

УДК 535.421

С. Ю. Никитин, В. Д. Устинов, А. Е. Луговцов, М. Д. Лин, А. В. Приезжев, Ю. С. Юрчук

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

ИЗМЕРЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ДЕФОРМИРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ДИФРАКТОМЕТРИИ В СДВИГОВОМ ПОТОКЕ

АННОТАЦИЯ

Рассматривается проблема измерения одного из важных реологических параметров крови – распределения эритроцитов по деформируемости. Обсуждаются алгоритмы измерения параметров этого распределения на основе метода лазерной дифрактометрии эритроцитов в сдвиговом потоке.

ЭРИТРОЦИТЫ, ДЕФОРМИРУЕМОСТЬ, ЛАЗЕРНАЯ ДИФРАКТОМЕТРИЯ, СДВИГОВЫЙ ПОТОК

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важных реологических параметров крови является деформируемость эритроцитов, определяемая как мера способности этих клеток изменять свою форму под действием внешних сил. Этот параметр существенно влияет на эффективную вязкость и характер микроциркуляции крови в органах и тканях человеческого организма. Для измерения деформируемости эритроцитов используют разные методы. Это метод втягивания эритроцитов в микропипетку, метод механической фильтрации, метод лазерного пинцета, метод реоскопии [1]. В методе реоскопии с помощью микроскопа наблюдают деформацию эритроцитов в сдвиговом потоке [2, 3]. В таком потоке за счет сил вязкого трения эритроциты приобретают форму, близкую к эллипсоидальной (рис. 1). Мерой деформации эритроцитов является отношение длины эллипсоида (a) к его ширине (b):

$$\delta = a/b. \quad (1)$$

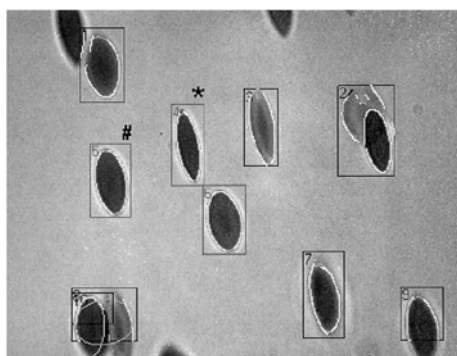


Рис. 1. Изображение эритроцитов человека в сдвиговом потоке, полученное с помощью микроскопа при сдвиговом напряжении 10 Па [2, 3]

Однако все перечисленные методы трудны в практической реализации и требуют много времени для проведения измерений. Более простым на наш взгляд является метод лазерной дифрактометрии эритроцитов в сдвиговом потоке, называемый также лазерной эктацитометрией. Здесь, как и в реоскопии, деформация эритроцитов осуществляется в сдвиговом потоке силами вязкого трения. Однако наблюдение за изменением формы клеток ведется не с помощью микроскопа, а путем регистрации и анализа дифракционной картины, возникающей при рассеянии лазерного пучка на суспензии эритроцитов. Схема лазерного эктацитометра показана на рис. 2.

