

ВЛИЯНИЕ ПРОХОЖДЕНИЯ КРОВИ ЧЕРЕЗ КАПИЛЛЯР НА ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Ястребова Е.С., Лагунов Т.А.

Институт химической кинетики и горения им. Воеводского ИХКГ СО РАН
ул. Институтская, 3, г. Новосибирск, 630090, РФ; e-mail: kat30cer@kinetics.nsc.ru
Поступила в редакцию 19.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0627

Аннотация. Тренды персонализированной медицины приводят к необходимости определять норму биологических параметров для каждого отдельного человека. Такая задача требует большой точности получаемых параметров и достаточно частого их измерения. Для обеспечения высокой точности в определении морфологических и функциональных параметров клеток крови хорошо себя зарекомендовал метод сканирующей проточной цитометрии (СПЦ). В рамках данной работы идет разработка системы безыгольной венепункции для обеспечения более комфортных условий забора крови при частом отслеживании своих параметров. Однако, хотя в такой системе и возможно делать в коже отверстия значительно меньше, чем позволяет игла, возникает вопрос могут ли столь маленькие отверстия повлиять на параметры клеток крови, измеряемые на СПЦ. В работе выявлен первый из возможных влияющих на параметры клеток крови факторов – сдвиговое напряжение. Было исследовано поведение параметров эритроцитов при прохождении игл различного диаметра. Проведено моделирование в COMSOL распределения действующих сил на поверхности эллипсоида (как модели тромбоцита и эритроцита) в двух случаях: свободного перемещения клетки в капилляре и для прикрепленной к подложке клетке.

Ключевые слова: эритроциты, анионный обмен, сдвиговое напряжение, сканирующий проточный цитометр.

1. Введение

В последнее время в сфере медицины наблюдается тренд «персонализированной медицины». Основное отличие такой медицины от классической состоит в том, что ваше здоровье оценивают не по средним значениям параметров всех людей, а отслеживают динамику изменения ваших личных параметров. Сканирующий проточный цитометр является очень мощным методом, позволяющим получить большое количество параметров различных клеток крови с большой точностью и набрать статистику параметров по одному образцу крови [1-4]. Однако, клетки крови могут изменить свои свойства ещё на этапе доставки образца к цитометру (например, тромбоциты начинают активироваться и кровь сворачивается, а для исследования хотелось бы измерить параметры тромбоцитов во время активации без антикоагулянта). Более того при регулярных измерениях необходимо решить вопрос о взятии крови, поскольку многие люди откажутся часто сдавать кровь при помощи игольной венепункции. Существует вариант использования безыгольной венепункции (пробивание отверстия лазером в коже) для забора пробы. Одним из больших преимуществ такого метода является возможность проделывать отверстия размерами меньше внешнего диаметра типичной иглы. Для венепункции обычно используется игла маркировки 22G, внутренний диаметр которой составляет 410 мкм, а внешний 720 мкм (в соответствии с ISO 6009:2016). Использование эффекта лазерной абляции позволит делать в коже отверстия от 400 мкм до 50 мкм при необходимости. Однако, столь малые отверстия (~50 мкм) могут оказывать влияние на параметры клеток крови, поскольку становятся соизмеримы с размерами эритроцитов (5–10 мкм), и в таких капиллярах возрастёт величина сдвигового напряжения, что может приводить к активации тромбоцитов [5-8].

Сдвиговое напряжение τ , действующее на клетки, определяется как коэффициент динамической вязкости жидкости μ умноженный на производную скорости u по направлению:

$$\tau = \mu \frac{du}{dr} \quad (1)$$

В случае с капиллярами достаточно медленное течение вязкой жидкости будет подчиняться закону Пуазейля. Тогда скорость течения и величину сдвигового напряжения можно найти как:

$$\begin{cases} u(r) = \frac{p_1 - p_2}{4\mu L} (R^2 - r^2) \\ \tau(r) = \frac{p_1 - p_2}{2L} r \end{cases} \quad (2)$$

где Δp – разность давлений с разных краев частицы, R – радиус капилляра, r – расстояние от края капилляра до частицы в потоке, L – длина исследуемой частицы, находящейся в капилляре. Под влиянием большого сдвигового напряжения (~ 10^6 Па) активация тромбоцитов начинается уже через короткое время (~ 10^{-5} сек), как и инициализация лизиса эритроцитов (~ 10^4 Па). Однако даже относительно небольшой уровень сдвигового напряжения (~100 Па) при воздействии на клетку дольше чем ~100 сек тоже вызывает активацию тромбоцитов. Похожая зависимость (но с лучшей устойчивостью клеток) замечена и для эритроцитов. Нормальный уровень сдвигового напряжения (т.е. в теле человека) варьируется в пределах 0,3–10 Па [9]. В работе [10] авторы показывают, что активация эритроцитов сдвиговым напряжением происходит благодаря механочувствительным

Ca^{2+} проницаемым ионным каналам. Причём авторы наблюдали относительно слабую активацию после воздействия сдвигового напряжения величиной ~ 1 Па в течении ~ 60 сек.

Учитывая всё, что известно по поводу влияния сдвигового напряжения на два основных типа клеток крови (эритроциты и тромбоциты) встала задача проверить, сможет ли сканирующий проточный цитометр заметить различия в параметрах клеток, которые были подвержены различным уровням сдвигового напряжения. Дополнительно интересно промоделировать поведение клеток крови в капилляре чтобы правильнее оценивать уровень действующего на клетки сдвигового напряжения.

