

ОЦЕНКА РЕОЛОГИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ В СРАВНЕНИИ С АНАЛОГИЧНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Нагорнова П.В., Белкин А.В., Дубровский В.Н., Елифанов А.В., Шалабодов А.Д.

Тюменский государственный университет

ул. Пирогова, 3, г. Тюмень, 625000, РФ; e-mail: blatedrane@gmail.com

Поступила в редакцию: 18.07.20

Аннотация. В статье представлена оценка деформабильности эритроцитов крови больных железодефицитной анемией и сравнение с аналогичными показателями крови у здоровых людей. Всего было обследовано 60 человек обоего пола из них 30 испытуемых были здоровыми, и 30 с железодефицитной анемией. Оценка изменения показателя деформабильности эритроцитов проводилась с помощью метода лазерной дифрактометрии на специальном устройстве. Показано, что у пациентов с железодефицитной анемией показатель индекса деформабильности эритроцитов достоверно снижался по сравнению с контрольными показателями.

Дополнительно был проведен флуоресцентный спектральный анализ крови пациентов с железодефицитной анемией и его интеграция в реологические характеристики. Выявлено, что у людей с железодефицитной анемией максимум интенсивности флуоресценции смещается в более коротковолновую область спектра.

Ключевые слова: дефицит железа, анемия, деформабильность, флуоресценция, эритроциты, реологические свойства.

Цитоплазма эритроцитов богата гемоглобином, красным пигментом, содержащим атом двухвалентного железа, который способен связывать кислород и придает клеткам красный цвет. Недостаток железа в организме приводит к появлению дефицита железа, который встречается почти у половины населения мира. Если организм уже ощущает недостаток железа, но болезнь еще не успела развиваться, то в этом случае образуется дефицит железа. Не менее 4% женщин репродуктивного возраста, 20-30% беременных женщин (30-50% в конце беременности) и 1-2% мужчин имеют выраженный дефицит железа.

По причине дефицита железа развивается около 70% всех анемий. Из-за небольшого количества этого микроэлемента молекулы гемоглобина больше не образуются. В результате кровь начинает нести гораздо меньше кислорода. Дефицит железа в других тканях приводит к проблемам с кожей, волосами, сердцем и пищеварением.

По данным ВОЗ, около 1,8 миллиарда человек во всем мире страдают от анемии. Скрытый дефицит железа (сидеропения) встречается у 3,6 млрд человек [1].

Эритроциты являются самым многочисленным типом клеток крови. Оценить функциональное состояние эритроцитов позволяют некоторые детерминанты крови или показатели реологических свойств. Особая способность эритроцитов к упругой деформации позволяет им выполнять свою основную функцию - доставку необходимых веществ для жизнедеятельности организма в целом, включая капиллярную сосудистую систему, диаметр которой значительно меньше диаметра эритроцитов. Данная способность и получила название деформабильность.

Деформационная способность эритроцитов обусловлена упругими свойствами мембраны этих клеток и наличием особой белковой структуры, которая образует внутреннюю сторону мембраны и называется цитоскелетом [2].

Показатель изменения деформабильности является одной из наиболее лабильных характеристик крови, а также она зависит от воздействия различных факторов и ряда патологий. В нашей работе данным фактором является железодефицитная анемия.

Однако до настоящего времени мало изучены вопросы, связанные с влиянием железодефицитной анемии на вязкоэластические свойства мембран эритроцитов человека.

Важным моментом при проведении исследований деформабильности эритроцитов является объективная оценка этого показателя. Метод, который позволяет провести оперативную и информативную оценку обратимой деформабильности эритроцитов основан на лазерной дифрактометрии. В его основе заложен принцип дифракции лучей гелий-неонового лазера на эритроцитах, выступающих в качестве взвешенных в вязкой среде рассеивателей. Данный метод максимально приближен к ситуации «*in vivo*».

Способность эритроцитов к деформируемости определяется внутренней вязкостью, вязкоупругими свойствами мембраны и отношением объема клетки к ее площади. Чем больше отношение площади поверхности эритроцита к его объему, тем более выражены его деформируемые свойства. Эритроциты модифицированной формы характеризуются повышенной устойчивостью к деформируемости.

