

В. А. Вдовин, А. В. Муравьев, А. А. Певзнер

Способ определения степени агрегации клеток крови

В статье приводится новый способ определения степени агрегации клеток крови на примере анализа эритроцитов крови человека. Способ основан на анализе количества отдельных клеток в заданные моменты времени в определенном участке пробы.

Ключевые слова: спортивные игры, вариабельность сердечного ритма, подготовительный период.

V. A. Vdovin, A. V. Muraviov, A. A. Pevzner

Way to Define Aggregation Degree of Blood Cells

A new way to define aggregation degree of blood cells is given in the article on the example of the erythrocytes analysis of the person's blood. The way is based on the analysis of quantity of separate cells in given moments of time in a certain piece of test.

Keywords: sport games, variability of the heart rate, preparatory period.

В настоящее время все большую актуальность приобретают задачи, связанные с совершенствованием методов диагностики состояния разных функциональных систем организма. Вместе с тем существующие методы регистрации функциональных показателей предназначены в основном для выявления существенных патологических сдвигов в организме и в меньшей степени подходят для проведения экспресс-анализа функциональных и предпатологических изменений в его системах. Кроме того, эффективность работы устройств и точность результатов анализа, как правило, сильно зависят от компетенции и технической подготовленности врачей и обслуживающего персонала.

Поскольку кровь является внутренней средой организма, то даже небольшие изменения ее гомеостатических характеристик имеют существенное диагностическое и прогностическое значение. Это в полной мере относится к комплексу показателей текучести крови и микрореологическим параметрам эритроцитов. К показателям микрореологии эритроцитов относятся их деформируемость и агрегация. Последняя характеристика микрореологии эритроцитов представляет собой тонкий индикатор состояния организма в целом.

Анализ научно-технической литературы, посвященной способам определения степени агрегации эритроцитов, показал, что большинство используемых методов и медицинских устройств обладает низкими показателями точности, требует достаточ-

но продолжительного времени для получения результатов, а также имеет ряд других недостатков.

Известен способ определения агрегации эритроцитов на основе оценки скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Он заключается в сравнении уровня свободно осевших клеток в вертикально установленном капилляре с кровью в течение 2 часов [5] и принудительно осажденных эритроцитов крови путем их центрифугирования в течение 20 минут при 3000 об /мин. Данный способ обладает невысокой точностью результатов и широким диапазоном значений, приписываемых здоровому человеку (от 2 до 20 мм / час), что затрудняет точную трактовку данных анализа. Он также не пригоден для использования при повышенной и сильно пониженной доле эритроцитов в крови (гематокрите), это, как правило, случаи, вызванные гипоксией различного происхождения, опухолями почек и надпочечников. Кроме этого, данный способ требует длительного времени, необходимого для получения результата, что исключает его применение в системах экспресс-анализа.

Наряду с этим, оценка агрегации эритроцитов может осуществляться на основе регистрации нескольких последовательно идущих значений показателя СОЭ для построения СОЭ-граммы и дальнейшего определения угла наклона кривой скорости оседания эритроцитов. Для этого регистрируют СОЭ в течение 60 минут каждые 15 минут и затем строят график зависимости скорости оседания кле-

ток от времени стояния пробы крови. Данный способ обладает такими же недочетами, как и анализ одного значения СОЭ, однако в некоторых случаях позволяет повысить достоверность диагностики по сравнению с анализом одного значения СОЭ, но имеет сложность в трактовании СОЭ-граммы, поскольку анализ проводится работниками лабораторий, что повышает вероятность внесения ошибок из-за человеческого фактора.

Существует достаточно новый вариант оценки агрегации эритроцитов, основанный на исследовании микроскопической картины оседания эритроцитов в гематокритном капилляре [7] с регистрацией скорости оседания клеток. Однако круглое сечение капиллярной трубки не позволяет точно сфокусировать изображение клеток или их агрегатов. Кроме того, на скорость оседания эритроцитов и в этом случае существенно влияет разная вязкость среды (плазмы) и концентрация эритроцитов (их гематокрит). Следовательно, точность определения агрегации эритроцитов этим методом будет заметно ограничена.

Существует 3 автоматических метода исследования СОЭ в динамике:

1. Кондуктометрический метод;
2. Электрокинетический метод;
3. Фотометрический метод.