2. Моделирование сдвигового напряжения

Моделирование движения эритроцита и тромбоцита в капилляре проводилось в программном пакете COMSOL. Данный пакет позволяет использовать метод конечных элементов для моделирования физических процессов и взаимодействий. Для поставленной задачи не нужно смотреть на искривления частицы (и тем более на её реальное перемещение по капилляру). Достаточно рассчитать скорости и ускорения частицы для каждого положения с интересующей дискретизацией. Поэтому часть необходимых уравнений была записана вручную.

Модель состояла из двух компонентов (“Component”), размерность обеих 3D (так как использование осесимметричной системы невозможно из-за сдвига частицы относительно центра потока). Первый компонент состоял только из тела, на которое наложена очень точная сетка для вычисления основных необходимых параметров для вращения частицы: масса частицы, положение центра масс и матрица моментов инерции. Все эти параметры вычислялись встроенной функцией “Mass Properties” путём интегрирования по всем элементам сетки. Второй компонент содержал основную модель взаимодействия частицы и жидкости. Для моделирования потока была использована модель течения Навье-Стокса. Так как рассматривается стационарная задача течения (модель установившегося потока), жидкость несжимаема, и инерциальный член пренебрежимо мал, то в итоге можно получить уравнение для «ползущего течения» (“Creeping flow”). Для сходимости такой модели течения достаточно только задать скорости стенок сосуда, скорость втекания жидкости и давление на выходе жидкости из капилляра.

Для задания поведения частицы внутри потока была использована модель вращения твёрдого тела. В программе это задавалось через интерфейс стенки “Wall”, для которой указывался вектор скорости \vec{u}_b :

$$\begin{cases} \vec{u}_b = \vec{v}_b + \vec{\omega}_b \times \vec{r}_b \\ \vec{r}_b = \vec{r} - \vec{r}_{cm} \end{cases} \quad (3)$$

Линейная скорость клетки \vec{v}_b находилась из закона Ньютона простым интегрированием действующей на клетку силы по поверхности – формула (4), где \vec{n} и $d\vec{s}$ направлены внутрь клетки, \mathbf{K} – тензор вязких напряжений (“Viscous stress tensor”), m – масса клетки, p – давление со стороны жидкости (вычитаем атмосферное p_0 так как внутри клетки такое же давление. В программе для решения дифференциального уравнения используется модуль “Global Equations”. В данной модели скорость клетки напрямую используется как скорость замкнутой стенки в потоке, что влияет на всю матрицу скоростей модели.

$$\begin{cases} \frac{\partial \vec{v}_b}{\partial t} - \frac{1}{m} \oint_s \vec{F}_b \cdot \vec{n} d\vec{s} = 0 \\ \vec{F}_b = -\mathbf{K} \cdot \vec{n} + (p - p_0)\vec{n} \end{cases} \quad (4)$$

Сам тензор вязких напряжений из (4) вычисляется в COMSOL как:

$$\mathbf{K} = \mu \begin{pmatrix} 2 \frac{\partial u_x}{\partial x} & \frac{\partial u_y}{\partial x} + \frac{\partial u_x}{\partial y} & \frac{\partial u_z}{\partial x} + \frac{\partial u_x}{\partial z} \\ \frac{\partial u_y}{\partial x} + \frac{\partial u_x}{\partial y} & 2 \frac{\partial u_y}{\partial y} & \frac{\partial u_y}{\partial z} + \frac{\partial u_z}{\partial y} \\ \frac{\partial u_z}{\partial x} + \frac{\partial u_x}{\partial z} & \frac{\partial u_y}{\partial z} + \frac{\partial u_z}{\partial y} & 2 \frac{\partial u_z}{\partial z} \end{pmatrix} \quad (5)$$

Для нахождения угловой скорости вращения тела $\vec{\omega}_b$ в модели твёрдого тела была использована теорема о кинетическом моменте [11]:

$$\left(\frac{d\vec{L}}{dt} \right)_{\text{ин.сис}} = \vec{M} \quad (6)$$

где \vec{M} – момент действия внешних сил, \vec{L} – кинетический момент тела. Брать производную по времени необходимо в инерциальной системе отсчёта. В системе отсчёта тела эта производная может быть расписана как [12]:

$$\left(\frac{d\vec{L}}{dt} \right)_{\text{ин.сис}} = \left(\frac{d\vec{L}}{dt} \right)_{\text{тело}} + \vec{\omega} \times \vec{L} \quad (7)$$

Зная, что кинетический момент \vec{L} выражается через тензор инерции тела \mathbf{I} как $\vec{L} = \mathbf{I}\vec{\omega}$ и тензор инерции в системе отсчёта тела постоянен, подставим представление кинетического момента в (6) и получим:

$$\mathbf{I} \frac{d\vec{\omega}}{dt} + \vec{\omega} \times \mathbf{I}\vec{\omega} = \vec{M} \quad (8)$$

Так как в COMSOL нет удобного обозначения для тензоров и векторов, распишем (8) по компонентам i ($i \in \{x, y, z\}$) и получим дифференциальное уравнение на ω :

$$M_i - \sum_{k=1}^3 (I_{i,k} \dot{\omega}_k + [I_{i+2,k} \omega_{i+1} - I_{i+1,k} \omega_{i+2}] \omega_k) = 0 \quad (9)$$

где момент внешних сил находим как:

$$\vec{M} = \oint_S \vec{r} \times \vec{F}_b ds \quad (10)$$

2.1 Сфероид

Одна из самых распространённых моделей для описания поведения тромбоцита или эритроцита в потоке жидкости – модель капсуля-сфероида с упругими или жёсткими стенками [13-16].

