

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М. В. ЛОМОНОСОВА

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Ермолинский Петр Борисович

**Особенности микрореологии и сил взаимодействия
компонентов системы крови в норме и при
сердечно-сосудистых заболеваниях**

Специальность: 1.3.21. Медицинская физика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доцент, к.ф.-м.н. Приезжев А.В.

Москва — 2025

Оглавление

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	6
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Кровь и её микрореологические свойства	12
1.1.1 Эритроциты	13
1.1.2 Тромбоциты	15
1.1.3 Микрореология крови	16
1.2 Агрегация эритроцитов	17
1.2.1 Физиологическая роль агрегации эритроцитов	18
1.2.2 Агрегация и агрегационная способность эритроцитов	19
1.2.3 Макромолекулярные факторы агрегации эритроцитов	20
1.2.4 Клеточные факторы в агрегации эритроцитов	21
1.2.5 Модели механизмов агрегации эритроцитов	21
1.2.6 Агрегация эритроцитов при социально-значимых заболеваниях	27
1.3 Деформируемость эритроцитов	29
1.3.1 Физиологическая роль деформируемости эритроцитов	29
1.3.2 Механизмы деформируемости эритроцитов	29
1.3.3 Деформируемость эритроцитов при социально-важных заболеваниях	30
1.4 Агрегация тромбоцитов	30
1.4.1 Физиологическая роль агрегации тромбоцитов	30
1.4.2 Основные механизмы агрегации тромбоцитов	31
1.4.3 Агрегация тромбоцитов при социально-важных заболеваниях	31
1.5 Эндотелий и его влияние на кровоток	32
1.5.1 Взаимодействие эндотелия и клеток крови	32
1.5.2 Адгезия эритроцитов к эндотелию в норме и патологии	32
1.6 Современные оптические методы измерения микрореологических параметров крови	33
1.6.1 Оптические свойства крови	33
1.6.2 Лазерная агрегометрия	33

1.6.3	Лазерная эктацитометрия	41
1.6.4	Турбидиметрия для исследования функции тромбоцитов . . .	41
1.6.5	Оптический захват	43
1.6.6	Цифровая капилляроскопия	52
1.6.7	Другие оптические методы	53
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ		55
2.1	Материалы	55
2.1.1	Подготовка образцов крови	55
2.1.2	Этические нормы работы с кровью	57
2.2	Методы	58
2.2.1	Лазерная агрегометрия эритроцитов	58
2.2.2	Лазерная эктацитометрия эритроцитов	63
2.2.3	Оптическая турбидиметрия и ФСП-метод	65
2.2.4	Лазерный пинцет	69
2.2.5	Цифровая капилляроскопия	78
2.3	Статистическая обработка данных	80
2.3.1	Определение статистической значимости	80
2.3.2	Расчет корреляций между параметрами	81
ГЛАВА 3. МИКРОРЕОЛОГИЯ КРОВИ ПРИ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ		82
3.1	Влияние основного и сопутствующего заболевания на микрореологические параметры крови	82
3.1.1	Группы пациентов	82
3.1.2	Полученные результаты и их анализ	83
3.2	Корреляции микрореологических параметров крови	86
3.2.1	Группы пациентов	86
3.2.2	Полученные результаты и их анализ	86
3.3	Характеристика капиллярного кровотока в норме, при ишемической болезни сердца, и при фибрилляции предсердий	91
3.3.1	Группы пациентов	91
3.3.2	Полученные результаты и их анализ	91

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ И ВНУТРЕННИХ ФАКТОРОВ, ВКЛЮЧАЯ СОСУДИСТЫЙ ЭНДОТЕЛИЙ, НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК КРОВИ	95
4.1 Влияние нитропруссида натрия на микрореологические свойства эритроцитов	95
4.1.1 Подготовка образцов	96
4.1.2 Полученные результаты и их анализ	97
4.2 Влияние фибриногена на взаимодействие эритроцитов и эндотелия	101
4.2.1 Подготовка образцов	101
4.2.2 Полученные результаты и их анализ	101
4.3 Влияние L-аргинина и L-NAME на взаимодействие эритроцитов и эндотелия	104
4.3.1 Подготовка образцов	105
4.3.2 Полученные результаты и их анализ	106
4.4 Гидродинамическая прочность эритроцитарных агрегатов в микрофлюидном канале, выстланном эндотелиальными клетками .	108
4.4.1 Подготовка образцов	108
4.4.2 Результаты и обсуждения	109
4.5 Влияние температуры на агрегацию эритроцитов	112
4.5.1 Подготовка образцов	112
4.5.2 Полученные результаты и их анализ	113
ГЛАВА 5. СОЗДАНИЕ ПОРТАТИВНОГО ЭРИТРОЦИТАРНОГО АГРЕГОМЕТРА	115
5.1 Лазерные агрегометры для исследования агрегационных свойств эритроцитов	115
5.2 Воздействие вибраций на сдвиговые скорости в кювете: численное моделирование	117
5.2.1 Программный комплекс и начальные условия моделирования	118
5.2.2 Влияние амплитуды и частоты вибраций на сдвиговые скорости в кювете	119
5.2.3 Зависимость сдвиговых скоростей от толщины кюветы	120
5.3 Портативный лазерный агрегометр крови	121
5.3.1 Принципиальная схема установки	122
5.3.2 Электрическая схема агрегометра	124

5.3.3	Конструкция агрегометра	126
5.3.4	Программное обеспечение для агрегометра	127
5.3.5	Протокол измерения параметров агрегации эритроцитов . . .	127
5.4	Полученные результаты на агрегометре	131
5.4.1	Зависимость измеряемых параметров от гематокрита	131
5.4.2	Зависимость измеряемых параметров от толщины кюветы . .	131
5.4.3	Гистерезис агрегации эритроцитов	133
5.4.4	Повторяемость и точность получаемых результатов	135
5.5	Дальнейшие возможности усовершенствования агрегометра	137
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		138
ВЫВОДЫ		140
БЛАГОДАРНОСТИ		141
ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ		142
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ		146
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Валидация 2D модели агрегации жестких клеток		173
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Численный расчет силы Стокса для эритроцита		175
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Расширение парного пермутационного теста		178

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АГ	— артериальная гипертензия
АДФ	— аденозиндифосфат
АЧХ	— амплитуда-частотная характеристика
АЭ	— агрегация эритроцитов
АТ	— агрегация тромбоцитов
БТП	— бедная тромбоцитами плазма
ВВЭ	— внутриклеточная вязкость эритроцитов
ГА	— гистерезис агрегации
ДЭ	— деформируемость эритроцитов
ИБС	— ишемическая болезнь сердца
ЛП	— лазерный пинцет
НПН	— нитропруссид натрия
ОТП	— обогащенная тромбоцитами плазма
ОП	— оптическая плотность
ОБ	— общий белок
СД2Т	— сахарный диабет 2-го типа
СА	— сила агрегации
СД	— сила дезагрегации
ССЗ	— сердечно-сосудистые заболевания
СКК	— скорость капиллярного кровотока
СОЭ	— скорости оседания эритроцитов
ФП	— фибрилляция предсердий
ФСП	— флуктуации светопропускания
ЭДТА	— этилендиаминтетрауксусная кислота
AI	— от англ. <i>aggregation index</i> — индекс агрегации
CSS	— от англ. <i>critical shear stress</i> — критическое сдвиговое напряжение
DI	— от англ. <i>deformation index</i> — индекс деформируемости
NO	— оксид азота
PBS	— фосфатно-буферный раствор
PVP	— поливинилпириллидон
SD	— стандартное отклонение

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Микрореологические параметры крови отражают её текущие свойства в капиллярах и малых сосудах. По большей части они зависят от свойств клеток крови (таких как размеры клеток, их деформируемость и др.), а также от взаимодействия форменных элементов крови между собой (агрегация эритроцитов/тромбоцитов, взаимодействие клеток крови и сосудистого эндотелия и др.) [1].

Эритроциты — красные клетки крови, основная функция которых заключается в переносе кислорода к тканям и углекислого газа от тканей, обладают способностью обратимо деформироваться в сдвиговом потоке, что позволяет им проходить сквозь капилляры, диаметр которых меньше, чем их поперечные размеры [2]. Способность эритроцитов к деформации позволяет им также увеличивать площадь поверхности, что повышает эффективность газообмена [3]. Эритроциты при малых сдвиговых напряжениях в потоке крови способны обратимо и спонтанно взаимодействовать друг с другом. Данное взаимодействие приводит к созданию линейных и более сложных структур — эритроцитарных агрегатов, и называется агрегацией эритроцитов (АЭ) [4]. АЭ и деформируемость эритроцитов (ДЭ) существенным образом влияют на вязкость крови и микроциркуляцию во всем организме.

Тромбоциты играют важнейшую роль в поддержании системы кровообращения, участвуя в процессах тромбообразования и коагуляции крови. При повреждении стенки кровеносного сосуда тромбоциты активируются, адгезируются на повреждённой сосудистой стенке и взаимодействуют друг с другом посредством агрегации тромбоцитов (АТ) [5].

В организме процессы АЭ, ДЭ и АТ взаимовлияют друг на друга. К примеру, изменение ДЭ приводит к изменению АЭ [6, 7]. В свою очередь процесс АЭ в сосудах приводит к вытеснению тромбоцитов из центра сосуда к его стенке, что позволяет тромбоцитам лучше выполнять свои основные функции [8]. Также важно отметить, что сосудистый эндотелий оказывает воздействие на рассматриваемые процессы, значительно влияя на них [9].