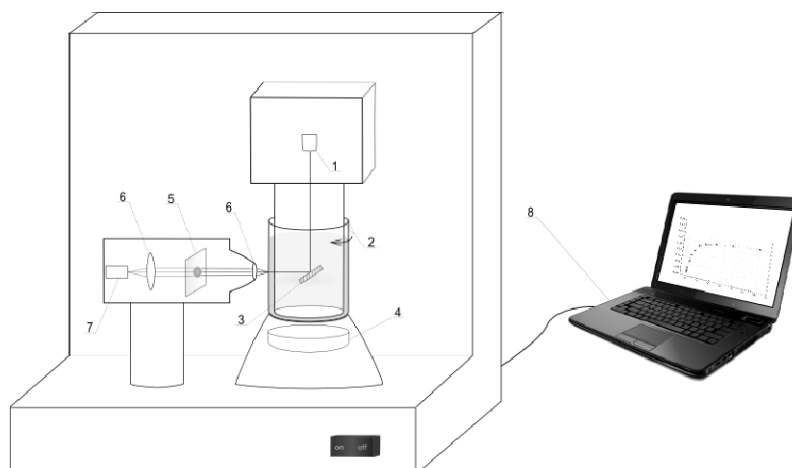
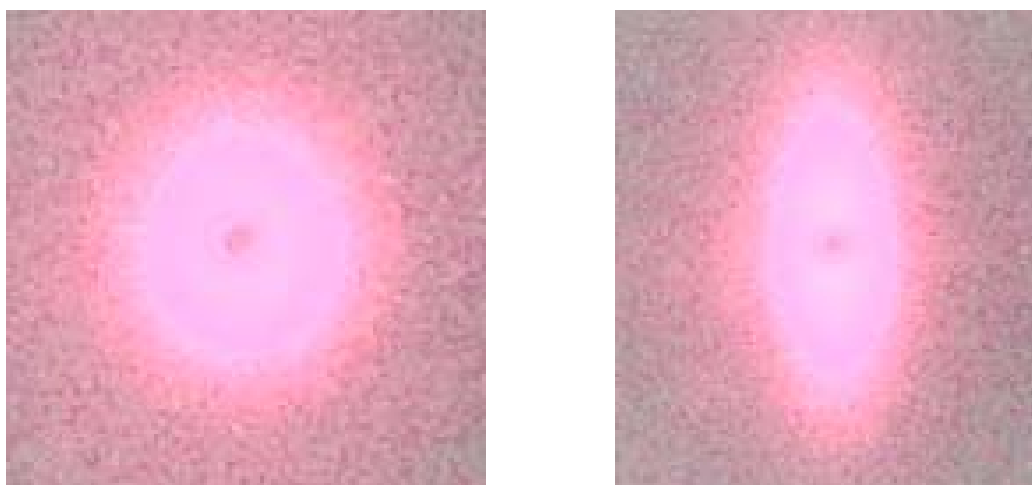


Рис. 2. Схема лазерного эктацитометра. 1 – диодный лазер, 2 – ячейка Куэтта, 3 – зеркало, 4 – шаговый двигатель, 5 – экран наблюдения, 6 – линза, 7 – видеокамера, 8 – компьютер

Основными элементами прибора являются лазер, ячейка Куэтта, видеокамера и компьютер. Ячейка Куэтта образована двумя коаксиальными стаканами из оптического стекла, один из которых неподвижен, а другой может вращаться с заданной угловой скоростью. В зазор между стенками стаканов (называемый реологическим зазором) наливают сильно разбавленную суспензию эритроцитов, после чего подвижный стакан приводят во вращение. Вращение стакана вызывает течение жидкости и появление в ней сдвиговых напряжений, которые деформируют эритроциты и ориентируют их вдоль направления потока (рис. 1). Суспензию просвечивают лазерным лучом и наблюдают на экране картину рассеяния света (дифракционную картину), которая несет в себе информацию о форме эритроцитов в сдвиговом потоке. Дифракционная картина снимается на видеокамеру и передается в компьютер, где обрабатывается по определенному алгоритму. Достоинством метода лазерной эктацитометрии является то, что он позволяет получать информацию сразу о большом количестве клеток (около 10000) и не требует применения микроскопа.

Типичные дифракционные картины показаны на рисунке 3. Видно, что увеличение сдвигового напряжения меняет форму центрального дифракционного максимума, что говорит об изменении формы эритроцитов в ячейке Куэтта. Метод лазерной эктацитометрии был предложен в 1975 году Бессис и Мохандас [4] и с тех пор используется без существенных изменений, позволяя измерять лишь среднюю деформируемость эритроцитов в исследуемом образце крови. Однако в крови здорового, а тем более больного человека разные эритроциты обладают разной способностью к деформации.



а

б

Рис. 3. Дифракционные картины, полученные от разбавленной суспензии эритроцитов при низком (а) и высоком (б) сдвиговых напряжениях

Это хорошо видно из рис. 4, на котором показаны распределения эритроцитов по деформируемости в крови здоровых людей и пациентов с различными заболеваниями. Данные представленные на этом рисунке, получены методом реоскопии [2, 3]. Видно, что в норме распределение эритроцитов по деформируемости близко к нормальному (гауссову) распределению, а стандартное отклонение деформируемости эритроцитов от среднего значения составляет около 15%. В то же время у пациентов с серповидно-клеточной анемией и эллиптоцитозом средняя деформируемость эритроцитов уменьшена, стандартное отклонение деформируемости от среднего значения увеличено, а форма распределения отличается от гауссовой.