Момент сил, действующий на твёрдый сфероид находящийся в жидкости без силы тяжести можно расписать как:

$$\vec{T}_0 = \mu \hat{Q} \left[\left(\mathbb{I} \times \vec{u} \right)_0 + \frac{3! \cdot 2}{5!} (D^2 \mathbb{I} \times \vec{u})_0 + \frac{3! \cdot 3}{7!} (D^4 \mathbb{I} \times \vec{u})_0 + \dots \right] \quad (11)$$

где индекс «0» означает, что рассматривается невозмущённый поток в точке, соответствующей центру эллипсоида, а операторы расписываются как:

$$\begin{cases} \mathbb{I} = \vec{i} \cdot a^2 \frac{\partial}{\partial x} + \vec{j} \cdot b^2 \frac{\partial}{\partial y} + \vec{k} \cdot c^2 \frac{\partial}{\partial z} \\ D^2 = a^2 \frac{\partial^2}{\partial x^2} + b^2 \frac{\partial^2}{\partial y^2} + c^2 \frac{\partial^2}{\partial z^2} \end{cases} \quad (12)$$

где $\{i, j, k\}$ – единичные вектора, $\{a, b, c\}$ – полуоси эллипсоида (по основным осям $\{x, y, z\}$ соответственно). Тензор \hat{Q} для эллипсоида выводится в работе [14] и сокращается в при выводе формулы для ω_z , так что не будем его приводить.

В гладком параболическом профиле скоростей из формулы (11) ненулевым является только первое слагаемое. Так как эритроцит и тромбоцит имеют осевую симметрию, их можно представить эллипсоидом вращения. Тогда полуоси будут $(k \cdot a, a, k \cdot a)$.

$$\begin{cases} \vec{T} = a^2 \mu \hat{Q} \begin{bmatrix} \partial_y u_z - k^2 \partial_z u_y \\ k^2 \partial_z u_x - k^2 \partial_x u_z \\ k^2 \partial_x u_y - \partial_y u_x \end{bmatrix} \\ \vec{u} = \left(u_{max} \left(1 - \left(\frac{y - y_0}{R_0} \right)^2 \right), 0, 0 \right) \end{cases} \quad (13)$$

где u_{max} – скорость в центре потока, y_0 – расстояние между центром потока и центром клетки, R_0 – радиус капилляра. Повернув поток вокруг клетки на угол α (вокруг оси z) получим зависимость раскручивающего момента от угла:

$$\vec{T}(\alpha) = a^2 \mu \hat{Q} \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ (1 + (k^2 - 1) \sin^2 \alpha) \frac{2u_{max} y_0}{R_0^2} \end{bmatrix} \quad (14)$$

Для эллипсоида существует также тормозящий момент $\vec{T}(\omega)$. Из-за малости отличия плотности клетки от плотности жидкости можно пренебречь инерционным движением клетки (соответственно, влиянием углового ускорения) и рассматривать только «стационарную» зависимость $\omega(\alpha)$. В таком случае раскручивающий и тормозящий моменты должны быть равны:

$$\vec{T}(\omega) = a^2 \mu \hat{Q} \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ \omega(k^2 + 1) \end{bmatrix} = \vec{T}(\alpha) \quad (15)$$

В итоге получается простая аналитическая формула для зависимости $\omega(\alpha)$:

$$\omega(\alpha) = (1 + (k^2 - 1) \sin^2 \alpha) \frac{2u_{max} y_0}{R_0^2 (k^2 + 1)} \quad (16)$$

Если попробовать напрямую записать формулу 16 в COMSOL, и посчитать модель с движением эллипсоида по такому закону методом конечных элементов, то увидим хорошую сходимость с аналитическим решением (рис. 1). Естественно, улучшение сетки приближает решение к аналитическому. Для оценки разницы моделей воспользуемся таким параметром как относительная среднеквадратичная разница δ . Её можно вычислить по формуле:

$$\delta = \frac{\sqrt{\frac{\sum (\omega_m - \omega_a)^2}{n}}}{\sqrt{\frac{\sum (\omega_a)^2}{n}}} \quad (17)$$

где ω_m – набор угловых скоростей для различных положений эллипсоида, ω_a – угловая скорость, посчитанная по (16). Для грубой сетки относительная среднеквадратичная разница $\sim 0,25$ (т.е. 25%). Для более точной сетки относительная среднеквадратичная разница уже уменьшается до $\sim 0,05$ (5%).