В течение последних десятилетий болезни системы кровообращения остаются основной причиной смерти в большинстве стран мира [10]. Основным подмножеством данных болезней являются сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ). При ССЗ параметры крови, и в том числе, микроциркуляция крови, претерпевают

значительные изменения, что приводит к ухудшению перфузии тканей, нарушениям системы гомеостаза и другим осложнениям [11]. К примеру, пониженная ДЭ приводит не только к нарушению способности эритроцитов проходить через терминальные капилляры, но и замедляет высвобождение вазоактивных медиаторов, необходимых для вазорегуляции [12]. Это в свою очередь может приводить к дисфункции эндотелия и различным сосудистым осложнениям, к примеру, артериальной гипертензии [13]. Повышенная АЭ и пониженная ДЭ наблюдаются при диабете 1-го и 2-го типа [14], артериальной гипертензии [15], ишемической болезни сердца [16], при острой артериальной/венозной непроходимости [17] и других ССЗ [4]. Повышенная АТ при ССЗ приводит также к повышенному риску образования тромбов [18].

Важно отметить, что в ряде случаев отклонение параметров микроциркуляции от нормы может указывать на активацию регуляторных функций организма, а не на наличие патологических процессов в организме [4, 19].

Несмотря на то, что кровь и её микроциркуляция исследуется много лет, остается много вопросов и неясностей по поводу процессов АЭ, ДЭ и АТ [20]. В частности, до конца не исследован(ы) механизм(ы) АЭ. Не полностью изучено влияние ряда факторов на АЭ: сосудистого эндотелия, белкового состава плазмы, влияние ДЭ на АЭ и многих других. На данный момент неизвестно, как между собой связаны различные параметры микроциркуляции в норме и при ССЗ. Фундаментальные и прикладные исследования параметров микроциркуляции крови позволят разработать новые методики её измерения, а также новые протоколы лечения пациентов с ССЗ, что обусловлено повышающимся интересом к оценке параметров микроциркуляции крови в медицинской науке. Данный интерес вызван тем, что реологические нарушения свойств крови, как правило, сопровождаются гиперкагуляцией, тромбозами и другими серьезными осложнениями [21].

Цели и основные задачи исследования

Цель работы заключалась в установлении количественных различий в микрореологических свойствах крови *in vitro* и *in vivo* в норме и при сердечно-сосудистых заболеваниях с применением оптических методов, а также в оценке влияния на эти свойства сосудистого эндотелия.

Для достижения поставленной цели в диссертационной работе были решены следующие **задачи**:

1. Определить изменения микрореологических параметров крови и взаимосвязи между ними при сердечно-сосудистых заболеваниях с использованием оптических методов;
2. Количественно охарактеризовать взаимодействие эритроцитов с сосудистым эндотелием и агрегацию эритроцитов *in vitro* с использованием лазерного пинцета;
3. Установить зависимость влияния оксида азота и фибриногена при их различных концентрациях на агрегацию эритроцитов при наличии монослоя эндотелия;
4. Разработать новую установку лазерного агрегометра для количественного измерения параметров агрегации эритроцитов.

Положения, выносимые на защиту

1. Лазерный пинцет обеспечивает количественное измерение *in vitro* сил взаимодействия между одиночными эритроцитами здоровых доноров и клетками сосудистого эндотелия (HUVEC) в диапазоне 0,5 – 5 пН, что ниже диапазона сил межэритроцитарной агрегации (1,5 – 7 пН) и дезагрегации (2 – 13 пН).
2. Экспериментально установлено, что сила адгезии эритроцитов здоровых доноров к эндотелиоцитам (HUVEC), измеренная *in vitro* методом лазерного пинцета, достигает насыщения ($2,8 \pm 0,1$ пН) при концентрациях фибриногена выше 4 мг/мл.
3. Силы агрегации одиночных эритроцитов здоровых доноров, измеренные *in vitro* с помощью лазерного пинцета, на монослое эндотелиальных клеток (HUVEC) в плазме крови снижаются на $19 \pm 2\%$ при предварительной инкубации эндотелия с L-аргинином в концентрации 100 мкМ, что обусловлено влиянием эндотелиальной NO-синтазы.
4. Гидродинамическая прочность агрегатов и индекс агрегации эритроцитов, измеренные *in vitro* методом лазерной агрегометрии, положительно статистически значимо коррелируют (по Пирсону) у пациентов с артериальной гипертензией и фибрилляцией предсердий ($r = 0,5$), а также при сопутствующих

заболеваниях: ишемической болезни сердца и/без сахарного диабета 2-го типа ($r = 0,3$ и $r = 0,5$).

Научная и практическая значимость работы

В диссертационной работе проведено исследование микрореологических свойств крови как *in vitro*, так и *in vivo* в норме и при ССЗ с использованием комплекса лазерно-оптических методов, включая лазерный пинцет, лазерную агрегометрию, эктацитометрию и цифровую капилляроскопию. Впервые с помощью лазерного пинцета были количественно измерены силы адгезии между эритроцитами и эндотелием, которые оказались ниже сил межэритроцитарной агрегации и дезагрегации в физиологических условиях. Показано, что силы взаимодействия эритроцитов с эндотелием достигают насыщения при концентрации фибриногена выше 4 мг/мл. Установлено, что инкубация эндотелия с L-аргинином, предшественником синтеза оксида азота, приводит к снижению агрегации эритроцитов за счёт активации эндотелиальной NO-синтазы. Кроме того, у пациентов с ССЗ выявлена зависимость корреляции между гидродинамической прочностью эритроцитарных агрегатов и индексом агрегации в зависимости от диагноза. Полученные результаты расширяют представления о биофизических механизмах регуляции микроциркуляции и могут быть использованы при разработке новых методов терапии и оценке микрореологических нарушений при ССЗ.

Апробация результатов

Результаты диссертационной работы были лично доложены автором диссертации на российских и международных конференциях, таких как 21st International Conference Laser Optics (ICLO) 2024, Невская фотоника 2023, Saratov Fall Meeting 2023, The 3rd World Congress of The European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation 2023, 12th World Congress of Microcirculation 2023, XIV Международная конференция «Микроциркуляция и гемореология» 2023, VII Съезд биофизиков России 2023, VIII Сеченовский Международный Биомедицинский Саммит 2023, 2nd BRICS Workshop on Biophotonics 2023, Saratov Fall Meeting 2022, 20th International Conference Laser Optics (ICLO) 2022, 11-я конференции по клинической гемостазиологии и гемореологии (РФТГ) 2022, 7th Eurosummer School on Biorheology & Symposium on Micro and Nano Mechanics and Mechanobiology of Cells, Tissues and Systems (BIORHEO2021), Saratov Fall Meeting 2021, Ломоносов-

2019, Saratov Fall Meeting 2019, XII международная конференция «Микроциркуляция и гемореология» 2018, Saratov Fall Meeting 2018, 6th Eurosummer School on Biorheology & Symposium on Micro and Nano Mechanics and Mechanobiology of Cells, Tissues and Systems (BIORHEO2018), Ломоносов-2018, Saratov Fall Meeting 2017.

Доклады по результатам, представленным в диссертационной работе, были удостоены ряда наград на конференции BIORHEO в Болгарии в 2018 и 2021 г., VII Съезде биофизиков России в 2023 г., Saratov Fall Meeting в 2018 г., конференции Ломоносов в 2018 г., на XIV международной конференции «Микроциркуляция и гемореология» в 2023 г. и др.

Личный вклад автора

Все данные, представленные в диссертационной работе, получены автором лично с его активным участием в постановке целей, разработке методологии и проведении экспериментов. Построение всех графиков и рисунков, а также обработка результатов в диссертации проведены автором.

Автор не участвовал в непосредственном измерении характеристик микроциркуляции крови в ногтевом ложе на капилляроскопе у пациентов, т.к. работать с пациентами разрешено только квалифицированным врачам.

Публикации

По результатам диссертационного исследования автором опубликовано 20 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science, Scopus и РИНЦ, включая 7 публикаций в журналах, входящих в перечень ВАК.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Кровь и её микрореологические свойства

С точки зрения физики кровь является неньютоновской тиксотропной жидкостью, реологические свойства которой зависят от многих факторов. С точки зрения биологии она является жидкой соединительной тканью, поскольку состоит из плазмы крови и форменных элементов — клеток: эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов [22]. У здорового взрослого человека объем плазмы достигает 50—60% от цельной крови, а доля клеток составляет в среднем 40-50% и зависит от пола. Основными клетками крови являются эритроциты, их концентрация составляет порядка 5×10^6 шт/мкл ($\approx 98\%$ от общего числа клеток крови), тогда как для тромбоцитов это значение ниже — 300×10^3 шт/мкл ($\approx 1\%$), и для лейкоцитов — 7000 шт/мкл ($\approx 1\%$) [23].

Сердце и кровеносные сосуды формируют замкнутую систему, в которой кровь, заключенная в кровеносные сосуды, не контактирует напрямую с клетками тканей органов. Взаимодействие веществ с этой замкнутой системой происходит исключительно через стенки сосудов, что обеспечивает поддержание высокого и стабильного кровяного давления, а также быстрый возврат крови к сердцу.

Кровеносные сосуды представляют собой систему замкнутых трубок различного диаметра, которые выполняют транспортную функцию, регулируют кровоснабжение органов и тканей. Кровеносные сосуды можно в первом приближении разделить на два класса: артерии и вены. По артериям насыщенная кислородом кровь течет от сердца к тканям; по венам обедненная кислородом и обогащенная углекислым газом крови движется от тканей к сердцу. Артерии характеризуются движением крови под высоким давлением, что обусловлено их прочными, толстыми и упругими стенками, тогда как вены имеют более тонкие стенки [24].