Другим определяющим фактором деформируемости эритроцитов являются вязкопластические свойства мембраны. Эластичные свойства мембраны определяют ее устойчивость к деформируемости, а вязкостные

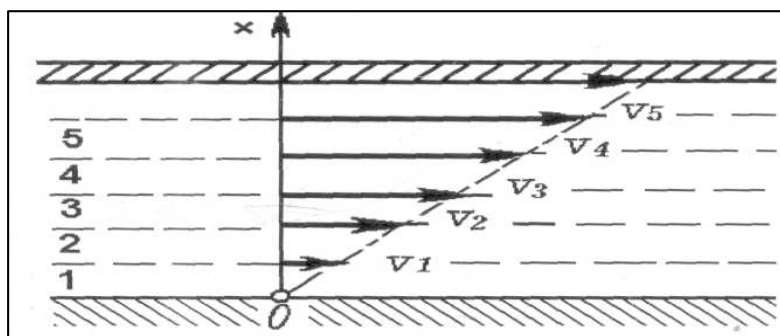


Рисунок 1. Ячейка Куэтта с помещенной между подвижной и неподвижной прозрачными пластинами суспензии эритроцитов

свойства характеризуют устойчивость эритроцитов к деформируемости. Вязкоупругие свойства мембраны определяются, прежде всего, состоянием мембранного скелета и его взаимодействием с другими структурными элементами клетки [3].

При прохождении эритроцитов через микроциркуляторный кровоток им приходится преодолевать деформирующий эффект, возникающий в результате взаимодействия со стенками кровеносных сосудов и друг с другом. Наличие градиентов скорости также оказывает деформирующее действие на эритроциты. Свойство эритроцита как гиперэластичного твердого тела объясняет возможность успешного преодоления этих эффектов при прохождении через микроциркуляторное русло. Примером ситуации, когда эритроцит находится в сдвиговом потоке, является ячейка Куэтта с суспензией эритроцитов, подвешенной между подвижной и неподвижной прозрачными пластинами, подвешенной в вязкой среде с фиксированной вязкостью (20 сантипуаз) [4]. Устройство ячейки Куэтта приведено на рисунке 1.

Эритроциты под действием деформирующего эффекта вытягиваются, о чем можно судить, анализируя дифракционную картину, полученную при прохождении лазерного луча через суспензию эритроцитов, взвешенных в вязкой среде. Дифракционная картина имеет вид системы концентрических колец. Расстояние между кольцами связано со средним диаметром красных кровяных клеток, которые характеризуют эту популяцию. Эта зависимость обратно пропорциональна: чем меньше измеренный диаметр эритроцитов, тем больше диаметр дифракционного кольца. Дифракционная картина отражает форму диффузоров, подвешенных в вязкой среде, а форма, в свою очередь, зависит от степени напряжения деформирующего эффекта. Количество эритроцитов не влияет на формирование дифракционной картины. Изображение дифракционной картины приведено на рисунке 2.

Исследование проводилось следующим образом: кровь помещалась в раствор Ficoll-400. Далее эта суспензия помещалась при помощи катетера в зазор между вращающейся и неподвижной пластинами ($t=36,6^{\circ}\text{C}$). Изменяя скорость вращения нижней пластины мы на основании закона вязкого трения Ньютона, моделировали различные деформирующие условия, возникающие в зазоре между пластинами. Эритроциты под действием деформирующего воздействия вытягиваются, о чем можно судить, анализируя дифракционную картину, полученную при прохождении луча лазера через суспензию эритроцитов, взвешенных в вязкой среде [5]. Блок-схема устройства для оценки деформабильности эритроцитов приведена на рисунке 3.

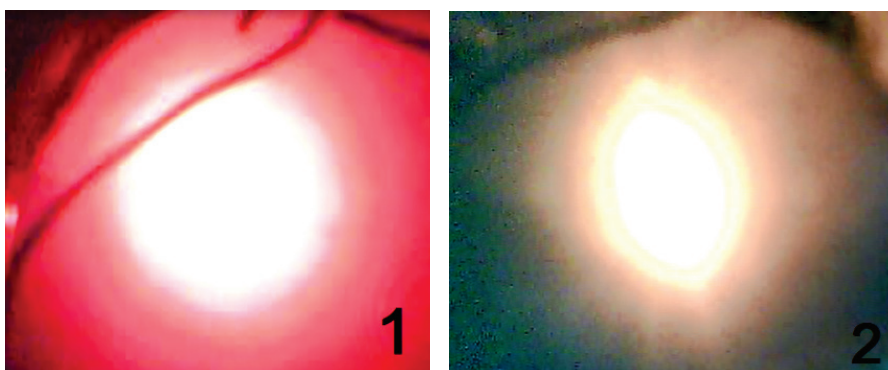


Рисунок 2. Реальное изображение дифракционной картины, получаемое при прохождении луча лазера через слой эритроцитов и выводимое на монитор для программного анализа: 1-дифракционная картина от покоящихся эритроцитов; 2-дифракционная картина от эритроцитов, находящихся в сдвиговом потоке