Кондуктометрический метод регистрации СОЭ базируется на измерении сопротивления крови с постоянно оседающими эритроцитами. Электрический ток, проходящий через кровь, крайне мал – примерно 0,2 мА, напряжение 0,25 В, частота 10 кГц. Эритроциты при данной частоте практически являются диэлектриками. Вследствие этого электрическое сопротивление крови между электродами при оседании эритроцитов на дно ячейки увеличивается, причем степень этого увеличения зависит от количества осевших эритроцитов. Электрическое сопротивление крови регистрируется в динамике и определяется как разность между сопротивлениями в данной точке (через 5, 10, 30 и 60 мин.) и начальным сопротивлением крови. Однако исследования показали, что данный метод является менее чувствительным, чем ручной метод Панченкова [4], и не позволяет оценивать агрегацию эритроцитов и служит только для измерения суспензионной стабильности крови.

В основу электрокинетического метода исследования скорости оседания эритроцитов положен эффект Дорна [1]. Он заключается в том, что при движении заряженных частиц в неподвижном столбе жидкости в ней возникает разность потенциалов. Известно, что одним из фак-

торов, вызывающих агрегацию эритроцитов, является величина заряда мембраны. При ее повышении возрастает способность эритроцита к агрегации. Измерение потенциала Дорна позволяет определить электрокинетическую характеристику оседания эритроцитов.

Общим существенным недостатком обоих классов методов определения СОЭ для анализа агрегации эритроцитов является то, что скорость оседания клеток в большей степени зависит от плотности среды (вязкости плазмы) и от концентрации клеток (гематокрита) и в меньшей степени – от объединения клеток в комплексы-агрегаты, а это заставляет сомневаться в точности и достоверности метода.

Также известен способ измерения степени агрегации эритроцитов, основанный на оценке светопропускания через пробу цельной крови или суспензии эритроцитов в агрегирующей среде [8]. Он базируется на измерении интенсивности светопропускания в зависимости от агрегатного состояния крови. Более высокая агрегация образца крови характеризуется повышенной интенсивностью прохождения света через образец крови, и наоборот. В этом способе возможна регистрация агрегации эритроцитов в условиях покоя, а также после приложения высоких или низких напряжений сдвига.

Фотометрический метод является наиболее распространенным методом исследования агрегационных свойств эритроцитов. С его помощью возможно осуществление количественной оценки агрегатного состояния крови – размеров и плотности микроагрегатов эритроцитов. Кроме этого, фотометрический анализ отличается от других методов (биомикроскопии, микрофотографии) простотой и доступностью, что объясняет его широкое применение в клинической практике.

Все фотометрические методы можно классифицировать по характеристике регистрируемого светового потока:

1. Исследование в проходящем световом потоке.
2. Исследование в отраженном световом потоке.

Интенсивность света, прошедшего через слой суспензии эритроцитов, изменяется в соответствии с их агрегатным состоянием, которое выражается в размерах и плотности образующихся агрегатов.

Возможности измерения прозрачности крови практически ограничены слоями толщиной 2–3 мм. Так как исследуемая проба крови представляет собой суспензию взвешенных эритроцитов, то на интенсивность прошедшего светового потока будут оказывать большое влияние рассеивающие свойства

агрегатов эритроцитов. При измерении в суспензии взвешенных эритроцитов интенсивность прошедшего светового потока зависит не только от размеров и формы эритроцитов, но и от их объемной концентрации и функционального состояния гемоглобина. В связи с этим более широкое применение получили методы исследования суспензии эритроцитов в отраженном световом потоке.

Для изучения агрегации эритроцитов применяют метод «силлектрометрии», сущность которого состоит в уменьшении светорассеивания после прекращения перемешивания в процессе дезагрегации-агрегации клеток [3].

Этот принцип используется в устройстве «Агрегатометр», сконструированном на модифицированном микроколориметре МКМФ-1. В заглушке, входящей в комплект микроколориметра, размещается лампа накаливания таким образом, чтобы свет от нее был направлен на стенку кюветы и после отражения от ее содержимого попадал на фотоземель, пройдя предварительно через красный светофильтр. Дезагрегацию эритроцитов вызывали интенсивным перемешиванием мешалкой, насаженной на вал электродвигателя. Агрегация эритроцитов регистрируется на графопостроителе.