Капилляры представляют собой микроскопические сосуды, стенки которых состоят из одного слоя эндотелиальных клеток. Их средний диаметр составляет около 8 мкм, а толщина стенок — 1 мкм [25]. Общая площадь сечения всех капилляров тела достигает 6300 м^2 . В капиллярах кровь выполняет свои основные функции, такие как доставка кислорода и питательных веществ к тканям и удаление диоксида углерода и других продуктов метаболизма.

Стенки артерий и вен включают в себя три оболочки: внутреннюю (интиму), состоящую из плоских эндотелиальных клеток, среднюю (мышечную), состоящую

из гладких мышечных клеток, и наружную, состоящую из рыхлой волокнистой соединительной ткани (см. рис.1) [26]. Толщина стенок и их тканевый состав зависит от типа сосуда. К примеру, в стенках артерий, по сравнению с венами, преобладают эластические волокна, обеспечивающие эластичность и упругость сосудов, а стенки капилляров образованы всего одним слоем эндотелиальных клеток.

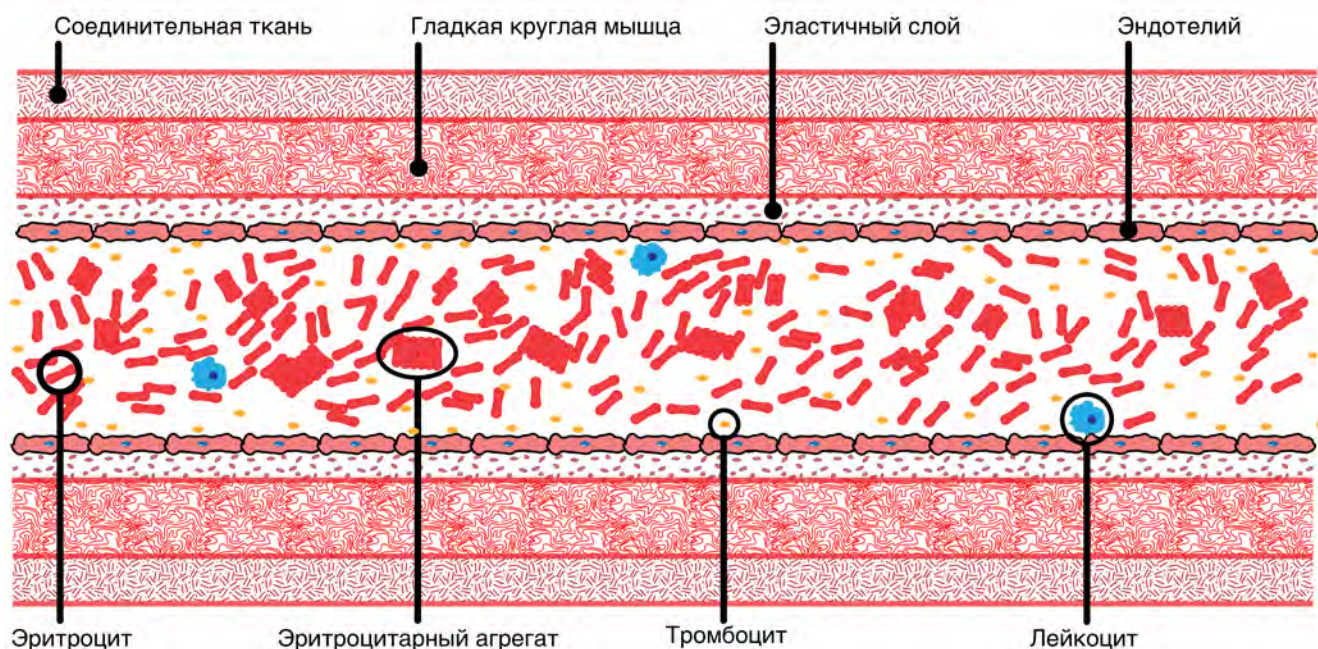


Рис. 1: Упрощенная схема строения артерии/вены.

1.1.1 Эритроциты

Эритроциты — это безъядерные красные клетки крови, основная роль которых заключается в транспорте кислорода и ряда питательных веществ к тканям и выводу продуктов метаболизма из тканей. Человеческий эритроцит здорового человека в равновесных условиях имеет форму двояковогнутого диска с диаметром порядка $7 \div 8,5$ мкм, толщиной $2,25 \div 2,75$ мкм по краям и $0,5 \div 1,1$ мкм в центральной части [27].

В костном мозге эритроциты дифференцируются из гематопоэтических стволовых клеток по пути образования эритробластов и, в конечном итоге, ретикулоцитов — крайних предшественников эритроцитов. Данные клетки являются безъядерными, однако содержат остатки митохондрий, рибонуклеиновых кислот, и других органелл. По прошествии нескольких дней в кровотоке ретикулоциты преобразуются в зрелые клетки [28]. У здорового человека после выхода из кост-

ного мозга эритроциты в процессе старения уменьшаются в размере и остаются в кровотоке порядка 115 дней [29].

Эритроцит может изменять свою форму в зависимости от осмолярности окружающего раствора (см. рис.2). Осмолярность — это концентрация растворенных частиц/веществ, способных к осмотическому взаимодействию. Когда эритроциты помещаются в раствор с разной осмолярностью, они реагируют на изменение осмотического давления, что приводит к изменению их формы. В гипертоническом растворе, где концентрация осмотически активных веществ выше, чем внутри клетки, вода выходит из эритроцитов, что приводит к их уплотнению. Напротив, в гипотоническом растворе, где концентрация частиц ниже, вода поступает в клетку, вызывая её набухание и, в конечном итоге, лизис [30].

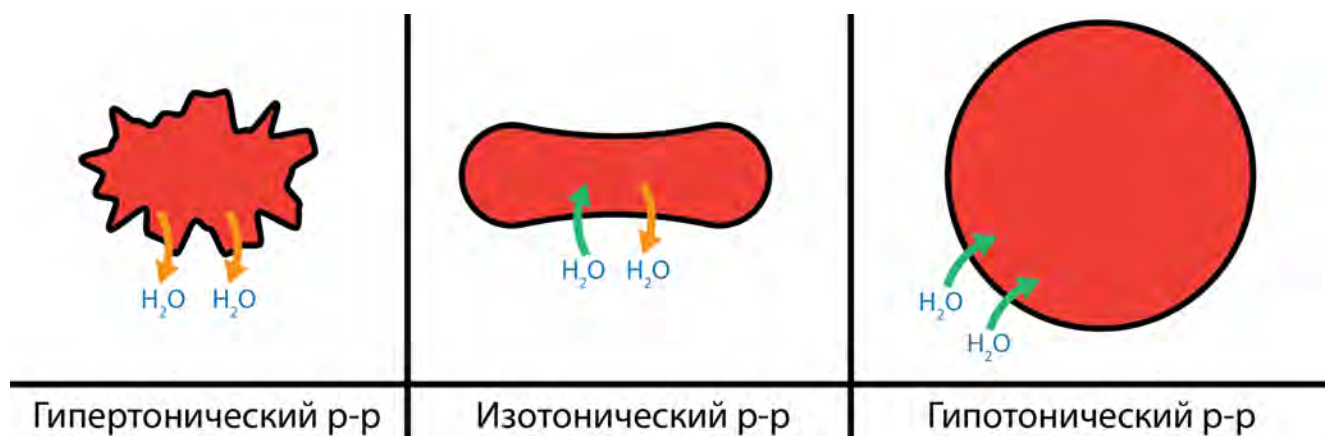


Рис. 2: Влияние растворов различной осмолярности на форму эритроцита.

Зрелый эритроцит является гомогенной безъядерной клеткой и состоит из белков и ионов, окруженных мембраной. Основным белком, входящем в состав эритроцита, является гемоглобин (95% от всех белков). Остальные белки (5%) необходимы для поддержания работы гемоглобина и производства энергии. Мембрана эритроцита представляет собой билипидный слой толщиной порядка 7 нм, который в свою очередь состоит из 50% белка, 40% липидов и 10% углеводов [31]. Распределение липидов в эритроцитарной мембране асимметрично: на её внешней стороне концентрируются сфингомиелин (26% от всех липидов) и фосфатидилхолин (28%), на внутренней — фосфатидилсерин (13%) и фосфатидилэтаноламин (27%) [32]. При физиологическом pH в здоровых эритроцитах 3 из 4 приведенных липидов являются электрически нейтральными, и только фосфатидилсерин несет отрицательный заряд. Так как он расположен на внутренней стороне мембраны, то липиды почти не вносят вклада в отрицательный заряд мембраны эритроцита.

Отрицательный заряд на поверхности эритроцитов создается в основном гликофориными, которые ответственны примерно за 60% этого заряда благодаря наличию в углеводных цепях гликокаликса большого количества остатков сиаловой кислоты [33]. На внешней стороне мембраны расположены молекулярные структуры, выполняющие роль рецепторов. Сильно упрощенная схема мембраны эритроцита приведена на рис.3.