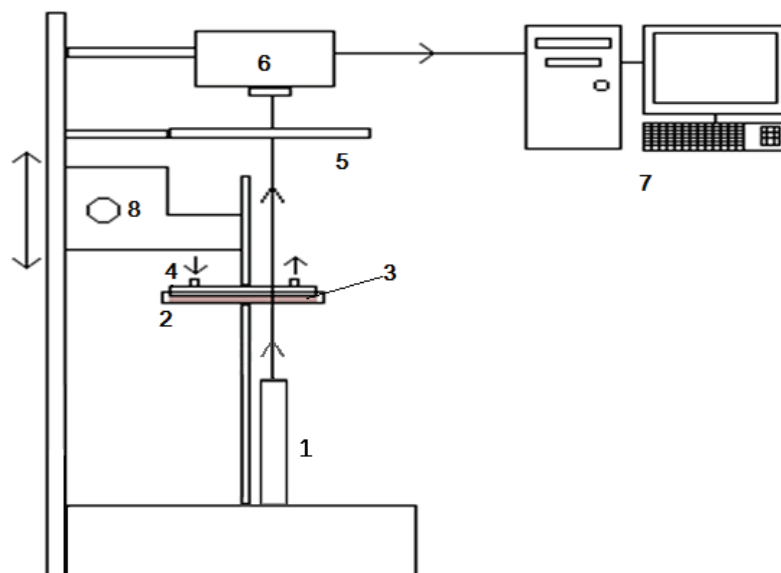


Рисунок 3. Блок-схема устройства для оценки деформабильности эритроцитов (патент РФ №2236009):
 1. Полупроводниковый, аналогичный гелий-неоновому ($\lambda \approx 632,8$ нм) лазер; 2. Термостабилизированная стационарная чашка Петри; 3. Проба крови; 4. Термостабилизированная вращающаяся чашка Петри; 5. Экран; 6. Видеокамера; 7. Компьютер; 8. Винт регулировки размера зазора

Забор крови производился на базе клинической ЖД-больницы города Тюмени в течение с марта по май 2019 года. Далее пробы транспортировались в течение часа на кафедру анатомии и физиологии человека и животных Института биологии для проведения дальнейшей работы. Всего было обследовано 60 человек обоего пола (26 мужчин и 34 женщины) в возрасте от 20 до 65 лет. Для проведения сравнительного анализа полученных данных все пациенты были разделены на 2 группы.

Первую группу составили пациенты с ЖДА. И вторая группа - это контроль, то есть люди с нормальным анализом крови.

Точность диагноза и общее состояние пациентов с железодефицитной анемией и здоровых людей были подтверждены сотрудниками РЖД-больницы (биохимические показатели всех исследованных образцов и изучение истории болезни каждого пациента в отдельности).

Дифракционная картина отражает форму взвешенных в вязкой среде рассеивателей, а форма зависит от степени напряжения деформирующего воздействия.

Как показали результаты нашего исследования, у больных анемией деформабильность эритроцитов достоверно снижалась по сравнению с контрольными показателями, что свидетельствовало об изменении реологических свойств самого эритроцита.

Индекс деформабильности эритроцитов на максимальном усилии сдвига (порядка 15 Н/м^2) для пациентов с железодефицитной анемией составляет $0,16 \pm 0,02$.

В норме индекс деформабильности эритроцитов на максимальном усилии сдвига для здоровых людей составляет $0,27 \pm 0,02$. Полученные графики приведены на рисунке 4.

Способность эритроцитов противостоять такому воздействию, т.е. есть реологические свойства клеток, заложены в особенностях структурной организации мембраны. Снижение уровня деформабильности эритроцитов у пациентов с железодефицитной анемией является следствием снижения гематокрита.

Гематокрит отражает не только количество эритроцитов, но и их размер. Если размер эритроцитов уменьшается (как при железодефицитной анемии, т.к. происходит нарушение созревания эритроцитов в красном костном мозге), гематокрит тоже будет снижаться. Следовательно, снижается вязкость самой крови, от которой напрямую зависит показатель деформабильности эритроцитов.