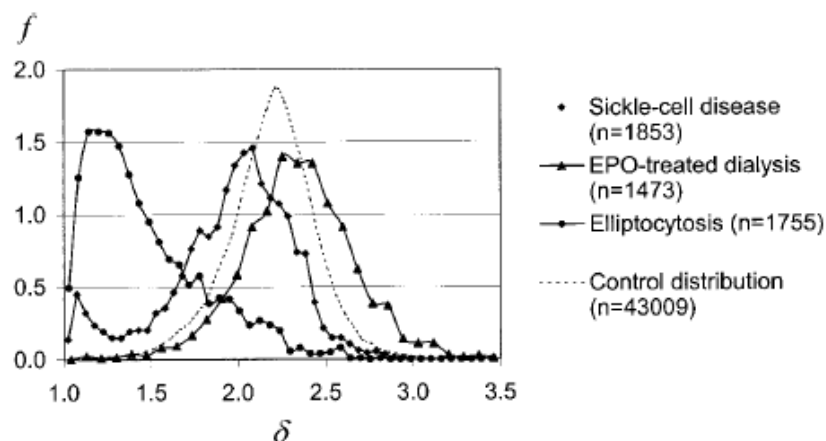


Рис. 4. Распределение эритроцитов по деформируемости в крови здоровых людей (пунктирная кривая) и у пациентов с серповидно-клеточной анемией и эллиптоцитозом. Данные получены методом реоскопии [2, 3].

Параметр δ определяется формулой (1)

Указанное обстоятельство дает основание рассматривать деформируемость как статистическую характеристику популяции эритроцитов и использовать для ее описания статистические понятия, такие как среднее значение, дисперсия, функция распределения и т.п. Возникает вопрос: можно ли измерять эти характеристики методом лазерной эктациометрии? Этот вопрос рассматривался в наших работах [5 – 9]. В этих работах предложены новые алгоритмы измерения популяционных характеристик эритроцитов на основе анализа данных лазерной дифрактометрии эритроцитов в сдвиговом потоке (эктацитометрии). Эти алгоритмы основаны на анализе формы линии изоинтенсивности, определяемой как линия на дифракционной картине, на которой интенсивность

рассеянного света имеет некоторое определенное значение. Один из этих алгоритмов мы назвали алгоритмом кривизны линии изоинтенсивности. Процедура обработки дифракционной картины с помощью этого алгоритма показана на рис. 5. Здесь представлены исходная дифракционная картина (а), линия изоинтенсивности (б), сглаженная линия изоинтенсивности (в), а также полярные точки линии изоинтенсивности и круги кривизны линии в полярных точках (г). С помощью этого алгоритма можно измерять такие характеристики ансамбля эритроцитов как средняя деформируемость эритроцитов, дисперсия деформируемости и коэффициент асимметрии распределения эритроцитов по деформируемости. Для проверки работы алгоритма мы провели опыты со специально подготовленными образцами крови крыс. В этих опытах нам удалось измерить среднюю деформируемость, дисперсию деформируемости и коэффициент асимметрии распределения эритроцитов по деформируемости с погрешностями 15%, 20% и 20% соответственно.