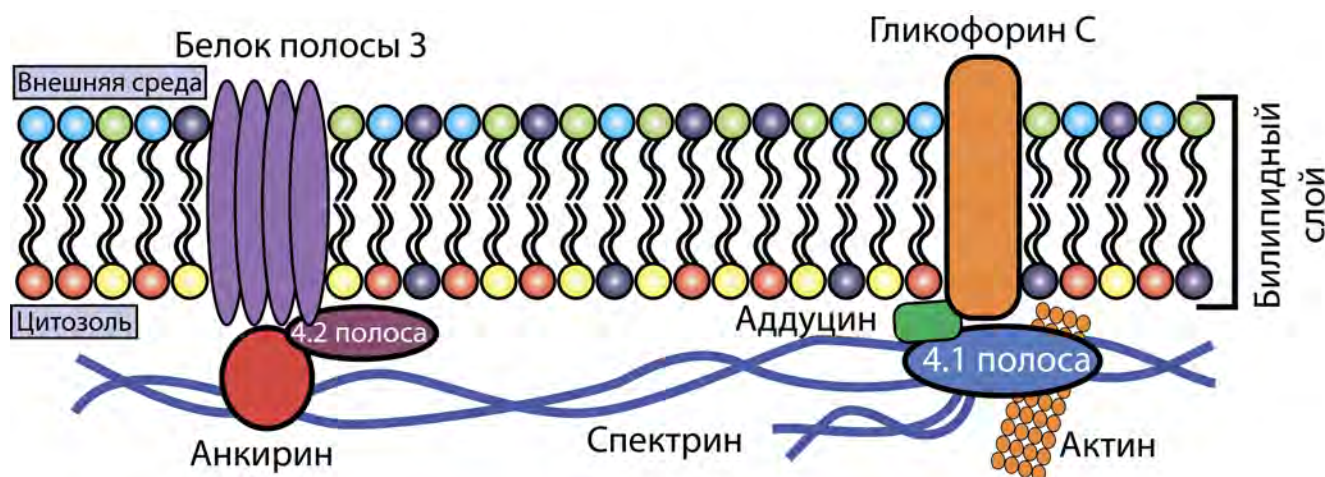


Рис. 3: Сильно упрощенная схема мембраны эритроцита. Составлено по данным из [34, 35]

1.1.2 Тромбоциты

Тромбоциты — это небольшие безъядерные клетки крови диаметром около 2-5 микрометров. Они образуются из мегакариоцитов костного мозга и являются основными компонентами системы гемостаза. Тромбоциты содержат несколько типов гранул, в которых находятся различные белки и ферменты, необходимые для их основных функций [36].

Основные структурные компоненты тромбоцитов включают гранулы (α , β и другие), содержащие факторы свертывания крови, ферменты и другие вещества; межмембранный комплекс, обеспечивающий механизм активации тромбоцитов; и цитоскелет, обеспечивающий форму и подвижность тромбоцитов [36].

Тромбоциты играют ключевую роль в процессах гемостаза и воспаления. Основные их функции включают в себя агрегацию тромбоцитов (АТ), т.е. образование тромбоцитарного тромба в месте повреждения сосуда; секрецию, т.е. выделение различных веществ, таких как факторы роста, цитокины и другие медиаторы воспаления; активацию кофакторов свертывания, т.е. участие в формировании фибринового сгустка; и регуляцию сосудистой проницаемости, т.е. влияние на

сосудистый тонус и проницаемость.

Структура тромбоцитов напрямую связана с их функциональной активностью. Например, гранулы содержат множество факторов, которые активируются при повреждении сосуда и способствуют АТ. Межмембранный комплекс играет ключевую роль в передаче сигналов, инициирующих процессы агрегации и секреции. Цитоскелет обеспечивает механическую поддержку и подвижность тромбоцитов, что важно для их участия в формировании тромба [36].

1.1.3 Микрореология крови

Кровь представляет собой жидкую соединительная ткань нашего организма, которая обеспечивает ряд жизненно необходимых процессов, таких как газообмен, гомеостаз, иммунная защита, перенос питательных веществ, гормонов и продуктов метаболизма [37]. Систематическое нарушение течения крови или изменение её параметров закономерно приводит к системному нарушению сопряженных процессов в организме. Так как живой организм и каждая его клетка представляют собой крайне неравновесные системы, постоянно требующие пополнения энергией, то нарушения свойств крови у человека могут оказывать влияние на весь организм. Поэтому реологические и микрореологические свойства крови являются важными индикаторами общего состояния организма.

Реология — это раздел науки, занимающийся исследованием течений и деформаций различных сред, обладающих пластичностью, например, жидкостей. Касательно изучения течения крови выделяют два направления, имеющих различия в масштабе и объекте изучения: реология крови (или же гемореология; макрореология крови) и микрореология крови (или же микрогемореология) [38]. Гемореология рассматривает кровь, как единое целое и анализирует её на уровне макроскопических свойств (вязкость цельной крови и плазмы, гематокрит и др.). Микрогемореология рассматривает кровь, как дисперсную систему, а именно, состоящую из отдельных клеток, и исследует течение крови в зависимости от свойств этих клеток (агрегация и деформируемость эритроцитов, АТ и др.) [39].

Реология и микрореология крови отличается только масштабом рассмотрения, и реологические свойства крови, соответственно, зависят от её микрореологических параметров. Иногда в статьях под реологическими свойствами понимаются в том числе микрореологические [40].

В следующих разделах рассмотрены ключевые свойства клеток крови, влия-

ющие на её микрореологию: способность эритроцитов к взаимодействию между собой с обратимым образованием агрегатов и обратимой деформации под действием сдвиговых напряжений, способность тромбоцитов к активации и агрегации, а также взаимодействие клеток крови с сосудистым эндотелием.

1.2 Агрегация эритроцитов

При низких напряжениях сдвига потока крови (или же при сдвиговых скоростях меньше 100 c^{-1}) эритроциты способны спонтанно и обратимо образовывать линейные и более сложные структуры — эритроцитарные агрегаты. При больших напряжениях сдвига (или же при сдвиговых скоростях в крови больше 100 c^{-1}) они разделяются на отдельные эритроциты. Процесс образования этих структур называется агрегацией эритроцитов (АЭ), а вынужденный процесс разделения агрегатов на отдельные клетки — дезагрегацией эритроцитов. Данные процессы существенным образом влияют на вязкость и микроциркуляцию крови в организме [4].

Эритроциты способны агрегировать только в растворе определенного рода макромолекул/комбинации макромолекул. К примеру, в натрий-фосфатной буфере процесс АЭ не наблюдается, так же как и в том же буфере при добавлении к нему фибриногена или альбумина. На рис.4 представлена микрофотография линейных и более сложных агрегатов, образующихся в среде аутологичной плазмы крови (это собственная плазма человека, полученная в результате центрифугирования цельной крови) в статичной кювете.

Следует различать АЭ и процесс агглютинации эритроцитов, которые существенно образом отличаются по механизмам возникновения и функциям. Агглютинации эритроцитов — это необратимое склеивание эритроцитов в результате иммунологических реакций, возникновение которых происходит благодаря специфическим взаимодействием между антителами и антигенами, расположенными на поверхности эритроцитов. Обычно агглютинация бывает вызвана попаданием в организм чужеродных антигенов, к примеру, при переливании несовместимой крови, при холодовой агглютининовой болезни, при заражении рядом вирусов и бактерий [41]. Крупные агрегаты, образовавшиеся при агглютинации способны закупорить кровеносные сосуды, сильно повышая риск тромбоза и других патологических изменений.

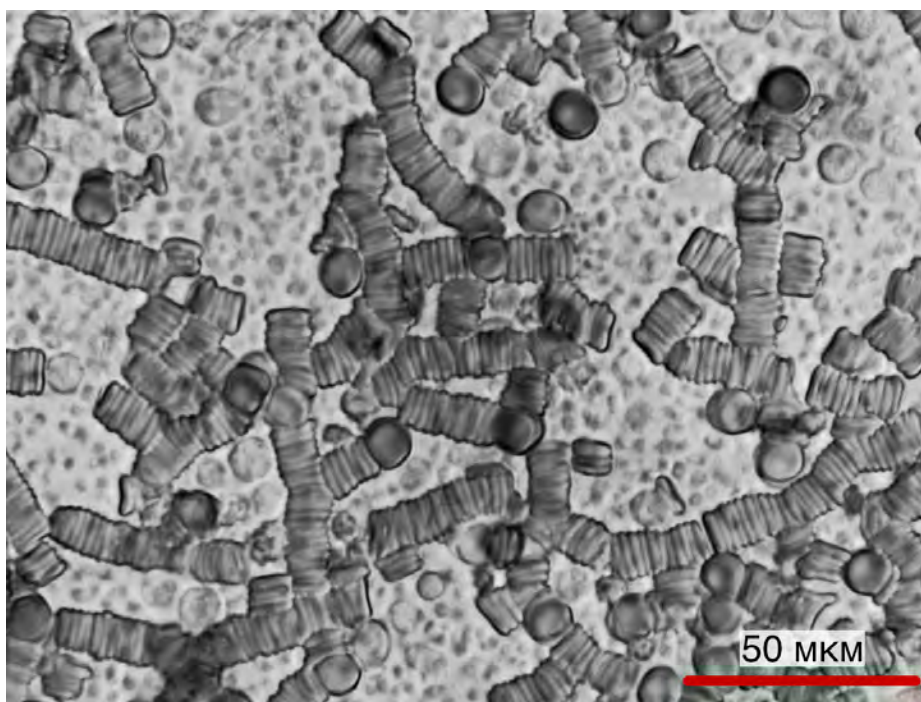


Рис. 4: Микрофотография эритроцитарных агрегатов в статичной кювете в аутологичной плазме крови *in vitro*. Маленькие точки в местах между агрегатами — тромбоциты. Гематокрит 10%.

