

Долгушина Н.А., Дворянский С.А., Циркин В.И.
**МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ АГРЕГАЦИОННОЙ
 СПОСОБНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ**
 (обзор литературы)

ГОУ ВПО Кировская ГМА Росздрава, г. Киров

Введение

В настоящее время точно установлено, что кровь является неньютоновской жидкостью [11, 19]. Реологические свойства крови определяются различными факторами, которые условно подразделяют на гемодинамические, клеточные, плазменные факторы взаимодействия и внешних условий [22].

Эритроциты составляют почти половину объема крови (40-45%), их масса в 750 раз больше, чем лейкоцитов и других клеток, они соизмеримы с просветом капилляров и играют огромную роль в формировании реологических свойств крови [18]. В возникновении гемодинамических нарушений периферического звена кровотока важным являются изменения механических свойств эритроцитов, их деформационной и агрегационной способности [30, 39]. При этом агрегация эритроцитов является основным детерминантом кровяной вязкости в физиологических условиях и при патологии, обуславливающей нарушения микроциркуляции [18, 19, 28, 32]. При усилении агрегации кровь превращается из взвеси эритроцитов с высокой текучестью в сетчатую суспензию, полностью лишенную

этой способности, с последующим нарушением тканевого метаболизма и развитием гиперкоагуляции [1, 6, 14, 16, 30, 33, 52].

Сближение эритроцитов в различных течениях происходит различно. Поэтому агрегация различается по видам: в регулярном сдвиговом потоке, при остаточном движении в микроскопической кювете, при оседании эритроцитов, при ультразвуковых колебаниях, что необходимо учитывать при интерпретации результатов полученных разными методами [14].

Историческая справка.

Исследование кинетики образования эритроцитарных агрегатов у человека в норме и патологии современными методами началось с использования микросъемки эритроцитов в однородном сдвиговом потоке в Wells-Brookfield вискозиметре типа "конус - пластина" с прозрачной рабочей частью, позволяющей осуществить прямое микроскопическое наблюдение (увеличение в 60-400 раз) кровотока [54].

Вискозиметрические приборы в реологии используются в основном для определения вязкостных характеристик крови, но при определенной модификации возможно визуальное наблюдение за процессом агрегации в динамике (течение между параллельными пластинами называют течением Куэтта). Если нижняя пластина закреплена, а верхняя движется с постоянной скоростью, реальная жидкость оказывает сопротивлению этому «сдвигу». Поэтому для поддержания движения необходимо, чтобы на верхнюю пластину действовала постоянная сила, тем большая, чем выше скорость. Жидкость в зазоре движется так, что создает линейное распределение скорости, т.е. скорость жидкости пропорциональна расстоянию от нижней пластины. Наклон равный отношению скорости/высота зазора называют скоростью сдвига. Силу, отнесенную к площади пластинки, называют напряжением сдвига. Отношение напряжения сдвига/скорость сдвига называют вязкостью [14]. Различают несколько видов вискозиметров:

1) ротационные с концентрическим цилиндром или приборы, построенные по принципу конус-пластина (или конус в конусе). В ротационном вискозиметре исследуемую жидкость помещают в пространство между двумя (вращающимся и неподвижным) соосными цилиндрами, конусами, сферами. 2) капиллярные вискозиметры имеют рабочую часть в виде жесткой цилиндрической трубки (капилляра), диаметр которой очень мал по сравнению с длиной, чтобы избежать влияния ее конца и приблизиться к идеальной геометрии бесконечно длинной трубки. Течение в них происходит за счет разницы давления на концах трубки, задаваемых

внешними устройствами [14, 20, 30].

Изучение морфологии агрегатов при различных скоростях сдвига было проведено рядом авторов [11, 12, 13, 14] в специальной проточной камере толщиной 50 мкм. При этом Левтов В.А. с соавт. [14] указали, что агрегация эритроцитов в эксперименте зависит от условий кровотока, геометрии камеры, содержащей кровь, времени, прошедшем с начала процедуры, и от исходного состояния крови.

Изучение спонтанной и индуцированной агрегации с оценкой качественных и количественных показателей агрегации (фотометрические исследования). Оптический количественный анализ основывается на регистрации изменений, происходящих с лучом света при прохождении его через исследуемый раствор [8].

Фотометрические исследования агрегационных характеристик крови начались с работ Dog-pon A. et al. (1949, 1957), которые изучали изменения фотометрического сигнала, отраженного от крови, во время и после перемешивания. Ими была установлена зависимость интенсивности сигнала от ориентации и агрегации эритроцитов.

Подробное изучение изменения интенсивности света, проходящего через тонкий слой крови в реоскопе, провели Schmid-Schoenbein H. et al. [55, 57, 58]. Они выявили изменение интенсивности света после остановки потока. Модификацию метода позже разработал Тухватулин Р.Т. с соавт. (1986). Недостатком обоих методов является очень тонкий слой крови, через который проходит луч света. Процесс агрегации происходит в слое толщиной не более 0,1 мм. Это означает, что исследуемая агрегация, в основном, двумерна, т.е. не является моделью нормальной трехмерной агрегации в крови *in vivo*.