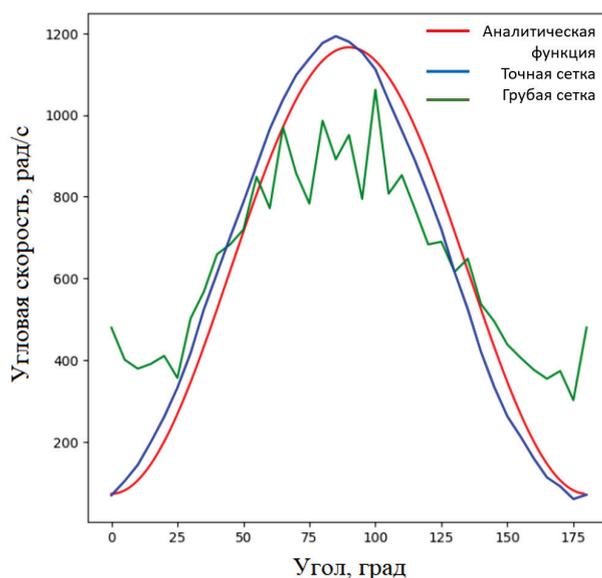


Рисунок 1. Сравнение зависимости угловой скорости эллипсоида от угла наклона для аналитической модели и решения COMSOL для двух видов сетки (грубой и более точной)

Моделирование поведения сфероида в жидкости было проведено с использованием конкретных значений: диаметр капилляра 254 мкм (что соответствует внутреннему диаметру измерительной кюветы сканирующего проточного цитометра), средняя скорость потока установлена 1 м/с (учитывая параболический профиль скорости, в центре потока скорость достигает 2 м/с), расстояние клетки от центра потока принято за 5 мкм, отношение полуосей сфероида k принято за 4 (что приводится в работе [17] как типичное соотношение полуосей для сфероида, описывающего эритроцит).

На рисунке 1 сравнивается зависимость угловой скорости частицы от угла поворота для модели, рассчитанной в COMSOL на грубой и более точной сетки. Относительная среднеквадратичная разница между моделью с точной сеткой и аналитической моделью $\sim 11\%$. Можно заметить, что зависимость для точной сетки имеет максимум скорости вращения в положении около 85° . И судя по угловой скорости в положениях около 0° и 175° можно предположить, что произошёл сдвиг зависимостей примерно на 5° . Если провести сдвиг на 5° и рассчитать относительную среднеквадратичную разницу, то точность увеличится (разница $\sim 1,6\%$). Это связано с тем, что в формуле (16) не используется диаметр эллипсоида, а только соотношение полуосей. В моделировании диаметр частицы был взят за 5 мкм, что соответствует маленькому эритроциту или крупному тромбоциту.

Как обсуждалось во введении, активация тромбоцитов зависит от уровня сдвигового напряжения и времени действия этого напряжения. Для проверки этого утверждения в различных работах использовались различные устройства для создания сдвигового напряжения. В целом можно разделить эксперименты на 2 вида: с прикреплёнными клетками и свободно плавающими. Интерес представляет вопрос о схожести воздействия сдвигового напряжения в этих случаях. Для ответа была создана дополнительная модель, в которой клетка

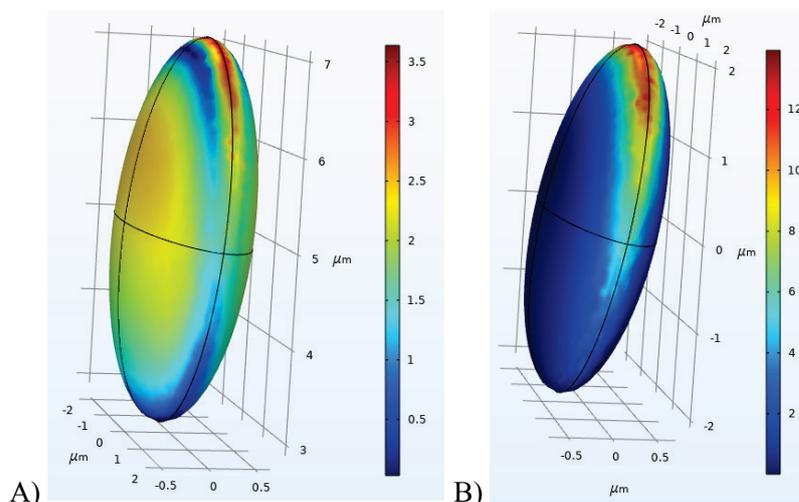


Рисунок 2. Распределение сдвигового напряжения (в Па) по поверхности клетки в моделях: А) сфероид в капилляре, В) сфероид, закреплённый на подложке

прикреплялась жёстко к неподвижной подложке, а верхняя подложка перемещалась с постоянной скоростью. Тогда во всём объёме жидкости сдвиговое напряжение одинаково. Скорость была подобрана таким образом, чтобы сдвиговое напряжение в жидкости было равно сдвиговому напряжению в точке, соответствующей центру эллипсоида в капилляре. Сравнение распределений действующего сдвигового напряжения представлено на рисунке 2. И, хотя среднее по поверхности значение сдвигового напряжения отличаются слабо (~1.9 Па для клетки в капилляре и ~3 Па для закреплённой клетки), максимальные значения отличаются более существенно (~4 Па для клетки в потоке и ~13 Па для закреплённой клетки). Это может различным образом повлиять на активацию тромбоцита в таких системах.