1.2.1 Физиологическая роль агрегации эритроцитов

АЭ существенным образом влияет на вязкость крови и на реологию крови как в больших, так и в малых сосудах и капиллярах. Благодаря АЭ кровь является неньютоновской жидкостью, вязкость которой увеличивается с уменьшением сдвиговых напряжений. Тем самым, АЭ обеспечивает кратковременные изменения гемореологических свойств крови, что способствует снижению гемодинамического сопротивления, и, как следствие, улучшению перфузии тканей организма [42]. Другими словами, АЭ позволяет снизить энергетические потери при прохождении крови через сосуды, однако при повышенной АЭ данные потери возрастают. Поэтому в физиологических условиях АЭ поддерживается в оптимальном диапазоне [4]. В литературе выделяют ряд процессов, на которые влияет и/или взаимовлияет АЭ. Рассмотрим основные из них:

- **Осевая миграция эритроцитов в больших сосудах.** Данный эффект способствует образованию слоя плазмы без эритроцитов вблизи стенок сосуда (т.е. маргинального слоя), что способствует уменьшению гидродинамического сопротивления потоку [43]. Также увеличение концентрации эритроцитов вблизи центра сосуда вытесняет тромбоциты и лейкоциты на периферию к стенкам, что влияет как и на поток, так и на функции самих клеток [44].

- **Регулировка микрососудистого гематокрита.** Гематокрит не является постоянной величиной в кровеносной системе и существует значительная разница между гематокритом в крупных и малых кровеносных сосудах. В среднем за счет АЭ значения микрососудистого гематокрита на 20% ниже, чем в более крупных сосудах [45]. Таким образом, АЭ способствует появлению различия гематокрита в больших и малых сосудах, что способствует уменьшению сопротивления потоку крови и понижает пропускную способность кислорода [4]. Два вышестоящих следствия можно объединить в концепцию *оптимального гематокрита*, при котором достигаются наименьшие энергетические потери [46].
- **Влияние АЭ на функцию эндотелия.** Эндотелий играет важную роль в регуляции гладких мышц сосудов. Было показано, что сдвиговое напряжение потока крови вблизи стенки сосуда, зависящие от АЭ, оказывает существенное влияние на морфологию и функции эндотелиальных клеток, включая синтез и секрецию в них разных биомолекул (например, оксида азота), влияющих на регуляцию сосудистых функций [47]. Повышенная АЭ приводит к подавлению синтеза оксида азота в эндотелии [4], и в тоже время оксид азота уменьшает АЭ [48] — тем самым данные процессы взаимовлияют друг на друга.

1.2.2 Агрегация и агрегационная способность эритроцитов

В литературе часто выделяют два похожих термина: *агрегация эритроцитов* и *агрегационная способность эритроцитов* [4]. АЭ является свойством как клеток, так и среды, в которой они агрегируют и является более общим термином. Агрегационная способность эритроцитов характеризует присущее эритроцитам свойство агрегировать и является свойством самих клеток без учета внешних факторов. Как было сказано выше, без наличия в окружающей среде определенных макромолекул АЭ невозможна, и поэтому для того, чтобы выделить преимущественно факторы клетки, которые влияют на АЭ, эритроциты добавляют в эталонный раствор макромолекул.

Чаще всего АЭ измеряется в аутологичной плазме, тогда как агрегационная способность эритроцитов — в определенном растворе с заданной концентрацией макромолекул, например, в декстрани с молекулярной массой 70 или 500 кДа [4].

1.2.3 Макромолекулярные факторы агрегации эритроцитов

Эритроциты могут агрегировать только в среде с содержанием макромолекул определенных свойств. Плазма крови является одной из таких сред: в основном она состоит из воды, в которой растворены белки (7 ~ 8% от общей массы), а также органические и минеральные соединения. Основным белком в плазме крови, который усиливает АЭ, является фибриноген [49], однако при его отсутствии в плазме крови (т.е. в сыворотке) АЭ, хоть и пониженная, но наблюдается. Во многих работах было показано, что от концентрации фибриногена существенно зависят агрегационные параметры эритроцитов, в то же время как в растворе, где содержится только фибриноген и/или/без альбумин, АЭ не наблюдается [50]. Также АЭ зависит от других белков плазмы: альбумина, иммуноглобулинов, гаптоглобина и др. [4, 50]. Интересно, что альбумин при одних концентрациях фибриногена выступает индуктором агрегации, а при других — ингибитором [51, 52]. В табл.1 приведена роль основных белков плазмы крови в АЭ.

Известно, что синтетические макромолекулы с большой молекулярной массой (такие как декстраны и другие) при их добавлении к суспензии эритроцитов изменяют АЭ и вязкость крови [4]. Растворы декстранов разных молекулярных масс используются в клинической медицине с целью контроля вязкости крови, а также при большой потере крови для восстановления кровотока. Важно отметить, что как белки, так и синтетические молекулы могут выступать ингибиторами или индукторами АЭ. В статье [53] показано, что при гидродинамическом радиусе макромолекул > 4 нм они выступают в качестве индукторов АЭ, а при радиусе < 4 нм — ингибиторов.

Таблица 1: Роль различных белков плазмы крови в АЭ. Стрелки вверх и вниз обозначают повышение и понижение АЭ соответственно. Переработано из [4].

Белок плазмы	Молекулярная масса, кДа	Концентрация в плазме, мг/мл	Эффект на АЭ
Фибриноген	340	1,5-3,0	↑
Иммуноглобулины G	150	8	↑, нет эффекта
Иммуноглобулины M	900	1,5	↑
C-реактивный белок	25	<0,01	↑
Трансферрин	80	2,0–3,6	нет эффекта
Гаптоглобин	38	0,5–2,5	↑, нет эффекта
Церулоплазмин	151	0,2–0,4	нет эффекта
Альфа-1–кислый гликопротеин	40	0,5–1,0	↑, нет эффекта
Альбумин	66	20–50	↑, ↓, нет эффекта

1.2.4 Клеточные факторы в агрегации эритроцитов

Помимо факторов среды на эритроциты оказывают влияние факторы, связанные с самой клеткой: с их мембраной и внутренним содержимым. Поверхность эритроцита обладает суммарным отрицательным электрическим зарядом, обусловленным, главным образом, гликокаликсом, состоящим из углеводных цепей, присоединенных к трансмембранным белкам и обращенным в межклеточное пространство, а также, в меньшей степени, белками. Если обработать эритроциты нейраминидазой, которая удаляет сialовые кислоты с клеточной мембраны и снижает дзета-потенциал, то это приводит к усилению АЭ [54].

АЭ также зависит от формы клеток и их деформируемости [4]. Деформируемость эритроцитов — это их способность к обратимой деформации в потоке крови, которая позволяет эритроцитам проходить в сосудах, радиус которых меньше их характерных размеров. В процессе деформации эритроциты могут сильно изменять свою форму, вытягиваясь под действием продольных сдвиговых напряжений [12]. Более подробно деформируемость эритроцитов обсуждается в разделе *Деформируемость эритроцитов*.

К одному из важных клеточных факторов, влияющим на АЭ, относится их возраст. Во время старения эритроциты претерпевают ряд постепенных изменений: сокращается поверхность мембраны эритроцита, увеличивается плотность внутреннего содержимого, ухудшается деформируемость [55]. Влияние возраста эритроцитов на их агрегацию не до конца изучено. Методом микроскопии было показано, что агрегация старых клеток более выражена, чем молодых [56]. Автором диссертации в статье [57] с помощью лазерного пинцета было показано, что АЭ увеличивается при старении эритроцитов.

1.2.5 Модели механизмов агрегации эритроцитов

На данный момент нет однозначного понимания механизма(ов) АЭ. Важно заметить, что между фибриногеном (и др. белками плазмы) и синтетическими макромолекулами (декстраном и др.) есть одно большое отличие, проявляющиеся в АЭ: с увеличением концентрации фибриногена АЭ монотонно увеличивается, тогда как для синтетических макромолекул характерна «куполообразная» зависимость при увеличении их концентрации [58]. Взаимодействие эритроцитов при их агрегации обычно описывается двумя моделями: модель «обедненного слоя»

и модель «мостиков». Во многих случаях воздействие макромолекул на АЭ можно объяснить в рамках обеих моделей. К примеру, двумя моделями объясняется «куполообразная» зависимость сил АЭ от концентрации декстрана с разными молекулярными массами [4]. На данный момент существуют аргументы в пользу обеих моделей, однако для окончательного решения вопроса о правильности модельных представлений требуются дополнительные исследования.

Модель «обедненного слоя»

В модели «обедненного слоя» предполагается, что между двумя эритроцитами, находящимися на близком расстоянии друг к другу, действуют осмотические силы со стороны макромолекул, что служит причиной притяжения между двумя клетками. Концепция осмотических сил была предложена в работе двух японских физиков Sho Asakura и Fumio Oosawa [59]. Предложенная ими модель используется для описания сил, действующих между телами макроскопических размеров, находящимися в растворе, содержащем полимеры и/или макромолекулы. Рассмотрим один из случаев, которые рассматривали авторы в оригинальной статье: проанализируем поведение двух больших твердых сфер диаметром $D = 2R_0$ в растворе из маленьких жестких сфер диаметром $d = 2R_m$.