С целью изучения трехмерной агрегации эритроцитов в достаточно толстых слоях крови были разработаны рефлектометрические методы и устройства [61], в которых сдвиговый поток моделировался Куэттовским течением. Эти два направления в нефелометрических методиках нашли свое отражение в создании эритроагрегометров типа конус-пластина (Myrenne, Aachen) и Куэтта (Sefam, Wandoeuvre les Nancy). Оба метода основаны на регистрации процесса спонтанной агрегации эритроцитов в течение первых 10-15 с, т.е. незавершенного процесса. Фирсов Н.Н. (1983) предложил анализировать процесс гидродинамической дезагрегации эритроцитов при увеличении скорости сдвига вплоть до полной дезагрегации.

Абсорбционные фотометрические методы основаны на интенсивности поглощения света (приборы типа ФЭК-М, ФЭК-Н-57). Абсорбция света раствором (т.е. величина абсорбции, или оптической плотности) есть произведение

концентрации вещества на толщину слоя раствора. Фотометрические приборы подразделяют на обычные фильтровые фотометры и спектрофотометры. В последних участки спектра выделяют при помощи призм или дифракционных решеток; что позволяет установить любую длину волны в большом диапазоне (спектрофотометры типа СФ-4, «СОЛАР») [8].

Нефелометрия - вид оптического анализа, в основе которого лежит измерение светового потока, рассеиваемого в направлении почти перпендикулярном направлению его падающего пучка. Светорассеивание имеет место в том случае, если размеры встречаемых на пути света частиц превышают длину волны электромагнитного излучения. Чем мутнее дисперсная система, тем больше она рассеивает света и тем меньше пропускает. В определенных условиях наблюдается пропорциональная зависимость между содержанием частиц во взвеси (либо капелек эмульсии) и ее мутностью. Иначе говоря, принцип нефелометрии заключается в измерении количества света, рассеиваемого частицами в жидкой среде. Оптимальные условия его применения состоят в использовании растворов низкой концентрации. В практической практике нефелометрический метод используется редко: он выполняется с помощью дорогостоящих приборов, например лазерных нефелометров [8].

Турбидометрия представляет собой разновидность нефелометрии, при использовании которой частичная непрозрачность анализируемой среды измеряется путем оценки снижения интенсивности падающего светового потока. Поглощение монохроматического светового потока происходит в случае, если длина волны электромагнитного излучения оказывается значительно меньше, чем размеры частиц. Турбидометрия - менее чувствительный метод, чем нефелометрия, т.к. для него используются среды с относительно большим содержанием частиц в единице объема. Турбидометрический анализ находит все более широкое применение в клинической медицине [8].

Методы оценки агрегации эритроцитов, применяемые в клинической практике и экспериментальной медицине и биологии.

I. Методы микроскопии

1. «Гемоцитометр» основан на оценке агрегации посредством сравнения микрофотографий разбавленной суспензии эритроцитов в плазме и в растворе Рингера с альбумином [61].

2. Реогониометр Вайсенберга [45], оснащенный микроскопом, и Wells-Brookfield вискозиметр с прозрачной рабочей частью [54] позволяют исследовать кинетику агрегации и дезагрегации эритроцитов. Это дорогостоящий исследовательский комплекс с большим набором сменных

рабочих элементов (конусов и пластин, коаксиальных цилиндров). Исследования можно проводить как для установившегося потока, так и для потока в колебательном (осциллирующем) режиме [45].

3. Schmid-Schoenbein H. et al. (1968, 1973) разработали прибор для наблюдения поведения крови при заданных напряжениях сдвига, названный "реоскоп". Устройство позволяет непосредственно наблюдать клетки крови во время течения при постоянной скорости сдвига и изучать кинетику агрегации при заданных условиях. Экспериментальные данные могут быть получены в виде микрофотографий или микрокиносъемки и в дальнейшем подвергнуты цифровой обработке с помощью компьютера. К преимуществам данного метода относятся возможность работать в широком диапазоне гематокрита, возможность пренебречь седиментацией частиц и рассматривать только процесс формирования монетных столбиков. При работе с реоскопом можно легко контролировать скорость сдвига, состав суспензии и использовать только малые объемы образца. Одним из недостатков метода является возможность исследовать только двумерные агрегаты и сложность выражения агрегации эритроцитов количественно в легко сопоставимых единицах [9].

4. Метод биомикроскопии дает представление о состоянии эритроцитов в микрососудах различных органов и топографических зон. Недостаток - незначительное число исследуемых структур, влияние неблагоприятных условий оперативного вмешательства. Микроскопия сосудов бульбарной конъюнктивы глаза позволяет оценить состояние кровотока при жизни, но этот метод труден для интерпретации и не позволяет количественно точно оценить агрегацию эритроцитов в движущемся потоке [30].

5. Прямое микроскопическое наблюдение в тонком мазке крови. Метод характеризует агрегацию эритроцитов только качественно и на его результаты влияют скорость растекания крови, неравномерность концентрации эритроцитов по длине мазка и другие факторы [1, 2, 9, 14].

6. Оценка агрегации эритроцитов при микроскопии разбавленной крови. Осадок промытых физиологическим раствором эритроцитов ($Ht=74\%$) добавляли к плазме в соотношении 1:1. Эту взвесь в смесителе разводят той же плазмой до $Ht=0,3-0,6\%$, затем нерезко встряхивают в течение 3 минут и помещают в камеру Горяева. Учитывают число неагрегированных эритроцитов и оценивают форму агрегатов. Число неагрегированных эритроцитов к общему числу эритроцитов - искомая величина (в норме составляет 43-60%) [14].