2.2 Форма эритроцита

Один из наиболее близких к реальной форме эритроцита способов описания формы представлен в работе [14]:

$$z(\rho) = R \sqrt{1 - \left(\frac{\rho}{R}\right)^2 \left(C_0 + C_1 \left(\frac{\rho}{R}\right)^2 + C_2 \left(\frac{\rho}{R}\right)^4\right)} \quad (18)$$

где z и ρ – цилиндрические координаты, $C_0 = 0,187$, $C_1 = 1,035$, $C_2 = -0,774$. Диаметр клетки снова примем за 5 мкм. После получения зависимости скорости вращения эритроцита от угла необходимо разобраться с вопросом: какой сфероид считать аналогичным данному эритроциту. У эритроцита можно выделить 3 основных параметра, влияющих на скорость вращения: объём, диаметр и толщина. Так как объём эллипсоида напрямую связан с диаметром и толщиной, а для подгонки модели COMSOL варьируется только параметр $k=a/b$, то получаем 3 возможных варианта подгонки эритроцита эллипсоидом попарно фиксируя объём, диаметр и толщину. В таблице 1 собраны возможные комбинации параметров, значения k для каждой комбинации, схематический рисунок и значение относительного среднеквадратичного отклонения δ . Наилучшим образом среди перечисленных вариантов эритроцит описывает эллипсоид с аналогичными значениями объёма и диаметра. Если провести аппроксимацию зависимости угловой скорости эритроцита от угла, то получим значение $k = 2,216 \pm 0,005$. Относительное среднеквадратичное отклонение для угловой скорости в этом случае уменьшается до 0,5%.

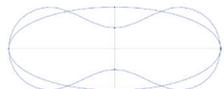
Дополнительно рассмотрим распределение сдвигового напряжения по поверхности эритроцита (рис. 3). Средние по поверхности значения сдвигового напряжения практически не отличаются от эллипсоида. Однако распределение сдвигового напряжения на эритроците в капилляре достаточно сильно отличается в перетяжке и вокруг неё, что может представлять интерес при дальнейшем моделировании упругой деформации эритроцита.

3. Экспериментальная установка

3.1. Пробоподготовка

В качестве капилляров различного диаметра использовались медицинские иглы и иглы для мезотерапии. Маркировки и параметры игл представлены на рисунке 4 с полученной оценкой сдвигового напряжения согласно уравнению 2. Схема конструкции для крепления игл к шприцу представлена на рисунке 2. Шприц для набора крови закреплялся в вертикальном положении. Снизу аккуратно подводился открытый вакутейнер с кровью донора. К помпе шприца закреплялся подвижный блок, который приводился в движение грузом известной массы, так чтобы помпа двигалась вверх или вниз. Для всех экспериментов помпа была одна, так что она тщательно промывалась сначала в растворе 60% медицинского спирта, после в физрастворе. Вторая часть шприца и иглы менялись для каждой пробы. Сначала набиралось 300 мкл в шприц, которые затем продавливались через ту же иглу в пробирку.

Таблица 1. Различные комбинации параметров для описания эритроцита эквивалентным эллипсоидом, получаемые соотношения полуосей k , схематичный рисунок и относительное среднеквадратичное отклонение в вычислении угловой скорости.

Равные параметры	$k=a/b$	Рисунок	δ
Диаметр и толщина	2.55		~5%
Объём и диаметр	2.15		~1.1%
Объём и толщина	2.77		~7%

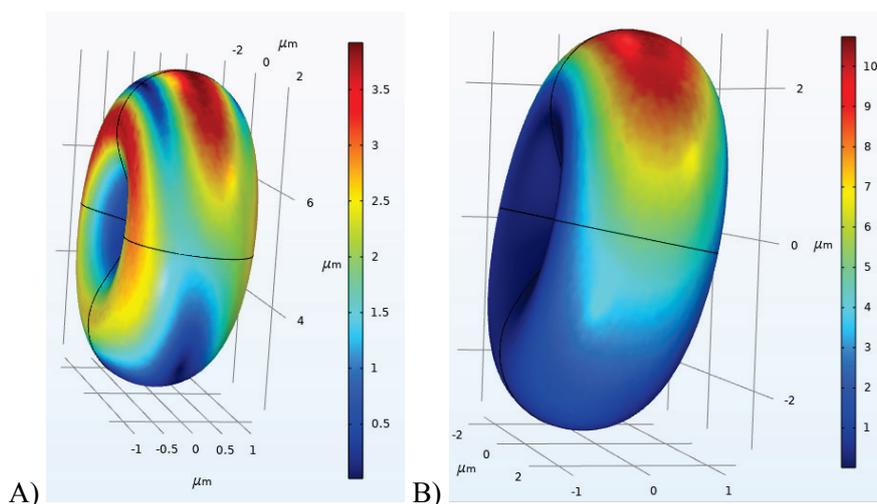


Рисунок 3. Распределение сдвигового напряжения (в Па) по поверхности клетки в моделях: А) эритроцит в капилляре, В) эритроцит, закреплённый на подложке

Образец крови донора был собран в одноразовый пластиковый вакутейнер с антикоагулянтом EDTA в соотношении кровь:EDTA как 9:1. Письменное информированное согласие было получено в соответствии с Хельсинкской декларацией. Из пробы, прошедшей через иглу, набиралось по 1 мл в 3 пробирки для 3-х измерений. Первую пробу разбавляли физраствором в соотношении физраствор:проба как 500:1. Вторая проба разбавлялась физраствором в соотношении физраствор:проба как 10:1, из неё набиралось 5 мл и добавлялось в 500 мл лизирующего раствора (150 мМ NH₄Cl). Третья проба разбавлялась физраствором в соотношении физраствор:проба как 10:1, из неё набиралось 5 мл и добавлялось в 500 мл раствора нифедипина (0,01%). Перед измерением на проточном сканирующем цитометре в каждую пробу добавлялись полистирольные микросферы диаметром 3.7 мкм для инициализации цитометра.