Дополнительно мы измерили интенсивность свечения цельной крови в реакции флуоресцеин-зависимой флуоресценции.

Флуориметрия проводилась как с добавлением активатора, так и без него. В качестве активатора флуоресценции использовался флуоресцеин. 5-7 кристаллов вносили в кювету с исследуемым образцом и непосредственно перед измерением тщательно перемешивали для лучшего связывания с активными центрами белков крови. При этом иногда оставался осадок, так как степень связывания у различных пациентов неодинакова, но на полученных результатах это не отражалось, что было доказано минимальным содержанием артефактов, соответствующим эталону контрольного раствора и максимально четкими спектрами свечения образцов сыворотки крови.

В качестве контроля фонового свечения, использовался физиологический раствор NaCl 0,9 н, который подтверждал отсутствие искажений или сигнализировал о необходимой корректировке параметров.

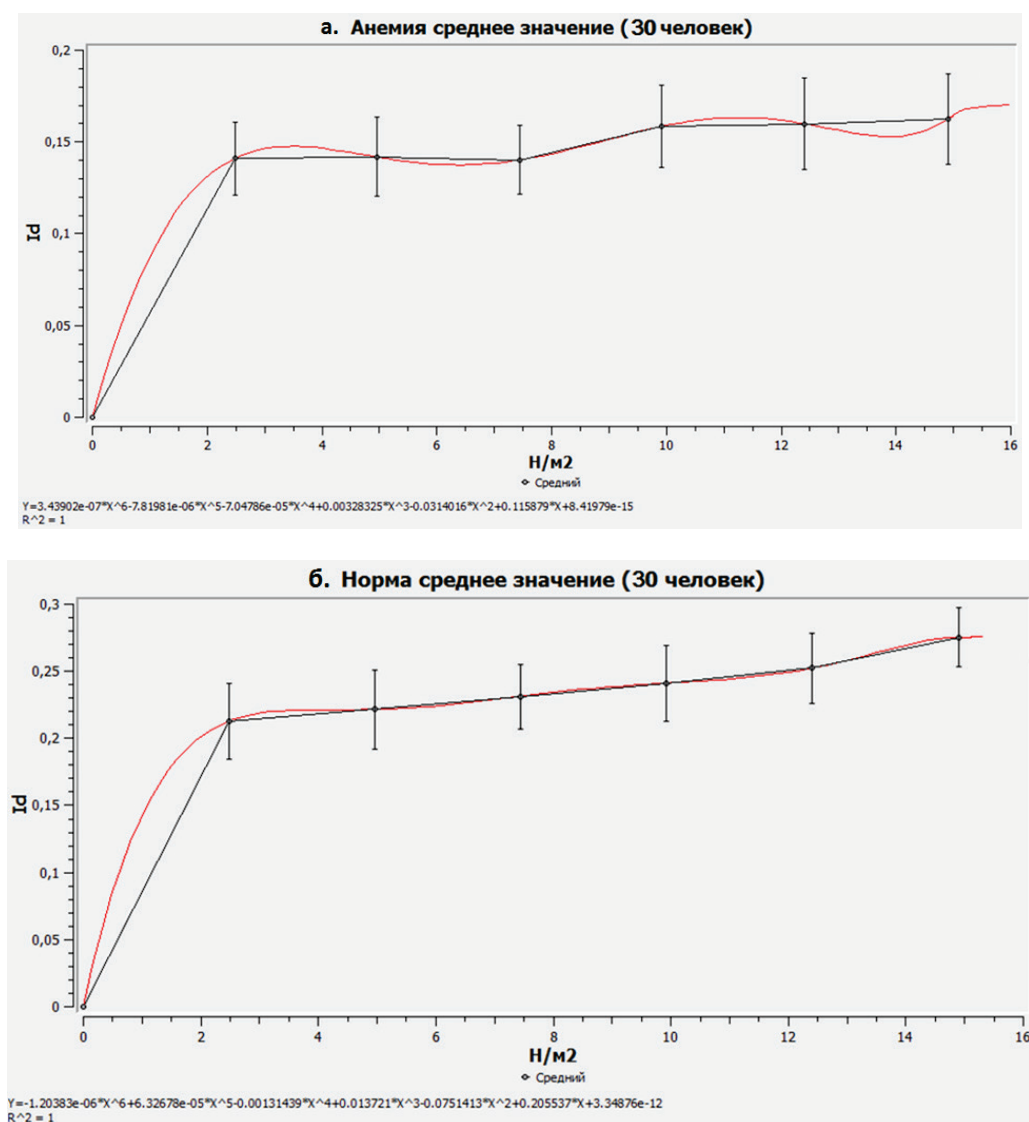


Рисунок 4. Изменение индекса деформируемости эритроцитов в зависимости от усилия сдвига для пациентов с железодефицитной анемией (а) и для здоровых людей (б), где: I_d – индекс деформируемости; H/m^2 – усилие сдвига; красная линия – линия тренда; черная линия – практическое значение