7. Оценка агрегации эритроцитов при ми-

кроскопии неразбавленной крови. Для визуальной оценки и микросъемки текущей крови была создана проточная разборная камера с каналом прямоугольного сечения. Конструкция предусматривает изменение толщины щели. Объектив микроскопа располагался на расстоянии 38 мм от начала участка постоянного сечения щели. Входной штуцер кюветы с помощью толстостенной полиэтиленовой трубки соединялся со шприцом - инфузаторм. Кровь используется однократно [14].

8. Метод оптической микроскопии с последующей видеорегистрацией и компьютерным анализом изображения [17]. Подготовка эритроцитов перед исследованием включала: отделение от плазмы центрифугированием (20 мин. при 3000 об/мин), затем эритроциты трижды отмывают в физиологическом растворе. При исследовании различных веществ на агрегацию эритроцитов их инкубируют 15 мин. при $37^{\circ}C$, затем ресуспендируют в аутологичной плазме при комнатной температуре для исследования агрегатообразования. Установка для агрегометрии эритроцитов включает: световой микроскоп с длиннофокусным объективом $10\times$ и фотоокуляром $10\times$; видеокамеру и компьютер. При регистрации оценивают число агрегированных и неагрегированных эритроцитов. Рассчитывают отношение числа агрегатов к количеству неагрегированных клеток и это отношение принимают как показатель агрегации эритроцитов (ПА). Регистрацию процесса агрегатообразования проводят пять раз через 15 секундные интервалы. Затем строят график процесса агрегатообразования и по уровню регрессии оценивают скорость агрегатообразования в каждой исследуемой пробе как тангенс угла наклона линии тренда и кривой агрегатообразования. Метод позволяет оценивать величину агрегации эритроцитов, скорость и размер агрегатов [17].

II. Определение агрегации эритроцитов по скорости седиментации эритроцитарной суспензии - косвенное измерение скорости агрегации [14]. В клинике применяется стандартная методика Вестергринга [63]. Для оценки результатов измерений требуется учет гематокрита, вязкости, плотности взвешивающей, температуры среды и другие факторы [14, 15, 31]. Кроме того, процесс оседания агрегатов происходит при неконтролируемых сдвиговых условиях (разрушение и образование агрегатов при малых напряжениях сдвига, деформация и вращение частиц, обратный поток плазмы в седиментационной трубке). Этот процесс зависит от концентрации эритроцитов, высоты столбика жидкости в капилляре и его внутреннего диаметра [15, 31]. Однако рядом авторов не найдена связь между агрегацией эритроцитов и СОЭ [21, 26, 30].

III. Оптические способы измерения агрегации

1. Фотометрический метод. Dognon A. et al. (1949), изучавшие изменения фотометрического сигнала, отраженного от крови после перемешивания, показали, что интенсивность рассеянного в обратном направлении света возрастает, а интенсивность проходящего света падает. Этими авторами была установлена зависимость интенсивности сигнала не только от ориентации, деформации и агрегации эритроцитов, но и от степени оксигенации гемоглобина. Поэтому наиболее информативным оказывается измерение рассеянного назад (отраженного) света. Учитывается и то, что при измерении образцов цельной крови (в отличие от эритроцитарных суспензий) наиболее существенными оказываются эффекты, связанные именно с агрегацией эритроцитов.

2. Schmid-Schoenbein H. et al. измеряли интенсивность проходящего света для вискозиметра типа конус-пластина [46, 56, 62]. Внезапная остановка потока сопровождалась уменьшением интенсивности прошедшего света (вызванной дезориентацией клеток крови) с последующим возрастанием интенсивности, отражающим, по мнению авторов, процесс агрегации. Запись процесса продолжалась в течение 10 секунд. Вероятно, получаемые таким образом результаты не отражают полностью процесс агрегации, а лишь описывают некоторый усредненный показатель. В частности, не наблюдается явной корреляции между указанными данными и результатами, полученными прямым наблюдением процесса агрегации.

3. Турбидометрический метод. Примером агрегометров, при помощи которых можно судить об изменении структурно-функциональных свойств тромбоцитов, являются «СОЛАР», «Биола» (Россия). Существует турбидометр эритроцитов - MF 4020 (Белоруссия) [8].

Анализаторы агрегации НПФ БИОЛА предназначены для исследования агрегации тромбоцитов и других клеток, определения концентрации клеток в суспензии, а также оценки их формы. Агрегация регистрируется как традиционным турбидометрическим методом, так и недавно разработанным методом, основанным на оценке среднего размера агрегатов в реальном времени. Турбидометрический метод, предложенный Борном и О'-Брайеном, является, в настоящее время, наиболее распространенным при исследовании агрегации тромбоцитов. Он основан на регистрации изменений светопропускания обогащенной тромбоцитами плазмы. Это позволяет исследовать не только агрегацию, но и изменение формы тромбоцитов. С другой стороны, изменение формы может маскировать начальный этап агрегации. Кроме того, показав