Разновидностью конструкции агрегатометра является пьезодинамический агрегатометр. В поле микроскопа со встроенным фоторезистором располагается предметное стекло с наклеенным на расстоянии 3 диаметров эритроцита покровным стеклом [6]. На покровном стекле жестко закреплен пьезокристалл, получающий питание от звукового генератора. В полость между стеклами вводится проба гепаринизированной цельной крови. По мере увеличения напряжения звукового генератора возрастает мощность колебания верхнего стекла, и агрегаты начинают разрушаться. Соответственно, меняются экстинция и сигнал с фоторезистора. По достижении полной дезагрегации и выхода кривой, регистрируемой самописцем, на плато напряжение сбрасывается и регистрируется процесс спонтанной агрегации.

Недостатком этого способа является невозможность дифференцировать истинные агрегаты от простого оптического сближения клеток. Также невозможно корректно определить агрегацию эритроцитов при низких величинах гематокрита ($Hct > 35\%$), что снижает степень достоверности полученного результата.

При попытке подсчитать агрегаты и их размеры существенной проблемой является распознавание различных по форме и размерам агрегатов. Это, в первую очередь, обусловлено многочисленностью образов, которые представляют агрегаты, и необхо-

димостью разработки алгоритма выделения агрегата и подсчета количества клеток, составляющих его. Задача значительно усложняется при расположении столбчатых частей агрегатов перпендикулярно плоскости изображения.

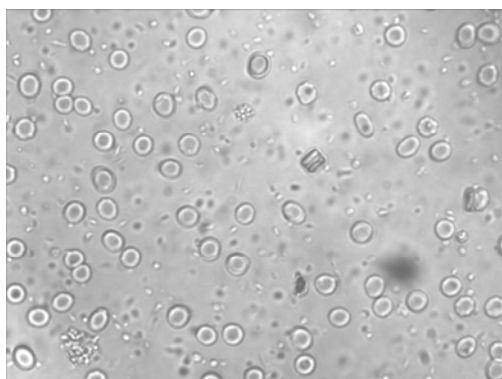
Значительно более простую задачу представляет процесс распознавания единичных клеток. Даже с учетом того, что в зависимости от угла расположения клетки крови к плоскости изображения ее отображение может существенно отличаться. Так, например, эритроцит, имеющий дисковую форму, на снимке может выглядеть как круг, эллипс и даже в виде «палочки». Однако все эти модификации изображения вполне могут быть выражены аналитически. Учитывая эти соображения, нами было предложено при определении степени агрегации распознавать не агрегаты, а единичные клетки. Так как количество клеток в микрокамере неизменно, то вследствие агрегации происходит только перераспределение количества клеток, объединившихся в агрегаты и оставшихся, единичных. Чем больше клеток перейдет в агрегированное состояние, тем меньше останется единичных клеток. В этом случае достаточно распознать количество единичных клеток на заданной площади микроснимка до агрегации и в момент определения степени агрегации.

Действительно, количество клеток крови в препарате не меняется в процессе агрегации. Естественно, количество клеток крови постоянно и на заданной площади. В процессе образования и роста агрегатов уменьшается число единичных клеток, причем на заданной площади изображения в момент определения степени агрегации оно будет равно количеству клеток на заданном участке изображения минус количество клеток, образовавших агрегаты. Или, наоборот, определить количество клеток в агрегатах можно, зная исходное количество клеток на заданном участке изображения и количество единичных клеток в момент оценки степени агрегации.

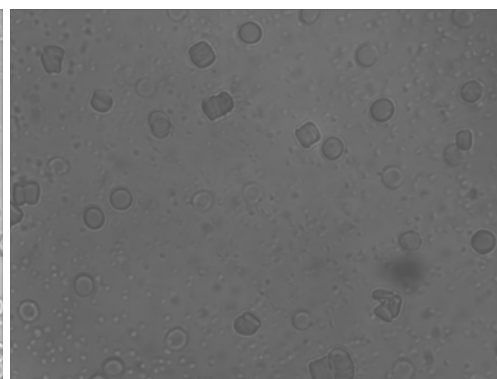
С целью повышения точности определения степени агрегации клеток крови и сокращения времени проведения анализа нами был предложен новый способ определения степени агрегации клеток крови [2]. Суть его заключается в том, что производится микросъемка препарата крови в разные моменты времени: в момент времени t_1 вблизи начала агрегации клеток крови и в момент времени t_2 вблизи окончания агрегации клеток крови. Затем распознаются на микроснимках единичные клетки крови, и степень агрегации клеток крови определяется по формуле $1 - N / K$, где N – количество единичных клеток крови на снимке,