Измерение интенсивности флуоресценции проводилось при помощи спектрофлуорофотометра Shimadzu RF-5301. Его основные характеристики: монохроматор возбуждения 200-700нм, монохроматор излучения 220-800 нм. Спектральное разрешение от 1 до 40нм плавно регулируется изменением ширины щелей монохроматоров. Скорости развертки спектра 12,5, 25, 50, 100, 150, 300 нм/мин. Источник возбуждения – ксеноновая дуговая лампа. В приборе используется 90 градусная схема регистрации флуоресценции.

Следует отметить, что измерение спектров флуоресценции – спектрофлуорометрия – значительно более чувствительный метод, чем абсорбционная спектрофотометрия. С помощью современных спектрофлуорометров можно уверенно реагировать флуоресценцию вещества с концентрацией 10-11 моль/л.

Правильный результат флуоресцентного анализа может быть получен лишь при учете многих факторов, сопутствующих эксперименту. Отметим основные:

1. Для получения истинных спектров флуоресценции и возбуждения необходимо учитывать зависимость от длины волны спектра излучения источника, пропускания монохроматоров и чувствительности фотоумножителя.

2. На сигнал флуоресценции всегда накладываются сигналы, обусловленные флуоресценцией примесей растворителя, фоновой засветкой, релеевским и комбинационным рассеянием света, рассеянием, обусловленным мутностью раствора, рассеянным излучением, прошедшим через монохроматоры и т.д.

3. Спектр флуоресценции, и ее интенсивность могут зависеть от концентрации исследуемого вещества как из-за изменения оптической плотности на длине волны возбуждения, так и из-за межмолекулярных взаимодействий, влияющих на флуоресцентные свойства молекул.

4. На флуоресцентные параметры исследуемого вещества влияют свойства растворителя (его полярность, вязкость, pH наличие растворенных веществ).

По полученным данным рассчитывалась светосумма за 69 сканирований каждой пробы в импульсном режиме. Обработка статистических результатов была проведена с помощью программы Panogama.

Для моделирования строения и оптических спектров флуоресцентных и фоторецепторных белков применяются современные методы молекулярного моделирования, включая комбинированные методы квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ). Согласно данному подходу расчет энергий в квантовой подсистеме проводится по компьютерным программам квантовой химии, а в молекулярно-механической подсистеме – с использованием силовых полей. Подразделение системы на КМ- и ММ-части производится на основании анализа доступных трехмерных моделей белков, в частности, содержащихся в базе данных белковых структур (PDB). Для расчетов свойств флуоресцентных и фоторецепторных белков к КМ-подсистеме относится хромофорная группа и ближайшие к ней аминокислотные остатки [6,7].

Равновесные геометрические конфигурации для модельных белковых систем определены по минимуму полной энергии в приближении КМ/ММ для транс- и цис-конформаций хромофорной группы с учетом её различных протонированных состояний. Для найденных стационарных точек проводились расчеты вертикальных энергий возбуждения, отвечающих переходам S_0-S_1 и S_0-S_2 . С этой целью использовались многоконfigurационные приближения квантовой химии, позволяющие обеспечить достаточно высокую точность вычислений. Рассчитанные положения полос в спектрах поглощения сопоставляются с экспериментальными данными. Сканирование фрагментов поверхностей потенциальной энергии возбужденных электронных состояний позволяет сформулировать гипотезы о механизме разгорания флуоресцирующего варианта изучаемого белка [8].

По результатам нашего исследования, диапазон излучения для больных с анемией находился в пределах от 498 нм до 525 нм (среднее – 511 нм). Для здоровых людей был характерен диапазон от 573 нм до 585 нм (среднее – 580 нм).