Вокруг больших сфер есть область, недоступная для нахождения центров маленьких сфер ввиду их размеров. Объем этой области равен $V = \pi(D + d)^3/6$. Когда большие сферы приближаются достаточно близко, так что расстояние между их центрами становится $h < (D + d)/2$, рассматриваемые области больших сфер пересекаются, и исключенный объем, недоступный для малых сфер, уменьшается на величину объема перекрытия, как показано на рис.5 [60].

Тем самым объем пересечения «исключенных объемов» будет равен:

$$V_{\cap} = \frac{2\pi L^2}{3} \left[\frac{3(D * d)}{2} - L \right]. \quad (1.1)$$

Как следствие, маленькие сферы не могут проникнуть в исключенный объем между большими сферами, и появляется осмотическая сила, которая стремится увеличить объем перекрытия больших сфер.

Согласно изложенной модели, вблизи эритроцитов образуется слой с низким содержанием белков и/или макромолекул, и, если «обедненные слои» двух эритроцитов перекрываются, и возникающая сила больше по величине суммы сил,

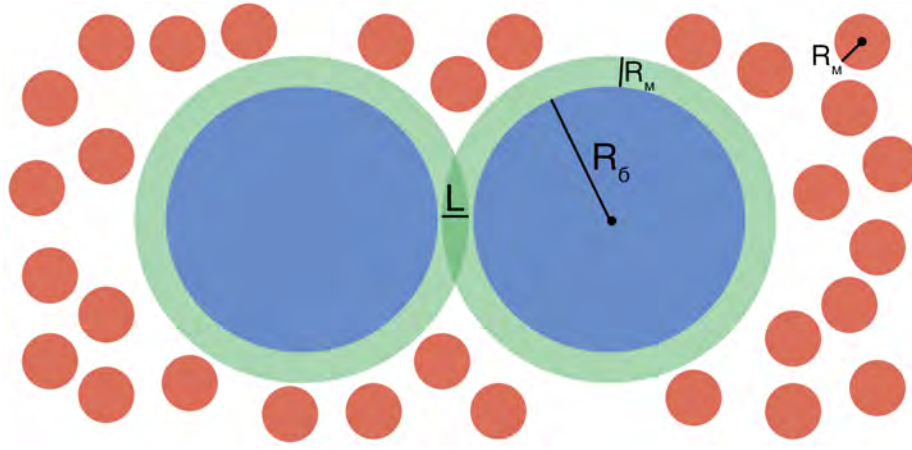


Рис. 5: Иллюстрация исключенных и перекрывающихся объемов двух сферических частиц в растворе малых твердых сфер. Перерисовано из [60].

препятствующих АЭ, то эритроциты начинают агрегировать. В литературе модель «обедненного слоя» чаще всего описывается в терминах энергии взаимодействия, суммарная величина которой равна [4]:

$$\omega_{\Sigma} = \omega_{\text{обедн.слоя}} + \omega_{\text{отт.}}, \quad (1.2)$$

где $\omega_{\text{обедн.слоя}}$ – энергия взаимодействия эритроцитов, приводящая к их агрегации, $\omega_{\text{отт.}}$ – энергия электростатического отталкивания. $\omega_{\text{обедн.слоя}}$ рассчитывается по следующей формуле:

$$\omega_{\text{обедн.слоя}} = -2\Pi\left(\Delta - \frac{d}{2} + \delta - p\right), \quad (1.3)$$

где Π – осмотическое давление макромолекул с заданной концентрацией, Δ – толщина «обедненного слоя» (зависит в том числе от Π), d – расстояние между эритроцитами, p – глубина проникновения макромолекул в гликокаликс. Осмотическое давление рассчитывается по уравнению Галлера [4]:

$$\Pi = \frac{RT}{M}c + \beta c^2 = -\frac{\mu_1 - \mu_1^0}{\nu_1}, \quad (1.4)$$

где c – концентрация макромолекул, T – абсолютная температура, R – газовая постоянная, β – коэффициент, учитывающий гибкость и формулу макромолекулы в растворе, μ_1 – химический потенциал растворителя в растворе макромолекул, μ_1^0 – химический потенциал чистого растворителя, ν_1 – молярный объем растворителя. Заметим, что осмотическое давление в уравнении 1.4 явным образом зависит от

температуры. В первом приближении с её ростом эритроциты по модели «обедненного слоя» будут взаимодействовать с большими силами.

При рассмотрении деформируемых объектов, часть положений об осмотических силах меняется, и уравнения усложняются. Так, рассматривая деформируемые сферы и принимая во внимание свободную энергию их поверхности, а также осмотические силы со стороны макромолекул, Brian Vincent и соавторы [61] определили толщину обедненного слоя следующим образом:

$$\Delta = \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{\Pi}{\mathcal{D}}\right) + 4\Delta_0^2} - \frac{1}{2} \frac{\Pi}{\mathcal{D}}, \quad (1.5)$$

где Δ_0 – это толщина обедненного слоя при концентрации микромолекул, стремящимся к нулю, Π – осмотическое давление, как и в уравнении 1.4, а $\mathcal{D}$ – параметр, зависящий от объемной концентрации полимера:

$$\mathcal{D} = \frac{2k_B T}{\Delta_0^2} \left(\frac{c_2^b N_a}{M_2} \right)^{\frac{3}{2}}, \quad (1.6)$$

где M_2 – молекулярная масса макромолекул в растворителе, c_2^b объемная концентрация полимера, k_B – постоянная Больцмана, N_a – постоянная Авогадро.

Для более точной модели эритроциты рассматривают, как гибкие объекты со сложной структурой, так как гликокаликс эритроцитов состоит из полисахаридов, и окружающие макромолекулы могут взаимодействовать с ним. Тот факт, что макромолекулы могут проникать через гликокаликс или адсорбироваться на нем, играет важную роль в объяснении «колоколообразной» формы зависимости энергии взаимодействия эритроцитов (или же АЭ) при увеличении концентрации макромолекул. Очевидно, что глубина проникновения макромолекул должна зависеть от их типа, конформации, размеров и объемной концентрации. В общем случае глубина проникновения, и следовательно, обедненный слой будет больше для небольших молекул. Про расчет осмотических сил для эритроцитов подробнее см. в статье [62].

При моделировании АЭ с помощью модели «обедненного слоя» чаще всего пользуются упрощенным подходом, предложенным авторами в статье [63]: сила взаимодействия между двумя эритроцитами, как и в уравнении 1.2, складывается из сил притяжения и электростатического отталкивания:

$$\Phi_r = D_e [e^{2\beta(r_0-r)} - 2e^{2\beta(r_0-r)}], \quad (1.7)$$

$$f(r) = -\frac{\partial \Phi}{\partial r} = 2\beta D_e [2e^{2\beta(r_0-r)} - e^{2\beta(r_0-r)}], \quad (1.8)$$

где r_0 означают длину, при которой сила взаимодействия исчезает, D_e – поверхностную энергию, а β – масштабный коэффициент. Данный подход сильно упрощает построение модели АЭ, поскольку в данном случае АЭ зависит всего от 3-х параметров. Более подробно про построение данной модели АЭ с учетом ДЭ подробнее см. в диссертации [64], также в ней дополнительно представлен исходный код на языке программирования *Си*.

Автором диссертации была разработана 2D модель агрегации эритроцитов в форме жестких дисков без электростатического отталкивания. Макромолекулы в предложенном подходе находятся в состоянии броуновского движения, и осмотическая сила вычисляется напрямую. Программный код модели доступен в открытом репозитории GitHub [65]. В *Приложении 1. Валидация 2D модели агрегации жестких клеток* представлены некоторые результаты, полученные с помощью данной модели.

Модель «мостиков»

Модель «мостиков» предполагает, что на мембране эритроцита специфически или неспецифически адсорбируются макромолекулы, которые при близком контакте двух эритроцитов взаимодействуют друг с другом, образуя «мостики», что является причиной силы притяжения между эритроцитами [66]. Т.е., согласно данной модели, АЭ происходит тогда, когда силы со стороны «мостиков» превосходят силы, препятствующие агрегации: силы электромагнитного отталкивания, силы со стороны сдвигового потока и др.

Существенным аргументом в пользу данной модели является корреляция межклеточного расстояния с гидродинамическим радиусом изучаемых макромолекул, что может указывать на то, что макромолекулы расположены между клетками и межклеточный промежуток будет больше для их более высоких молекулярных масс [54]. Также в работе [66] было показано, что АЭ в плазме определено обусловлена в некоторой степени механизмом образования мостиков. В одной из первых статей по рассматриваемой модели показано, что сила взаимодействия

эритроцитов складывается из следующих сил [67]:

$$F_{\text{агр.}} = F_{\text{мост.}} - F_{\text{отт.}} - F_{\text{сдв.напр.}} - F_{\text{эласт.}}, \quad (1.9)$$

где $F_{\text{агр.}}$ – сила агрегации, $F_{\text{мост.}}$ – сила, действующая со стороны «мостиков», $F_{\text{отт.}}$ – сила электростатического отталкивания, $F_{\text{сдв.напр.}}$ – сила, действующая со стороны потока жидкости (напряжения сдвига), $F_{\text{эласт.}}$ – сила, действующая со стороны эластичной мембраны. Сила электростатического отталкивания обусловлена отрицательным зарядом мембраны эритроцита [4]. Считается, что $F_{\text{эласт.}}$, вероятно, мала в нормальных эритроцитах из-за низкого модуля упругости, однако при снижении деформируемости эритроцитов $F_{\text{эласт.}}$ увеличивается, что приводит к снижению АЭ.