но, что образование малых агрегатов (менее 100 тромбоцитов) может не сказываться на светопропускании суспензии. В 1989 году З.А. Габбасовым и соавт. [4] был предложен новый метод исследования агрегации тромбоцитов. Метод основан на анализе флуктуаций светопропускания (ФСП-метод), вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале. Относительная дисперсия таких флуктуаций пропорциональна среднему размеру агрегатов и используется для исследования кинетики агрегации. Метод отличается высокой чувствительностью, что делает его пригодным для исследования спонтанной агрегации, агрегации под действием низких концентраций индукторов, а также агрегации субклеточных частиц и макромолекул. Развитие этого методического подхода позволило также измерять концентрацию частиц в перемешиваемой суспензии. В комплекте с анализаторами агрегации поставляется программное обеспечение. Программа выполняется на IBM-совместимом компьютере в среде Windows. Она отображает кривые агрегации в ходе эксперимента, сохраняет их вместе с временными метками и сопроводительной информацией на диске, и позволяет в дальнейшем их просматривать и обрабатывать. Лазерный анализатор агрегации тромбоцитов/счетчик 230LA отличается от обычного турбидометрического агрегометра наличием фильтра высоких частот и двухполупериодным выпрямителем. Как обычно, светопропускание выражается в процентах, причем, начальное светопропускание обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) принимается за 0%, а бедной тромбоцитами плазмы (БТП) - за 100%. В литературе часто встречаются англоязычные эквиваленты сокращений ОТП и БТП - PRP и PPP, соответственно.). Прибор имеет два независимых канала. Светопропускание и размер агрегатов измеряются в обоих каналах одновременно. Температура и скорость перемешивания поддерживаются встроенным микропроцессором независимо в каждом канале. Концентрация клеток может быть измерена только в одном канале.

Использование для оценки агрегации эритроцитов лазерного анализатора марки 230 LA производства НПФ «Биола» (Россия) предложено Спасовым А.А. и соавт. (2000). Исследование проводили на эритроцитах человека. Для приготовления клеточной суспензии эритроцитов 1 мл цельной крови смешивают с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 и затем трижды отмывают в 10 мл буфера Кребса (pH 7,4). После трехкратного промывания и удаления супернатанта 0,05 мл отмытых эритроцитов осторожно ресуспендируют в 10 мл р-ра Кребса. Исходные рабочие взвеси эритроцитов

имеют величину оптической плотности, равную 1,0 D. В качестве стандартного агрегирующего агента используют алциановый голубой (2 мг/мл). Прибор предварительно калибруют по двум точкам. При этом светопропускание образца эритроцитарной суспензии принимают за 0%, светопропускание индуктора в физиологическом растворе за 100%, а средний размер одиночного эритроцита за единицу. Для оценки агрегации в кювету прибора последовательно вносят 250 мкм суспензии отмытых эритроцитов, стандартизированных по оптической плотности, и магнитную мешалку. Скорость вращения мешалки 800 об/мин. Кювету вставляют в термостатируемую (37°C) ячейку прибора. На 10 секунде в кювету добавляют 50 мкл 2% раствора алцианового голубого («Sigma», США). Агрегация эритроцитов сопровождается снижением оптической плотности суспензии, что регистрируется фотометрически. Кроме того, прибор определяет величину агрегатов.

Методика Спасова А.А. и соавт. (2000) позже была модифицирована рядом авторов [7]. Исследование проводят в течение 1 – 2 часов с момента забора крови. В качестве индуктора агрегации используют алциановый голубой («Ferak Berlin», Германия). Калибровку прибора проводят по двум точкам - для суспензии эритроцитов и для 0,9% раствора NaCl (их светопропускание принимается соответственно за 0% и 100%, а средний размер одиночного эритроцита - за 1 усл. ед). Забор венозной крови производят утром натощак, при пункции локтевой вены самотеком в тefлоновые пробирки с 3,8% раствором цитрата натрия (в соотношении 9:1) в объеме 2 мл. К 1 мл цитратной крови добавляют 9 мл 0,9% NaCl и центрифугируют 20 мин. (1500 об/мин), надосадочную жидкость удаляют. К 1 мл суспензии эритроцитов добавляют 9 мл 0,9% NaCl и вновь центрифугируют. Такую процедуру повторяют еще раз, после чего 0,05 мл трехкратно отмытых эритроцитов ресуспендируют в 10 мл 0,9% NaCl для получения рабочей суспензии эритроцитов. По 1 мл этой суспензии вносят в пробирки, содержащие 0,1 мл 0,9% NaCl. Затем в кюветы вносят по 0,3 мл суспензии преинкубированных эритроцитов и магнитную мешалку (скорость вращения - 1000 об/мин), а через 5 с. – по 0,03 мл 2% раствора алцианового голубого и в течение 7 минут в термостатической ячейке прибора (37°C) оценивают агрегацию эритроцитов. Оценку агрегации проводят по следующим показателям (рис. 1):

- 1) максимальное светопропускание (МС), в %;
- 2) время достижения МС;
- 3) максимальный наклон кривой МС, в % в 1 мин;
- 4) время достижения максимального накло-

на кривой МС в с;

5) максимальный средний радиус агрегатов (СРЭА), в усл. ед.;

6) время достижения максимального СРЭА, в с;

7) максимальный наклон кривой СРЭА, в усл. ед. в 1 мин.;

8) время достижения максимального наклона кривой СРЭА, в с.

Показатели 1) и 5) отражали степень агрегации, а показатели 2), 3), 4), 6), 7) и 8) – скорость агрегации.