3.2 Сканирующий проточный цитометр

Оптическая система сканирующего проточного цитометра (рис. 5) отличается от классического цитометра возможностью записи индикатрисы частицы (зависимости интенсивности рассеянного частицей света от угла светорассеяния). Луч лазера 1, проходя через поляризатор, четвертьволновую пластинку и собирающую линзу, распространяется вдоль потока жидкости в измерительной кювете. Будучи рассеянным на частице, свет падает на полусферическое зеркало. В зависимости от положения частицы в кювете, только рассеянный под определённым углом свет попадает на зеркало с отверстием по центру и попадает на фотодетектор 1 (ФД1), который является фотоэлектронным умножителем (ФЭУ). Такая система позволяет получать индикатрису в углах от 10° до 70°. По азимутальному углу (в плоскости перпендикулярной движению частицы) происходит интегрирование, так как ФЭУ собирает весь сигнал, прошедший диафрагму. При выходе из рабочей зоны частица пересекает триггерный луч (исходящий из лазера 2 на рис. 5). Маска перед ФД2 отсекает постоянное излучение лазера 2, что позволяет регистрировать только рассеянный частицей сигнал.

Маркировка	Внутренний диаметр, мм	Длина, мм	Эффективное сдвиговое напряжение, Па	Эффективное время действия, сек
22G	0.41 ± 0.02	38	~94	~0.05
23G	0.33 ± 0.02	38	~76	~0.07
26G	0.26 ± 0.02	12	~190	~0.011
30G	0.16 ± 0.02	8	~170	~0.013
31G	0.13 ± 0.02	6	~190	~0.011
32G	0.11 ± 0.02	12	~80	~0.06

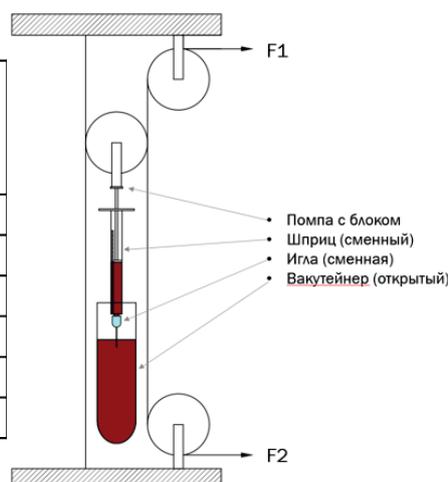


Рисунок 4. Схема экспериментальной установки. Вакутейнер был закреплён для аккуратного подведения крови к игле, шприц закреплён вертикально. Шприц и игла менялись перед каждой экспериментальной группой, помпа с закреплённым блоком тщательно промывалась

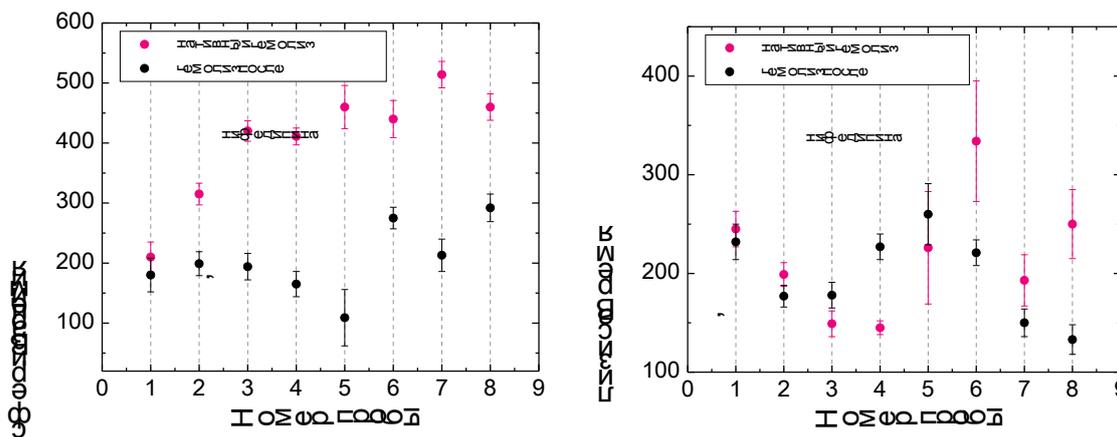


Рисунок 6. Времена сферизации и лизиса до и после воздействия нифедипина. Номера пробы представлены следующим образом: 1) со стандартной пробоподготовкой, 2) без иглы, 3-8) используя иглы в соответствии с рисунком 4.

4. Результаты

Полученные индикатрисы частиц (эритроцитов и полистирольных микросфер диаметром 3.7 мкм) были обработаны программой, для получения параметров эритроцитов. Параметры каждой клетки были собраны в таблицу и обработаны статистически в программе Origin 2018. В эксперименте было использовано 8 вариантов воздействия на эритроциты: 1 – стандартный забор пробы из вакутейнера пипеткой, 2 – забор крови в шприц без иглы, 3-8 – пропускание крови через иглы.

Сканирующий проточный цитометр дает возможность измерить предельную растяжимость мембраны и количество анионных обменников эритроцита [18]. Для этого эритроциты помещают в лизирующий раствор, согласно протоколу пробоподготовки описанному выше, для запуска процесса гемолиза. Во время обработки данных отслеживают относительное количество сферизованных эритроцитов.