Существуют разные вариации модели «мостиков», которые можно разделить на два больших класса, один из которых предполагает равномерное образование «мостиков» на мембране эритроцита (неспецифическое связывание), а другой основывается на том, что макромолекулы связываются с определенными белками на мембране эритроцита (специфическое связывание). Довольно часто в литературе [4] сила со стороны одного мостика рассматривается на примере растянутой пружины:

$$F_{\text{агр.}} = k_{\text{мост.}}(l - l_0)n_{\text{св.}}\frac{x}{l}, \quad (1.10)$$

где $k_{\text{мост.}}$ – коэффициент жесткости мостика, $l - l_0$ – разница длины растянутой и нерастянутой макромолекулы, $n_{\text{св.}}$ – плотность связи, x – расстояние между клетками.

Обобщенная модель агрегации эритроцитов

На первый взгляд две рассматриваемые модели противоречат друг другу: модель «мостиков» предполагает, что макромолекулы адсорбируются на мембранах эритроцитов, тогда как в модели «обедненного слоя» предполагается, что между эритроцитами образуется слой без макромолекул (см. рис.6). Модель «обедненного слоя» определенно справедлива, так как приведенный механизм взаимодействия макрочастиц в коллоидной среде не подвергается сомнению. В тоже время в ряде публикаций было показано, что ряд макромолекул, таких как фибриноген и декстран, определенно адсорбируются на мембране эритроцита [34, 68, 69]. Адсорбция макромолекул в то же время может быть как специфической, так и

неспецифической. Поэтому следует ожидать, что обе модели имеют справедливы, но в зависимости от клеточных и внешних факторов изменяется вклад той или иной модели в АЭ (см. рис.6в). Обобщенная модель позволила бы объяснить расхождения между экспериментом и теорией, однако на момент написания данной работы сведения о её построении и использовании в статьях и диссертациях скудны. Причина этого кроется в сложности данной модели и в том, что многие аспекты «мостиков» и «обедненного слоя» остаются не до конца изученными.

Более подробно про обобщенную модель АЭ с учетом рассмотрения литературы подробнее см. в разделе «*Bridletion*» в диссертации [70].

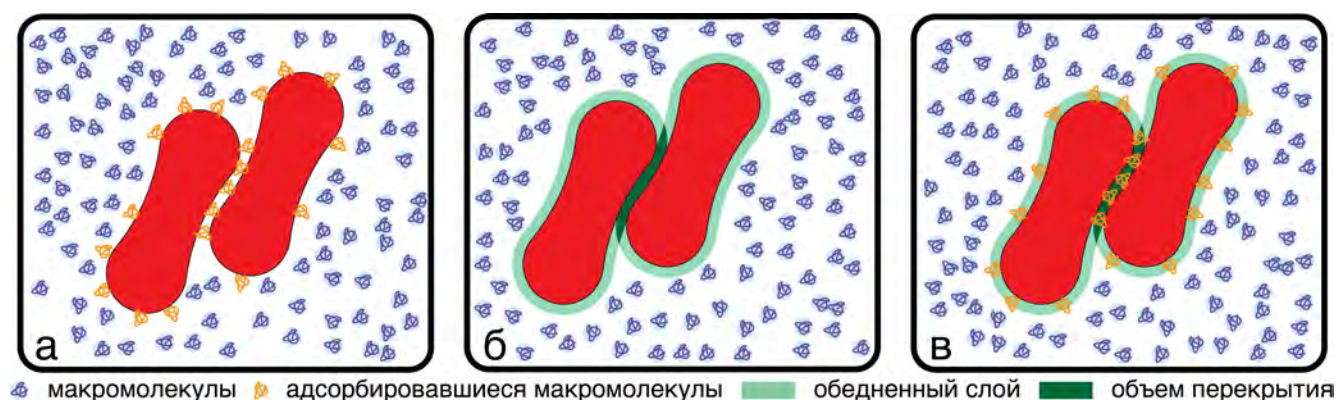


Рис. 6: Модели агрегации эритроцитов: (а) модель «мостиков», (б) модель «обедненного слоя» и (в) обобщенная модель АЭ.

1.2.6 Агрегация эритроцитов при социально-значимых заболеваниях

АЭ изменяется при ряде болезней и патологий. Изменения АЭ выявлены при инфекционных заболеваниях (сепсис и др.), при сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ) (артериальная гипертензия (АГ), атеросклероз, инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца (ИБС), фибрилляция предсердий (ФП) и др.), при метаболических нарушениях (сахарный диабет 2-го типа (СД2Т), ожирение, и др.) и других заболеваниях [4].

ССЗ являются ведущей причиной смертности во всем мире. Из 20.5 миллионов смертей, связанных с ССЗ, в 2021 году примерно 80% произошли в странах с низким и средним уровнем дохода [71]. К данным заболеваниям в первую очередь относятся ИБС, инфаркт, АГ, и др.; а к основным факторам риска относится СД2Т, ожирение, повышенное кровяное давление и др. [71].

ИБС представляет собой органическое и функциональное повреждение сер-

дечной мышцы. Главной причиной этого заболевания является атеросклероз коронарных артерий, который проявляется сужением или полным блокированием просвета сосуда из-за образования бляшек. Кроме того, ИБС может развиваться на фоне тромбоэмболии или спазма коронарных артерий [72]. Методом лазерной агрегометрии было показано, что АЭ при ИБС повышена по сравнению со здоровыми донорами [16].

ФП характеризуется нарушением сердечного ритма, вызванного чрезвычайно быстрым и нерегулярным сокращением предсердий. При ФП наблюдается повышенный риск образования тромба в придатке левого предсердия, который затем может попасть в мозг и вызвать инсульт. ФП повышает риск инсульта в пять раз и является причиной 15-20% всех случаев инсультов [73]. Инсульты, возникающие у пациентов с ФП, как правило, более тяжелые, что приводит к более высокой смертности [74]. В статье [75] была показана линейная зависимость между концентрацией фибриногена и степенью осложнения ФП.

При СД2Т наблюдается повышение вязкости цельной крови, что по большей мере обусловлено повышением АЭ, снижением ДЭ и повышением адгезии эритроцитов к эндотелиальным клеткам [76]. Кроме того, при СД2Т наблюдаются микрореологические нарушения лейкоцитов и тромбоцитов, которые сопутствуют изменениям АЭ и ДЭ, а также могут им предшествовать [77].

АГ сопровождается повышенным кровяным давлением и является одной из наиболее частых причин острой сердечной недостаточности, инсульта и других ССЗ. Обычно выделяет 3 степени АГ, характеризующиеся значением систолического и/или диастолического давления [78]. В статье [79] показано, что систолическое артериальное давление у пациентов с АД положительно коррелирует с АЭ ($r = 0,391; p < 0,05$) и что АЭ у пациентов повышена по сравнению со здоровыми донорами.

Автор диссертации советует прочитать раздел 6.13 в книге Бориса Ильича Кузника, где представлен важный обзор о молекулярных аспектах АЭ, в том числе при различных патологиях [21].

1.3 Деформируемость эритроцитов

1.3.1 Физиологическая роль деформируемости эритроцитов

Способность эритроцитов к обратимой деформации необходима эритроцитам для выполнения своей основной функции: доставки кислорода к органам и тканям. Средний размер эритроцита (7,5–8 мкм) почти в два раза превышает размер мельчайших капилляров (их диаметры распределены в пределах 3-12 мкм [80]). Это означает, что при прохождении через капилляры эритроциты вынуждены деформироваться под действием сдвигового напряжения. Деформируемость эритроцитов (ДЭ) зависит от формы клетки (соотношение поверхности и объема), механических свойств мембраны и цитоскелета, а также внутриклеточной вязкости, которая связана с концентрацией гемоглобина [81].

Эритроциты чувствительны к изменениям сдвиговых напряжений. В частности, они деформируются и отдают кислород в терминальных капиллярах, которые снабжают кислородом прилежащие ткани. При изменении формы эритроцитов и потере кислорода гемоглобином высвобождаются вещества, такие как аденозинтрифосфат и оксид азота, которые позволяют регулировать тонус капилляров. Этот вид сигнализации между клетками обеспечивает плавный и адаптивный поток эритроцитов, когда это необходимо, тем самым оптимизируя доставку кислорода и удаление углекислого газа из тканей [12].

1.3.2 Механизмы деформируемости эритроцитов

Механизмы ДЭ основаны на активации молекулярных сигнальных каскадов внутри эритроцита [34]. Данные каскады могут быть запущены различными сигнальными молекулами, среди которых можно выделить газотрансмиттеры [48], эпинифрин [34] и др. В статье [82] с помощью метода масс-спектрометрии было выявлено 752 мембранных белка, и все они были исследованы на предмет корреляции с ДЭ. Четырнадцать мембранных белков показали сильную положительную корреляцию ($r > 0,65$) с деформируемостью клеток: чем выше концентрация белка, тем выше ДЭ. В частности, это такие мембранные белки, как *Stomatin*, *Band-3*, *Protein band 4.1* и др. (см. рис.3). Также в данной статье было показано, что, зная содержание одного из четырнадцати выявленных мембранных белков, можно довольно точно предсказать значение ДЭ.