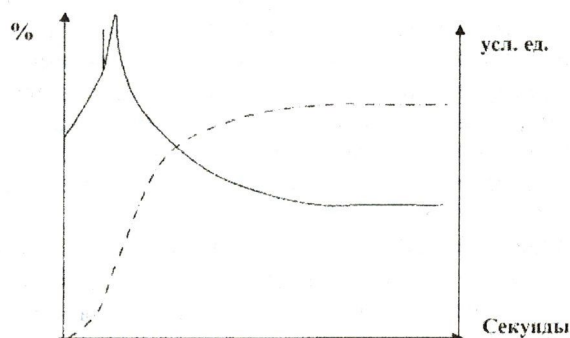


Рис. 1. Кривая агрегации, полученная с помощью агрегометра «Биола».

Сплошная линия отражает светопропускание, штриховая – средний радиус агрегатов

4. Исследование агрегации эритроцитов методом лазерной дифрактометрии [3]. Принцип действия лазерного дифрактометра основан на явлении дифракции лазерного излучения на измеряемом объекте, дающем представление о геометрических и механических свойствах эритроцитов. Преимущества метода: бесконтактность, малое время, высокая локальность измерения, инвариантность к смещениям и отсутствие необходимости фиксации образца. Недостатком метода считают тот факт, что при превышении оптической толщины слоя образца (монослой эритроцитов) образуется переизлучение; также возможна дезагрегация образца при неосторожном встряхивании меланжера.

5. Метод селлектометрии. Его сущность состоит в оценке интенсивности светорассеяния кровью после прекращения размешивания [9, 36].

6. Автоматические системы. Появление автоматических фотометров, исключающих из практики оператора стадию расчетов, дало возможность проводить измерения не только в режиме конечной точки (когда реакция уже завершилась), но и фиксированного времени (измерение результата через определенный интервал времени после начала реакции), и в режиме кинетики (ряд измерений с определенным интервалом времени и расчетом по величине показателя за этот интервал времени). Результаты легко пред-

ставляются количественно. Наиболее распространенные автоматические фотометры относят КФК-2, КФК-3 являются одноканальными, не имеют термостатирования кюветного отдела, позволяющие проводить простейшие (метод конечной точки) исследования. Одноканальный спектрофотометр фирмы «СОЛАР» PV-1251-С комплектуется компьютером и проточной кюветой [8]. Автоматические системы, основанные на анализе кривых изменения интенсивности отраженного света после остановки потока при различных исходных скоростях сдвига. Анализ этих кривых позволяет получить такие параметры как время агрегации, индексы ориентации и структурированности, а также прочность агрегатов, т.е. скорость сдвига, при которой наступает полная дезагрегация [8, 25, 26, 27].

Применяются приборы оригинальной конструкции [25, 26, 27]. Так, Фирсов Н.Н., Вышлова М.А. (2004) предложили прибор, названный как соосно-цилиндрический агрегометр с регистрацией обратного светорассеяния от слоя крови толщиной 1 мм. Он позволяет определять скорость образования «монетных столбиков» при их спонтанном формировании или при индукции агрегации высокомолекулярным декстраном D-500. Козинец Г.И. и соавт. (1997) предложили пьезодинамический агрегометр. Левин Г.Я. и соавт. (1982) сконструировали высокочувствительный агрегометр, основанный на фотометрическом методе.

IV. Другие методы оценки агрегационных свойств эритроцитов.

1. Сравнение относительной вязкости цельной крови с эритроцитарной суспензией в среде Рингера с альбумином при стандартном гематокрите. Полученную разность относят на счет агрегационного взаимодействия [35].

2. Метод аглометрии основан на продавливании определенного объема исследуемой крови через фильтр, с определенным диаметром пор, с постоянной скоростью в течение определенного отрезка времени [14].

Метод измерения фильтруемости крови через мелкопористый фильтр предложенный Swank R.L. et al. (1964) и Thurston G.B. (1989) представляет устройство в виде блока с подогреваемым резервуаром, по которому движется поршень, прогоняющий кровь через фильтр с отверстиями 20 мкм. Скорость движения поршня обеспечивает подачу 0,2 мл крови в секунду. С помощью трансдюссера и усилителя записывают фильтрационное давление, которое требуется для фильтрации 2 мл крови в течение 10 секунд. Этим методом можно измерить степень агрегации крови при добавлении в нее различных веществ. Исследования показали, что нормальная кровь фильтруется при давлении 25-50

мм рт.ст., при добавлении 2,5 мг адреналина или норадреналина оно увеличивается до 400-450 мм рт.ст. Величина фильтрационного давления регистрируется самописцем на бумаге [59, 60]. Методика была модифицирована Nuriel E.H. et al. (1969) путем обеспечения более точного контроля за скоростью движения крови и ее температурой.

Другой фильтрационный метод основан на принципе постоянного давления, под которым фильтруется кровь через мелкопористый фильтр. В этом случае фильтрация графически характеризуется прямой линией, если кровь не содержит агрегатов. При наличии агрегатов на графике возникает кривая линия, свидетельствующая об уменьшении количества крови, протекающей в единицу времени [40, 41].