полученном в момент времени t_2 ; K – количество единичных клеток крови на снимке, полученном в момент времени t_1 . На фиг. 1 и фиг. 2 представле-

ны микроснимки препарата крови в моменты времени t_1 и t_2 соответственно.



Фиг. 1



Фиг. 2

Способ может быть реализован с помощью устройства, включающего микрокамеру для съемки препарата крови, и компьютера. Его применение осуществляется следующим образом. Известным способом приготавливается препарат крови и фиксируется начало момента времени t_0 . Препарат крови помещается на предметный столик и в момент времени, близкий к началу агрегации крови t_1 , например, спустя 60 сек. после момента приготовления препарата t_0 , получают цифровой снимок. Затем в момент времени t_2 , близкий к моменту завершения агрегации, например, спустя 180 сек. после приготовления препарата крови, производят второй снимок. На полученных снимках осуществляют распознавание единичных клеток. Подсчитывается количество единичных клеток на снимках, сделанных в моменты времени t_1 и t_2 , затем по формуле $A = (1 -$

$N)/K$, где A – степень агрегации крови; N – количество единичных клеток в момент времени t_2 ; K – количество единичных клеток в момент времени t_1 , где вычисляется степень агрегации.

Применение предложенного способа и устройства обеспечивает рост производительности за счет сокращения времени анализа и повышение точности оценки степени агрегации клеток крови при компьютерном анализе изображения процесса агрегации, снижение влияния человеческого фактора при регистрации непосредственно характеристик клеток. Описанный способ может быть использован для оценки изменений агрегатного состояния клеток крови и точной диагностики расстройств микроциркуляции крови при различных заболеваниях и патологических состояниях.

Библиографический список

1. Бердников, А. В. Медицинские приборы, аппараты, системы и комплексы. Часть I. Технические методы и аппараты для экспресс-диагностики [Текст] : учебное пособие / А. В. Бердников, М. В. Семко, Ю. А. Широков. – Казань : Изд-во Казан. гос. техн. ун-та, 2004. – 176 с.
2. Заявка 2012109442 Российская Федерация, Способ определение степени агрегации клеток крови./ Вдовин В. А., Муравьев А. В., Певзнер А. А.; заявитель ГОУ ВПО «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского»; дата поступления: 12.03.2012.
3. Левтов, В. А. Об исследовании агрегационных свойств крови [Текст] / В. А. Левтов, Ю. И. Левкович, И. В. Потапова [и др.] // Физиология человека. – 1978. – № 3. – С. 504–513.
4. Ронин, В. С., Старобинец, Г. М. Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований [Текст] : учеб. пособие /
5. В. С. Ронин, Г. М. Старобинец. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 1989. – 320 с.
6. Селезнев, С. А. Комплексная оценка кровообращения в экспериментальной патологии [Текст] / С. А. Селезнев, С. М. Вашетина, Г. Е. Музаркевич. – Л. : Медицина, 1976. – 207 с.
7. Тухватуллин, Р. Т. Агрегация эритроцитов в крови, помещенной в макро- и микрокуветы [Текст] / Р. Т. Тухватуллин, В. А. Левтов, В. Н. Шуваева // Физиол. журнал. – 1986. – Т. 72., № 6. – С. 775–7784.
8. Baskurt O. K., Uyuklu M., Sebahat O., Meiselman H. J. Measurement of red blood cell aggregation in disposable capillary tubes. Clinical Hemorheol. and Microcirculation. – 2011. – Vol. 47. – 295–305.
9. Schmid-Schönbein H., Barcard B., Hilbrand E. Erythrocyte aggregation: causes, consequences and methods of assesment // Tijdschr. NVKC. – 1990.–Vol.15.– P. 88–97.