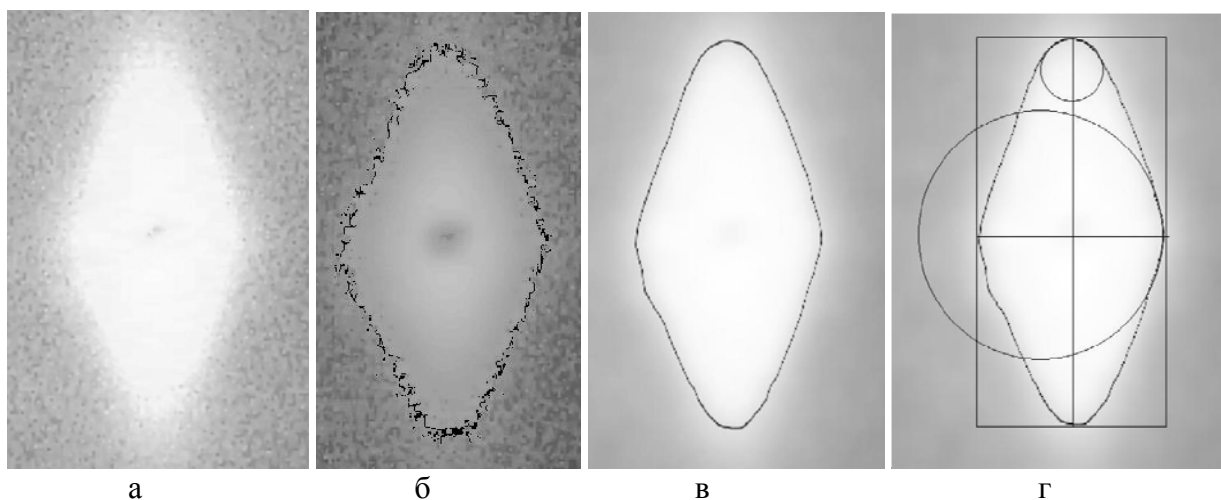


Рис. 5. Пример обработки дифракционной картины. Исходная дифракционная картина (а), линия изоинтенсивности (б), сглаженная линия изоинтенсивности (в), определение координат полярных точек и радиусов кривизны линии изоинтенсивности в полярных точках (г)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лазерная дифрактометрия эритроцитов в сдвиговом потоке (эктацитометрия) позволяет измерять важный реологический параметр крови – распределение эритроцитов по деформируемости. Достоинством этого метода является возможность быстрой обработки больших ансамблей эритроцитов без использования микроскопа. При использовании новых алгоритмов обработки данных, нам удалось достичь точности измерений, достаточной для практических приложений.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант N 13-02-01372.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Musielak M.** Red blood cell-deformability measurement: Review of techniques. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2009. V. 42. P. 47-64.
2. **Dobbe J. G. G., Hardeman M. R., Streekstra G. J., Starckee J., Ince C., Grimbergen C. A.** Analyzing red blood cell-deformability distributions. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2002. V. 28. № 3. P. 373-384.

3. **Dobbe J. G. G., Streekstra G. J., Hardeman M. R., Ince C., Grimbergen C. A.** Measurement of the distribution of red blood cell deformability using an automated rheoscope. *Cytometry (Clinical Cytometry)*, 2002. V. 50. P. 313-325.
4. **Bessis M., Mohandas N.** A diffractometric method for the measurement of cellular deformability. *Blood Cells*, 1975. V. 1. P. 307-313.
5. **Никитин С. Ю., Приезжев А. В., Луговцов А. Е., Устинов В. Д.** Измерение асимметрии распределения эритроцитов по деформируемости методом лазерной эктацитометрии. *Квантовая электроника*, 2014. Т. 44. № 8. С. 774-778.
6. **Nikitin S. Yu., Priezzhev A. V., Lugovtsov A. E., Ustinov V. D., Razgulin A. V.** Laser ektacytometry and evaluation of statistical characteristics of inhomogeneous ensembles of red blood cells. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 2014. V. 146. P. 365-375.
7. **Никитин С. Ю., Кормачева М. А., Приезжев А. В., Луговцов А. Е.** Рассеяние лазерного пучка на неоднородном ансамбле эллиптических дисков, моделирующих красные клетки крови в эктацитометре. *Квантовая электроника*, 2013. Т. 43. № 1. С. 90-93.
8. **Nikitin S. Yu., Priezzhev A. V., Lugovtsov A. E.** Analysis of laser beam scattering by an ensemble of particles modeling red blood cells in ektacytometer. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 2013. V. 121. P. 1-8.
9. **Nikitin S. Yu., Lugovtsov A. E., Ustinov V. D., Lin M. D., Priezzhev A. V.** Study of laser beam scattering by inhomogeneous ensemble of red blood cells in a shear flow. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2015. V. 8. № 4.

S. Yu. Nikitin, V. D. Ustinov, A. E. Lugovtsov, M. D. Lin, A. V. Priezzhev, Yu. S. Yurchuk

M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

MEASUREMENT OF CHARACTERISTICS OF RED BLOOD CELLS DEFORMABILITY BY MEANS OF LASER DIFFRACTOMETRY IN A SHEAR FLOW

ABSTRACT

We discuss the problem of measuring one of the important rheological parameters of blood - red blood cell deformability distribution. We introduce new algorithms for measuring parameters of this distribution based on the method of laser diffractometry of erythrocytes in a shear flow (ektacytometry).

RED BLOOD CELLS, DEFORMABILITY, LASER EKTACYTOMETRY, SHEAR FLOW