3. Анализ агрегатного состояния эритроцитов в микроциркулярном русле различных органов на гистологических препаратах. Любая часть организма может быть исследована гистологически. Оценка агрегатного состояния эритроцитов включает: определение площади, размеров и количества эритроцитов и эритроцитарных агрегатов, расстояние между ними. Недостаток метода – трудность и необходимость различать застойное полнокровие и функциональную гиперемиию в органе [5].

4. Метод оценки состояния мембран эритроцитов, основанный на определении агрегации эритроцитов, стимулируемой одновременным снижением рН и ионной силы инкубационной среды (концентрации ионов) [42].

5. Перекрестный метод анализа СОЭ и коэффициента агрегации. Величина СОЭ измеряется при нескольких различных показателях гематокрита в 4 вариантах: 1) эритроциты больного в плазме больного, 2) эритроциты больного в плазме донора с аналогичной АВО-группой и Rh-фактором, 3) эритроциты донора в плазме донора, 4) эритроциты донора в плазме больного. Данный метод дает дифференцированную информацию об источнике изменения СОЭ (плазменные или мембранные) [31].

6. Метод дзета-седиментации. Введен новый показатель ZSRrel, коррелирующий различия в гематокрите суспензий [43].

7. Определение агрегации эритроцитов на основании измерения ди-электрических свойств крови. Это быстрый (0,2 секунды) и точный метод определения размеров агрегатов в крови и суспензии эритроцитов [49, 50, 51].

8. Использование ультразвука в системе Couette. Метод основан на эффекте рассеивания звука в крови, позволяет оценивать размеры эритроцитарных агрегатов [14]. Определены новые индексы ультразвука потенциально прилагаемые для исследования [53], предложена ин-

терферометрическая методика (Echo-Cell) [44].

9. Метод микроэлектрофореза для исследования полимер-клетка взаимодействия около поверхности эритроцита [34, 47].

Литература

1. Ашкинази И.Я. Эритроцит и внутреннее тромбопластинообразование.-Л. Наука, 1977.-155с.

2. Ашкинази И.Я. Метод количественной визуальной оценки агрегации эритроцитов.-Л., 1986, 156 с.

3. Бессмельцев С.С., Тарлыков В.А., Ходус И.Г. Исследование агрегации эритроцитов методом лазерной дифрактометрии // Клиническая лабораторная диагностика - 2004. - № 12.- С. 8-13.

4. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю. и др. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов // Лабораторное дело. - 1989. - № 10. - С. 15-18.

5. Даденко А.В., Шиходыров В.В., Соболев В.А. Анализ агрегатного состояния эритроцитов в микроциркуляторном русле различных органов на гистологических препаратах с помощью автоматизированной системы анализа изображений // Гематология и трансфузиология.- 1988.- Т. 3, № 4.- С. 57- 60.

6. Зубаиров Д.М., Тимербаев В.Н. Функциональная концепция инициирования свертывания крови клеточными мембранами // Вопросы охраны материнства и детства.- 1991 -№ 4.-С. 5-9.

7. Ивашкина Е.П., Трошкина Н.А., Циркин В.И., Дворянский С.А. Модификация методики А.А.Спасова и соавт. по изучению агрегации эритроцитов на лазерном агрегометре «Биола».- Клиническая лабораторная диагностика.- 2006.- № 9.-С. 53.

8. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Беларусь, 2002.- 495 с.: ил.

9. Козинец Г.И., Макарова В.А. Исследование системы крови в клинической практике. - М.: Триада-Х, 1997. - 480 с.

10. Левин Г.Я., Шереметьев Ю.А., Яхно В.Г. Новый подход к изучению агрегации эритроцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.-1982.-Т. 93, №3.- С. 94-96.

11. Левтов В.А., Попель А.С., Регирер С.А., Шадрина Н.Х. Об одном оптическом эффекте при течении крови // Изв. АН СССР. Механика жидкости и газа.- 1971, № 6. - С. 161-165.

12. Левтов В.А., Левкович Ю.Н., Ашкенази И.Я., Потапова И.В. Об исследовании агрегационных свойств крови // Физиология человека.- 1978.- Т. 4.- № 3.- С. 504-513.

13. Левтов В.А., Никифоров Н.И., Попель

А.С. и др. Об агрегации эритроцитов в текущей крови // Регионарное и системное кровообращение. - Л.: Наука, 1978. - С. 49-59.

14. Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрина Н.Х. Реология крови. М.: Мед., 1982 - 270 с.

15. Лиховецкая З.М., Лосев Е.С. Оценка агрегации эритроцитов по скорости их оседания // Современные проблемы биомеханики. - М.: Научный совет РАН по проблемам биомеханики, Общество биомехаников.- Вып. 9, 1994.- С. 62-70.

16. Макацария А.Д., Мищенко А.Л., Бицадзе В.О., Маров С.В. Синдром диссеминированного свертывания крови в акушерской практике.- М.: Триада - Х, 2002.- 495 с.

17. Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Гужова П.А. и др. Компьютерная регистрация агрегации эритроцитов при их инкубации с адреналином // Методы исследования регионарного кровообращения и микроциркуляции в клинике. - СПб -2003.- 78 с.

18. Мчедлешвили Г.И. Гемореология в системе микроциркуляции: ее специфика и практическое значение (обзор) // Тромбоз, гемостаз и реология.-2002- № 4 (12).- С. 18-24.