Были получены графики зависимости времени сферизации и времени лизиса эритроцитов в лизирующем растворе (рис. 6). Наблюдается некая зависимость от диаметра капилляра для времени сферизации. Это свидетельствует об уменьшении количества активно работающих анионных обменников под воздействием сдвигового напряжения. При выдержке пробы с эритроцитами в растворе нифедипина мы можем видеть на рисунке 6 уменьшения времени сферизации (результаты представлены черными точками), что свидетельствует об увеличении числа активно работающих анионных обменников. Такой результат является ожидаемым, так как нифедипин неселективно блокирует кальциевые каналы и насосы на мембране эритроцита. Это приводит к накоплению кальция внутри клетки, модификации белков и увеличения их суммарной скорости работы – сферизация происходит быстрее [3]. Однако, можно заметить, что воздействие нифедипина нивелирует величину эффекта прохождения эритроцитами узких игл. Но даже при компенсаторном эффекте от активации препаратом, наблюдается увеличение скорости сферизации для трех самых узких игл диаметрами 0,11÷0,16 мм. Из этого можно сделать вывод, что такие диаметры капилляра приводят к необратимым изменениям свойства мембраны – рабочей конформации анионного обменника эритроцитов. Можно также отметить, что эффект слабо выражен на временах лизиса, которые отвечают за предельную растяжимость мембраны. Характер изменения времени

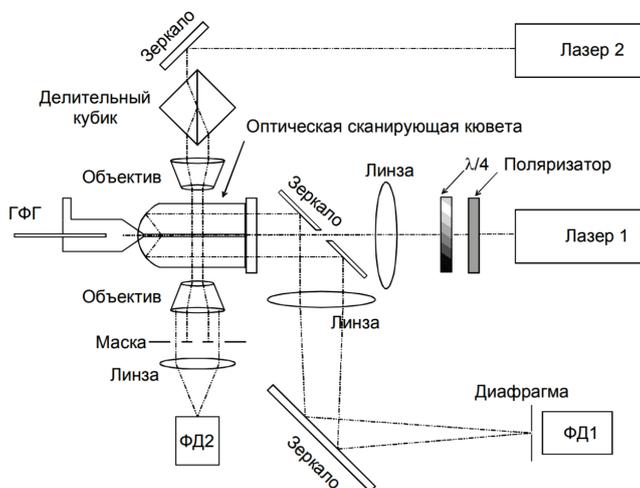


Рисунок 5. Схема оптической системы проточного сканирующего цитометра

лизиса ведет себя неоднозначно от диаметра иглы. При этом наблюдается различное превышение времени лизиса для игл с минимальными диаметрами. Наблюдаемые результаты свидетельствуют в пользу гипотезы об изменении рабочего состояния анионных обменников при прохождении узких капилляров, что приводит к уменьшению скорости их работы, тем самым к увеличению времени, которое требуется эритроцитам для достижения сферической формы в процессе гемолиза.

5. Заключение

В работе проведено моделирование поведения частицы в потоке жидкости при помощи программного пакета COMSOL. Создана база для изучения деформаций частицы в потоке, получены сдвиговые напряжения, возникающие в системах с различными конфигурациями системы. Показано, что, хотя среднее действующее значение сдвигового напряжения для частицы в потоке и прикрепленной к подложке одинаково, распределение сил по поверхности различно, что в случае тромбоцита может приводить к различным уровням активации. Также показано, что при вычислении скорости вращения эритроцита в потоке существует эквивалентный эллипсоид, имеющий аналогичную зависимость скорости вращения от угла. В случае изучения этой зависимости стоит использовать компьютерное моделирование при положении частицы относительно центра потока соизмеримом с размерами частицы. Однако для оценки вращения реальных эритроцитов достаточно использовать формулу 16 и брать эквивалентный сфероид с параметрами, которые проще измерить для эритроцита (так как максимальная ошибка составит не более 7%).

Эксперимент показал, что сканирующий проточный цитометр способен зафиксировать изменение скорости работы анионного обмена эритроцитов в зависимости от конфигурации подачи пробы. Так как при этом времена сферизации и лизиса эритроцитов претерпевают изменения, что свидетельствует о модификации рабочего состояния анионного обменника в результате сдвигового напряжения, возникающего в узких капиллярах.

Список литературы / References:

1. Robinson J.P., Roederer M. Flow cytometry strikes gold. *Science*, 2015, vol. 350, iss. 6262, pp. 739-740, doi: 10.1126/science.aad6770.
2. Giesecke C., Feher K., Von Volkmann K., Kirsch J., Radbruch A., Kaiser T. Determination of background, signal-to-noise, and dynamic range of a flow cytometer: A novel practical method for instrument characterization and standardization: Determination of Flow Cytometer's SNR and DNR. *Cytometry*, 2017, vol. 91, iss. 11, pp. 1104-1114, doi: 10.1002/cyto.a.23250.
3. Yastrebova E.S., Konokhova A.I., Strokotov D.I., Karpenko A.A., Maltsev V.P., Chernyshev A.V. Proposed Dynamics of CDB3 Activation in Human Erythrocytes by Nifedipine Studied with Scanning Flow Cytometry. *Cytometry, Part A*, doi: 10.1002/cyto.a.23918.
4. Gilev K.V. et al. Advanced consumable-free morphological analysis of intact red blood cells by a compact scanning flow cytometer. *Cytometry, Part A*, 2017, vol. 91, iss. 9, pp. 867-873, doi: 10.1002/cyto.a.23141.
5. Lee H., Kim G., Lim C., Lee B., Shin S. A simple method for activating the platelets used in microfluidic platelet aggregation tests: Stirring-induced platelet activation. *Biomicrofluidics*, 2016, vol. 10, iss. 6, p. 064118, doi: 10.1063/1.4972077.
6. Shankaran H., Alexandridis P., Neelamegham S. Aspects of hydrodynamic shear regulating shear-induced platelet activation and self-association of von Willebrand factor in suspension. *Blood*, 2003, vol. 101, iss. 7, pp. 2637-2645, doi: 10.1182/blood-2002-05-1550.
7. Rahman S.M., Eichinger C.D., Hlady V. Effects of upstream shear forces on priming of platelets for downstream adhesion and activation. *Acta Biomaterialia*, 2018, vol. 73, pp. 228-235, doi: 10.1016/j.actbio.2018.04.002.
8. Sheriff J., Soares J.S., Xenos M., Jesty J., Bluestein D. Evaluation of Shear-Induced Platelet Activation Models Under Constant and Dynamic Shear Stress Loading Conditions Relevant to Devices. *Ann Biomed Eng*, 2013, vol. 41, iss. 6, pp. 1279-1296, doi: 10.1007/s10439-013-0758-x.
9. Koutsiaris A.G. et al. Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules in vivo. *Biorheology*, 2007, vol. 44, iss. 5-6, pp. 375-386.
10. Ilkan Z., Wright J.R., Goodall A.H., Gibbins J.M., Jones C.I., Mahaut-Smith M.P. Evidence for shear-mediated Ca²⁺ entry through mechanosensitive cation channels in human platelets and a megakaryocytic cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, vol. 292, iss. 22, pp. 9204-9217, doi: 10.1074/jbc.M116.766196.
11. Alemu Y., Bluestein D. Flow-induced Platelet Activation and Damage Accumulation in a Mechanical Heart Valve: Numerical Studies. *Artificial Organs*, 2007, vol. 31, iss. 9, pp. 677-688, doi: 10.1111/j.1525-1594.2007.00446.x.
12. Kroll M.H., Hellums J.D., McIntire L.V., Schafer A.I., Moake J.L. Platelets and shear stress. *Blood*, 1996, vol. 88, iss. 5, pp. 1525-1541.
13. Barthes-Biesel D. Motion of a spherical microcapsule freely suspended in a linear shear flow. *J. Fluid Mech.*, 1980, vol. 100, iss. 4, pp. 831-853, doi: 10.1017/S0022112080001449.
14. Barthes-Biesel D., Rallison J.M. The time-dependent deformation of a capsule freely suspended in a linear shear flow. *J. Fluid Mech.*, 1981, vol. 113, iss. 1, p. 251, doi: 10.1017/S0022112081003480.
15. Vahidkhan K., Diamond S.L., Bagchi P. Platelet Dynamics in Three-Dimensional Simulation of Whole Blood. *Biophysical Journal*, 2014, vol. 106, iss. 11, pp. 2529-2540, doi: 10.1016/j.bpj.2014.04.028.
16. Doddi S.K., Bagchi P. Three-dimensional computational modeling of multiple deformable cells flowing in microvessels. *Phys. Rev. E*, 2009, vol. 79, iss. 4, p. 046318, doi: 10.1103/PhysRevE.79.046318.

17. Gilev K.V., Yurkin M.A., Chernyshova E.S., Strokotov D.I., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. Mature red blood cells: from optical model to inverse light-scattering problem. *Biomed Opt Express*, 2016, vol. 7, iss. 4, pp. 1305-1310, doi: 10.1364/BOE.7.001305.

18. Yastrebova E.S. et al. Erythrocyte lysis and angle-resolved light scattering measured by scanning flow cytometry result to 48 indices quantifying a gas exchange function of the human organism. *Cytometry Pt A*, 2022, doi: 10.1002/cyto.a.24554.

INFLUENCE OF THE BLOOD FLOW THROUGH THE CAPILLARY ON THE MAIN PARAMETERS OF ERYTHROCYTES

Yastrebova E.S., Lagunov T.A.

Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS

Institutskaya, str., 3, Novosibirsk, 630090, Russia; e-mail: kat30cer@kinetics.nsc.ru

Received 19.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0627

Abstract. The trends in personalized medicine lead to the necessity of determining the normal range of biological parameters for each individual. This task requires high precision in the obtained parameters and frequent measurements. To ensure high accuracy in determining the morphological and functional parameters of blood cells, the method of scanning flow cytometry (SFC) has proven to be effective. Within this study, a needle-free venipuncture system is being developed to provide more comfortable conditions for blood collection during frequent monitoring of one's parameters. However, although such a system allows for much smaller skin punctures than a needle, the question arises as to whether these small openings can affect the blood cell parameters measured by SFC. This study identified the first potential factor influencing blood cell parameters - shear stress. The behavior of erythrocyte parameters was investigated as needles of different diameters passed through them. COMSOL modeling was conducted to analyze the distribution of forces acting on the surface of an ellipsoid (as a model for platelets and erythrocytes) in two scenarios: free cell movement in a capillary and for a cell attached to a substrate.

Key words: *erythrocytes, anion exchange, shear stress, scanning flow cytometer.*