Изложенные результаты исследования позволили нам сформулировать следующие выводы:

1. Деформабильность эритроцитов (на максимальном усилии сдвига) больных железодефицитной анемией достоверно снизилась до $0,16 \pm 0,02$, по сравнению с деформабильностью здоровых людей $0,27 \pm 0,02$

2. В крови больных железодефицитной анемией максимум интенсивности флуоресценции смещается в более коротковолновую область спектра в диапазон 498-525 нм, в сравнении с 573-585 нм для здоровых людей.

В дальнейшем методы лазерной дифрактометрии и флуоресцентной спектроскопии эритроцитов будут использоваться для более глубокого изучения реологических свойств крови, которые отражают функциональное состояние организма в целом. Это позволит расширить и оптимизировать процесс исследования.

Также эти методы могут способствовать более правильной оценке изменчивости реологических характеристик при различных патологиях, более оптимально влиять на формирование количественных характеристик реологических свойств и в то же время служить источником новых знаний о морфофункциональном состоянии эритрона.

Список литературы / References:

1. Andreichev N.A., Baleeva L.V. Iron Deficiency Conditions and Iron Deficiency Anemia. *Bulletin of Modern Clinical Medicine*, 2009, no. 3. DOI: 616.155.194.8+616.152.72-074.
2. Belkin A.V., Evpak A.S., Soloviev V.S., Khlitova E.U. Change of rheological blood parameters in some oncopathologies. *National Association of Scientists*, 2015, no. 9. DOI: 28948753.
3. Артюхов В.Г. *Биофизика*. М.: Академический проект, 2009, 294 с. [Artyukhov V.G. *Biophysics*. М.: Academic Project, 2009, 294 p. (In Russ.)]
4. Vohmitsev A.P., Saifiev R.R., Frolova O.V. Exogenous regulation of the erythrocyte deformability. *Fundamental Sedations*, 2004, no. 4.
5. Belkin A.V., Voitenko P.A., Dubrovsky V.N., Elifanov A.V., Maslakova K.Yu., Okrugina A.V., Shalabodov A.D. Development of an installation for estimation of the erythrocyte deformability using the phenomenon of rotation of the polarization plane of the plane-polarized light by optically active substances. *VI sezd biofizikov Rossii sbornik nauchnih trudov*, 2019, no. 1. DOI: 41335680.
6. Векшин Н.Л. *Флуоресцентная спектроскопия биополимеров*. М.: Фотон век, 2014, 188 с. [Vekshin N.L. *Fluorescent spectroscopy of biopolymers*. М.: Photon century, 2014, 188 p. (In Russ.)]
7. Ivanova I.P., Trofimova S.V., Piskarev I.M. Chemiluminescence induced by Fenton reaction - mathematical simulation of the process; features, parameters and conditions of application for biomedical research. *Original Researches*, 2014, no. 4. DOI: 579.222.001.57:61.
8. Дюбка Т.С. О некоторых аспектах применения флуоресцентного анализа в криобиологии. Собственная флуоресценция белков. *Вестник Харьков. нац. ун-та. Сер. Биология*, 2006, № 3. [Dyubko T.S. O nekotoryh aspektah primeneniya fluorescentnogo analiza v kriobiologii. Sobstvennaya fluorescenciya belkov. *Vestnik Har'kov. nac. un-ta. Ser. Biologiya*, 2006, no. 3. (In Russ.)]

**EVALUTION OF THE RHEOLOGICAL DETERMINANTS OF HUMAN BLOOD WITH
IRONDEFICIENCY ANEMIA IN COMPARASION WITH SIMILAR BLOOD PARAMETERS OF
HEALTHY PEOPLE**

Nagornova P.V., Belkin A.V., Dubrovsky V.N., Elifanov A.V., Shalabodov A.D.

Tyumen State University

Pirogova str., 3, Tyumen, 625000, Russia; e-mail: blatedrane@gmail.com

Abstract. The article presents an assessment of the deformability of red blood cells in patients with iron-deficiency anemia and a comparison with similar blood parameters in healthy people. In total 60 people of both sexes were examined, 30 of them were healthy and 30 with iron deficiency anemia. Changes in erythrocyte deformability were evaluated by laser diffractometry on a special device. It was shown that in patients with iron deficiency anemia the erythrocyte deformability index parameter authentically decreased in comparison with the control parameters.

Additionally, fluorescence spectral analysis of blood in patients with iron deficiency anemia and its integration into rheological characteristics was performed. It was revealed that in people with iron deficiency anemia the maximum fluorescence intensity shifted to the shorter wavelength region of the spectrum.

Key words: *iron deficiency, anemia, deformability, fluorescence, erythrocytes, rheological properties.*