССР, серия Биологическая, 1989. -№4. -С. 522-526.
9. **McKinney D.K., Fuller M.E., Carone V.V.** Apparatus for sedimentation based blood analysis. // US Pat. № 5,575,977, -Nov.19, 1996.
10. **Воейков В.Л., Дмитриев А.Ю.** Биофизические механизмы реакции оседания эритроцитов. Биофизика, 1998, 43, С. 575-579.
11. **Воейков В.Л., Гурфинкель Ю.И., Дмитриев А.Ю., Кондаков С.Э.** Немонотонные изменения скорости оседания эритроцитов в цельной крови. Доклады РАН, 1998, 359, С.1-5.
12. **Kondakov S.E., Voeikov V.L., Gurfinkel Yu.I., Dmitriev A.Yu.** Dynamics of erythrocyte sedimentation rate as a new diagnostic tool. In: "Optical Diagnostics of Biological Fluids III". Eds. A. V. Priezhev, T.Asakura, and J.D. Bries. SPIE Proc., 1998, Vol. 3252, San Jose, CA, P. 54-61.
13. **Voeikov, V.L., Kondakov, S. E., Buravleva, E., Kaganovsky, I., Reznikov, M.** Computerized video-enhanced high temporal resolution of erythrocytes sedimentation rate (ESR-graphy) reveals complex dynamic and self-organizing properties of whole blood. In: Optical Diagnostics of Biological Fluids V, Alexander V. Priezhev; Toshimitsu Asakura; Eds. Proc. SPIE, 2000, Vol. 3923, P. 32-43.
14. **Voeikov V.L., Buravleva E.V., Bulargina Yu.S, Gurfinkel Yu.I.** Diagnostic applications of an optoelectronic device for high temporal resolution of erythrocyte sedimentation (ESR-graphy). In: Hybrid and Novel Imaging and New Optical Instrumentation for Biomedical Applications, Albert-Claude Voccaro; Alexander A. Oraevsky; Eds.Proc. SPIE, 2002, Vol. 4434, P. 208-218.
15. **Voeikov V.L., Buravleva E.V., Kondakov S.E.** Blood as an active colloidal system: The nonlinear nature of erythrocyte sedimentation in whole blood revealed by video recording with high spatial-temporal resolution // *Moscow University Chemistry Bulletin*, издательство Allerton Press Inc. (United States), 2011, том 66, № 4, С. 259-264.
16. **Левтов В. А., Регирер С.А.** Реология крови. // Медицина, -М., 1982. -С. 49-50.
17. **Talsta I., Scheie P., Dalen H., Roli J.** Influence of plasma proteins on erythrocyte morphology and sedimentation. // Scand. J. Haematol., 1983. -V. 31. -P. 478-484.
18. **Гончаренко А.И., Гончаренко С.А.** Феномены кровообращения. Дельфис, 2004, №1 (37), 112-118.

19. **Ivey J. A., Gardner E. A., Fowlkes J.B., Rubin J. M., and Larson P. L.** Acoustic generation of intra-arterial contrast boluses. *Ultrasound in Med. & Biol.*, 1995, 21, P. 757 – 767.
20. **Grunkemeier J.M., Gregory K.W.** Acoustic Measurements of cavitation bubbles in blood, contrast and saline using an excimer laser: implications for laser atherectomy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 1992, (Suppl) 4:16.
21. **Brujan E.-A.** Collapse of cavitation bubbles in blood. *Europhys. Lett.*, 2000, 50 (2), P. 17.
22. **Rooney J. A.** Hemolysis near an ultrasonically pulsating bubble. *Science*, 1970, 169, P. 869 – 871.
23. **Dalecki D., Child S. Z., Raeman C. H., Xing C., Gracewski S., and Carstensen E. L.** Bioeffects of positive and negative acoustic pressures in mice infused with microbubbles. *Ultrasound in Med. & Biol.*, 2000, 26, P. 1327 – 1332.

Voeikov V.L., Buravleva E.V., Novikov K.N.

*Moscow State University of Lomonosov, Faculty of Biology, Moscow, Russian Federation
119234, Moscow, GSP-1, Leninskie Gory, d.1, pp.12, E-mail: vvl@soil.msu.ru*

APPLICATION VIDEO RECORDING WITH HIGH SPATIAL AND TEMPORAL RESOLUTION TO DETECT NONMONOTONIC CHARACTER OF WHOLE BLOOD SEDIMENTATION

ABSTRACT

Through the use of the principles of vision systems for detailed analysis of the kinetics of sedimentation of red blood cells nonlinear dynamic characteristics of the process were identified. Video recording of sedimentation of whole blood cells was performed in a glass pipette and a rectangular glass cuvette with a color camera with a resolution of 470 lines, 0.1 lux and photosensitivity at 25 frames/sec. An automatic computerized device allowing to record the dynamics of sedimentation of red blood cells with high temporal resolution was also used. Position of the boundary between the red cells and plasma can be recorded every 30 seconds for several glass pipettes simultaneously within + - 10 microns. Data are processed by the computer and presented in the form of ESR-gram (speed-time graphs) and curves that describe the time evolution of settling of erythrocyte/blood plasma boundary. As a result, macrokinetic sedimentation patterns in whole blood have been identified. Dynamic changes in the blurriness of the boundary that exhibits it self in the oscillatory nature of changes in the speed of the process, the phenomenon of "negative sedimentation" detected. Video process has allowed to detect the nano- and micro-bubbles of gas released from the blood in the process of settling. Active motion of the plasma up along the settling mass of red cells leads to the active movement of cells and gas bubbles against the forces of gravity, on the border between the red blood cells and plasma. A hypothesis representing the blood as a complex system consisting of at least three phases: plasma, cellular components and the gas phase, which appeals to a revision of many concepts of hematology, rheology, cardiovascular physiology.

BLOOD, ERYTHROCYTE SEDIMENTATION RATE, NONLINEAR DYNAMICS, THE GAS PHASE, THREE-PHASE SYSTEM, GEOMAGNETIC STORMS