19. Мчедлешвили Г.И. Клиническая гемореология (обзор) // Тромбоз, гемостаз и реология.- 2003- №3 (15).- С. 13-27.

20. Ройтман Е.В. Биореология. Клиническая гемореология. Основные понятия, показатели, оборудование (лекция) // Клиническая лабораторная диагностика. -2001.-№ 5.- С. 25-32.

21. Савельева Г.М., Дживилегова Г.Д., Шалина Р.И., Фирсов Н.Н. Гемореология в акушерстве. М.: Медицина, 1986. - 223 с.

22. Селезнев С.А., Назаренко Г.И., Зайцев В.С. Клинические аспекты микрогемоциркуляции.Л.:Медицина.- 1985.-208 с.

23. Спасов А.А., Островский О.В., Дегтярев А.Н., Кучерявенко А.Ф. Изучение агрегации эритроцитов на лазерном агрегометре // Клиническая лабораторная диагностика -2000.- №5.- С. 21-23.

24. Тихомирова И.А. Роль экстрацеллюлярных, мембранных и внутриклеточных факторов в процессе агрегации эритроцитов. Автореф. дисс... д-ра. биол. наук. Ярославль. 2006.- 48 с.

25. Тухватулин Р.Т., Левтов В.А., Шуваева В.Н., Шадрина Н.Х. Агрегация эритроцитов в крови, помещенной в макро- и микрокуветы // Физиологический журнал СССР - 1986 -Т.72, № 6.- С. 775-784.

26. Фирсов Н.Н. Агрегация эритроцитов. // 3-я Всесоюзная конференция по проблемам биомеханики.- М., 1983.- Т. 1.- С. 262-264

27. Фирсов Н.Н. Агрегация и дезагрегация эритроцитов: исследование нефелометрическими методами // Современные проблемы биоме-

ханики. - М.: Научный совет РАН по проблемам биомеханики, Общество биомехаников, Вып. 9, 1994. - С. 85-97

28. Фирсов Н.Н., Сирко И.В., Приезжаев А.В. Современные проблемы агрегатометрии цельной крови // Тромбоз, гемостаз и реология. - 2000. - №2 (2) - С 9-11.

29. Фирсов Н.Н., Вышлова М.А. Теория спонтанной агрегации и сдвиговой дезагрегации эритроцитов // Тромбоз, гемостаз и реология. - 2004. - №2 (18) - С 11-21.

30. Чернух А.М., Александров П.Н., Шагал Д.И. Микроциркуляция». М.: Медицина, 1984.- 429 с.

31. Ямайкина И.В., Фурманчук Д.А. Перекрестный метод анализа СОЭ и коэффициента агрегации в медицинской диагностике // Гематология и трансфузиология- 1999.- Т 44, № 3. - С. 39-41.

32. Bagchi P., Johnson P., Popel A. Computational fluid dynamic stimulation of aggregation of deformable cells in a shear flow // J. Biomech Eng.- 2005.- Vol. 127, № 7.-P. 1070-1080.

33. Baskurt O., Meiselman H. Blood rheology and hemodynamics // Semin Thromb Hemost.- 2003.- Vol. 29, № 5.- P. 435-450.

34. Baskurt O., Tugral E., Neu B., Meiselman H. Particle electrophoresis as a tool to understand the aggregation behavior of red blood cells // Electrophoresis.- 2002.- Vol. 23, № 13.- P. 2103-2109.

35. Chien S., King R., Schuessler G., Skalak R., Tozeren A., Usami S., Copley A., Roles of red cell deformability and aggregation in blood viscoelasticity // Biorheology, AICHE Symposium series n. 182- 1978.- Vol. 74.- P. 56.

36. Dobbe J., Streekstra G., Strackee J., Rutten M., Stijnen J., Grimbergen C. Syllactometry: the effect of aggregometer geometry in the assessment of red blood cell shape recovery and aggregation // IEEE Trans. Biomed. Eng. -2003. - Vol. 50, № 1.- P. 97-106.

37. Dognon A., Loeper J., Housset E. Etude optique de aggregation reversible des hematies // Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie - 1949.- Vol. 143, № 11-12.- P. 769-771.

38. Dognon A., Suquet P. Facteur de reflexion diffuse des suspension de particules colorees // J. Chem. Phys.- 1957.- Vol. 10.- P. 815-820.

39. Ehrly A. Erythrocyte aggregation in clinical medicine // Klin. Wschr. - 1986.- Bd 64.- S. 1080-1084.

40. Fourcade C, Belleville J., Lenormand D., Descotes J., Jossinet J. Description d'un V.S. metre automatique // Ann. Phys. Biol. Med.- 1973.- Vol. 17.- P. 29

41. Hanss M., Boynard M. Erythrocyte sedimentation studies by an echographic method // Biomedicine. - 1976.- Vol. 25, № 3.- P. 81-82.

42. Hessel E, Lerche D. Cell surface alterations during blood-storage characterized by artificial aggregation of washed red blood cells // Vox Sang. 1985 - Vol.49, № 2.- P. 86-91.

43. Joytchevs, Stoeffst, Dzhenev. Es vivo and vitro investigations of human red blood cell aggregation with the reta sedimentation technique-role of cellular and suspending medium factors // J.Bioreheology. - 1999. Vol. 36, № 1-2.- P. 107.

44. Khodabandehlou T., Boynard M., Guillet R., Devehat C. Sensitivity of the ultrasonic interferometry method (Echo-Cell) to changes of red cell aggregation: application to diabetes //Clin Hemorheol Microcirc. - 2002. - Vol. 27, № 3-4. - P. 219-232.

45. King R.G., Copley A.L. Modifications to the Weissenberg rheogoniometer for haemorheological and other biorheological studies // Biorheology.- 1970- Vol. 7.- P. 1.

46. Klose H., Volger E., Brechtelsbauer H., Heinich L., Schmid-Schoenbein H. Microrheology and light transmission of blood. I The photometric effects of red cell aggregation and red cell orientation // Pflugers Archiv. - 1972, Vol. 333, № 2.- P. 126-139.

47. Meiselman H.J., Baskurt O.K., Sowemimo-Coker S.O., Wenby R.B. Cell electrophoresis studies relevant to red blood cell aggregation // Bi-orheology.-1999- Vol. 36, № 5-6- P. 427-432.

48. Nuriel E., Bicher H., Van-der-Lijn E. The evaluation of the screen filtration pressure as a method for the determination of the influence of various col-loids in causing red cell and platelet aggregation // 5th European Conference on Microcirculation. Part I. Metodology in Microcirculation. Biblioteca Anatomica. - 1969. - №. 10. - P. 524-527.

49. Pribush A., Meiselman H.J., Moyertstein P., Moyertstein N. Dielectric approach to investigation of erythrocyte aggregation // Abstr. 10th Int. Congr. Biorheol. and 3rd Int. Conf. Clin. Hemorheol., Pecs, July 18-22, 1999. - Bioreheology. - 1999.- Vol. 36, № 1-2. -P. 196

50. Pribush A., Mankuta D., Meiselman H.J., Meyerstein D., Silberstein T., Katz M., Meyerstein N. The effect of low-molecular weight dextran on erythrocyte aggregation in normal and preeclamptic pregnancy // Clin Hemorheol Microcirc. - 2000.- Vol. 22, № 2.-P. 143-152.

51. Pribush A, Meiselman HJ, Meyerstein D, Meyerstein N. Dielectric approach to investigation of erythrocyte aggregation. II. Kinetics of erythrocyte aggregation-disaggregation in quiescent and flowing blood // Biorheology. -2000-Vol. 37, № 5-6. - P. 429-441.

52. Reinhart W. Hemorheology: blood flow hematology // Schweiz Med Wo-chenschr. - 1995. - Vol. 125, № 9.-P. 387-395.

53. Rouffiac V., Peronneau P., Hadengue A., et

al. A new ultrasound principle for characterizing erythrocyte aggregation: in vitro reproducibility and validation // Invest Radiol. – 2002. Vol. 37, № 8. - P.413-420.

54. Schmid-Schoenbein H., Gaentgens P., Hirsch H. On the shear rate dependence of red cell aggregation in vitro // J. Clin. Investig. - 1968. - Vol. 47, № 6. - P. 1447-1454.

55. Schmid-Schoenbein H., Gallasch G., Volger E., Klose H. Microrheology and protein chemistry of pathological red cell aggregation (blood sludge) studied in vitro // Biorheology. – 1973. - Vol.10.- P. 213.

56. Schmid-Schoenbein H., Volger E., Klose H. Microrheology and light transmission of blood. II. The photometric quantification of red cell aggregate formation and dispersion in flow // Pflugers Archiv. - 1972. - Vol. 333, № 2. - P. 140-155.

57. Schmid-Schoenbein H., Gosen J., Heinrich L., Klose H., Volger E. Counter-rotation rheoscope chamber for the study of microrheology of blood cell aggregation by microscopy observation and microphotometry // Microvasc. Res. - 1973. - Vol. 6. - P. 366-376.

58. Schmid-Schoenbein H., Kline K., Volger E. Velocity of red cell aggregation (rca): photometric determination of half-time and aggregation constant // Bibl. Anat. – 1975. - № 13. P. 91-92.

59. Swank R. Roth J., Jansen J. Screen filtration on pressure method and adhesiveness and aggregation of blood cells // J. Applied Physiology. - 1964.- Vol. 19, № 2.- P. 340-346.

60. Thurston G. Effect of temperature on the viscoelasticity of blood and plasma // Biorheology. - 1989.- Vol. 26, № 3.- P. 625.

61. Usami S., Chien S. Optical reflectometry of red cell aggregation under shear flow // 7th European Conference on Microcirculation. Part I. Methodology in Microcirculation. Biblioteca Anatorica.- 1973, № 11.- P. 91-97.

62. Volger E., Schmid-Schoenbein H., Gosen J., Klose H. Microrheology and light transmission of blood. III. The velocity of red cell aggregate formation. // Pflugers. Arch. - 1972, Vol. 354. - P.299.

63. Westergren A. The technique of the red cells sedimentation reaction // Ann. Rev. Tuberc. - 1926.- Vol. 14. - P. 94.

Summary

N.A. Troshkina, C.A. Dvoryansky, V.I. Tsirkin
Methods of studying aggregations erythrocytes
(analysis of literature)

Kirov State Medical Academy

In article the generalized data on methods of an estimation of aggregation erythrocytes, used in clinical practice both experimental medicine and biology are submitted.