1.3.3 Деформируемость эритроцитов при социально-важных заболеваниях

Установлено, что снижение ДЭ наблюдается у большинства пациентов с ССЗ [83]. ДЭ снижена у пациентов с ишемической болезнью сердца, и её количественная оценка показывает риск возможных осложнений [84]. Также было показано, что ДЭ статистически значимо падает при сахарном диабете 2-го типа (СД2Т) [85]. Существует ряд доказательств, что нарушение перфузии тканей, наблюдаемое при СД2Т, в первую очередь связано с нарушением ДЭ [86]. Гликозилирование мембранных и внутриклеточных белков, связанное с гипергликемией, значительно снижает деформационные свойства мембран и вязкоупругие свойства всего эритроцита при СД2Т [87]. Дополнительно, повышение внутриклеточной концентрации глюкозы приводит к увеличению гликозилированного гемоглобина, что влечет за собой снижение ДЭ [88]. Окислительный стресс при СД2Т приводит к повреждению мембранных белков эритроцитов даже при относительно коротком времени воздействия. Увеличение соотношения холестерин/фосфолипиды в мембранах эритроцитах у больных СД2Т также приводит к снижению их деформируемости [89]. Также ДЭ понижается при табакокурении [90].

1.4 Агрегация тромбоцитов

1.4.1 Физиологическая роль агрегации тромбоцитов

Агрегация тромбоцитов (АТ) представляет собой ключевой физиологический процесс, играющий решающую роль в поддержании целостности сосудистой системы и предотвращении кровотечений. Этот процесс включает в себя образование тромбоцитарных агрегатов в ответ на повреждение сосудистой стенки, что является первым этапом тромбообразования. Физиологическая роль АТ заключается не только в предотвращении кровотечений, но и в поддержании гемостаза и восстанавливающих процессов в сосудистой системе. Агрегаты тромбоцитов обеспечивают механическую барьерную функцию, препятствуя дальнейшему выходу крови из сосуда. Кроме того, активированные тромбоциты высвобождают факторы роста и цитокины, которые способствуют миграции и пролиферации эндотелиальных и гладкомышечных клеток, а также фибробластов, что важно для восстановления структурной и функциональной целостности сосудистой стенки.

1.4.2 Основные механизмы агрегации тромбоцитов

Молекулярной основой АТ является переход поверхностного тромбоцитарного $\alpha_{IIb}\beta_3$ интегрина из конформационного состояния с низким сродством к фибриногену в состояние с высоким. Поскольку фибриноген является биполярной молекулой, он может связываться одновременно с двумя комплексами интегринов. Именно это позволяет активированным тромбоцитам «связывается» друг с другом (агрегировать).

Однако существуют и другие молекулярные механизмы, которые могут вызывать АТ [91]. Например, добавление ристоцетина к плазме с тромбоцитами вызывает АТ и используется для оценки фактора Виллебранда. В отличие от $\alpha_{IIb}\beta_3$ -опосредованной агрегации, этот процесс не зависит от метаболически активных внутриклеточных процессов, а является результатом связывания фактора Виллебранда с гликопротеином *Ib* на поверхности тромбоцитов, что приводит к АТ.

1.4.3 Агрегация тромбоцитов при социально-важных заболеваниях

При большинстве сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ) АТ увеличивается [92]. В последнее время параметры, характеризующие АТ, становятся одними из основных маркеров ССЗ [93]. Изменения в АТ могут происходить за счет усиления проагрегационных стимулов, так и за счет снижения концентрации антиагрегационных веществ, что создает предпосылки для повышенной активации и АТ.

К примеру, с помощью метода лазерной турбидиметрии, используя разные индукторы АТ (такие как аденозиндифосфат (АДФ), коллаген, адреналин, арахидоновая кислота и ристоцетин) и анализируя полученные агрегатограммы, можно детектировать различные нарушения в процессе тромбообразования [94, 95]. В частности, с помощью данного метода и АДФ показано, что у пациентов с ишемическим инсультом, а также осложненным СД2Т наблюдалась повышенная АТ относительно здоровых доноров [96].

Также изменения в АТ наблюдаются при хронических миелопролиферативных заболеваниях (ХМПЗ) [97]. ХМПЗ — это группа онкопатологий крови, характеризующаяся патологическим делением одного или нескольких видов клеток крови. Гемостатические осложнения, такие как сосудистые тромбозы и кровоизлияния, значительно сокращают продолжительность жизни пациентов с ХМПЗ [98]. У

этих пациентов обычно возникают артериальные или венозные тромбозы, причем первые ответственны за 60-70% событий, связанных с миелопролиферативными новообразованиями [99]. К этому типу тромбозов относятся ишемический инсульт, острый инфаркт миокарда и окклюзия периферических артерий [99]. В многочисленных исследованиях изучались АЭ [100—102] и кардиологические осложнения, связанные с ХМПЗ [103].

1.5 Эндотелий и его влияние на кровоток

1.5.1 Взаимодействие эндотелия и клеток крови

Эндотелий — это слой клеток, выстилающих внутреннюю поверхность кровеносных артерий, вен и капилляров. Эндотелиальные клетки не только образуют полупроницаемый слой между кровью и тканями, но и играют важную роль в гомеостазе и контроле сосудистого кровотока [104—106]. Различные факторы, приводящие к развитию воспалительного процесса и других патологических состояний, изменяют антикоагулянтное состояние эндотелия в прокоагулянтное [107]. Поскольку эндотелиальные клетки непосредственно взаимодействуют с клетками крови, они могут также влиять на микрореологические свойства, такие как АЭ и ДЭ [108]. В частности, эндотелиальные клетки могут быть источником ряда сигнальных молекул для клеток крови, в основном, оксида азота [109].

В обзоре [9] приведено современное представление о взаимодействии эндотелия и клеток крови. В частности, показаны молекулярные аспекты взаимодействия при наличии таких патологий, как серповидно-клеточная анемия, истинная полицитемия, центральная окклюзия вен сетчатки и сахарный диабет 2-го типа.

1.5.2 Адгезия эритроцитов к эндотелию в норме и патологии

В физиологических условиях адгезия эритроцитов к сосудистому эндотелию довольно низка, однако при ряде патологических состояний адгезия эритроцитов к сосудистому эндотелию может быть ведущим фактором снижения перфузии и ишемии тканей [110]. Например, в статье [111] было показано, что адгезия эритроцитов здоровых доноров к монослою эндотелия значительно ниже по сравнению с эритроцитами пациентов, больных серповидно-клеточной анемией.

В физиологических условиях взаимодействие одиночных эритроцитов и эндотелия изучалось в работе N. Mohandas [112]. Измерения проводились с помощью

метода аспирации микропипеткой, и силы взаимодействия составили около 22 пН. В то же время силы адгезии эритроцитов из крови пациентов с серповидно-клеточной анемией к эндотелию составили 31 пН.

1.6 Современные оптические методы измерения микрореологических параметров крови

1.6.1 Оптические свойства крови

Обозначим основные оптические свойства эритроцитов: показатель преломления эритроцита относительно плазмы крови в окне прозрачности эритроцита ($\lambda = 0,6 \div 1$ мкм) является комплексной величиной $m = n + i\chi$, где $n \approx 1,05$, $\chi \approx 10^{-4}$ [113]. Действительная часть показателя близка к единице, что делает эритроцит оптически «мягкой» частицей и дает возможность использовать множество численных методов расчета, основанных на рассеянии излучения «мягкими» частицами [114]. К данным методам можно отнести такие методы, как теория Ми, приближение Рэлея-Ганса-Дебая [115], приближение аномальной дифракции [27], приближение геометрической оптики [116], лучеволновое приближение [117], дискретно-дипольное приближение [118], метод конечных разностей во временной области [119] и другие [114].

1.6.2 Лазерная агрегометрия

Впервые метод лазерной (или оптической) агрегометрии был предложен в 1958 году автором W. Zijlstra [120] (см. также [4, 121] по истории развития агрегометрии) для изучения формирования эритроцитарных агрегатов. Данный метод основан на анализе света, рассеянного от суспензии клеток крови (эритроцитов или тромбоцитов), которые в процессе измерения взаимодействуют друг с другом, от чего параметры рассеянного излучения меняются во времени. В дальнейшем данный метод будет рассматриваться относительно рассеяния только на эритроцитах. Метод лазерной агрегометрии подразумевает рассеяние на большом ансамбле клеток, поэтому в общем случае реализуется режим многократного рассеяния. Прежде, чем перейти к анализу рассеяния излучения большим ансамблем клеток, необходимо рассмотреть, как рассеивает излучение один эритроцит, потом один слой этих клеток, и уже потом переходить к многократному рассеянию. Основные принципы рассеяния света эритроцитами и эритроцитарными структурами (агре-

гатами) подробно описан в книге [114].

На рынке существуют несколько типов коммерческих приборов, способных измерять параметры АЭ методом лазерной агрегометрии. К ним относятся лазерные агрегометры Myrenne [122], LORCA [123] и RheoScan [124—126]. Во всех трех агрегометрах используются диодные красные лазеры с длиной волны порядка $\lambda = 635 - 650$ нм. См. обзор по агрегометрам в разделе *Лазерные агрегометры для исследования агрегационных свойств эритроцитов*.

Физический принцип диффузного рассеяния света

Диффузное рассеяние света — это физический процесс, при котором электромагнитное излучение, взаимодействуя с неоднородностями среды или поверхности, со структурами в среде (в том числе с клетками), распространяется в направлениях, отличающихся от направления падающего пучка и не обязательно лежащих в плоскости излучения и нормали к поверхности. Диффузное рассеяние света зависит от неоднородностей в среде, так как данные неоднородности рассеивают падающее на них излучение. От характера рассеяния, а именно, от зависимости рассеянного излучения по углам (индикатрисы рассеяния) зависит картина рассеяния.

Основной принцип диффузного рассеяния при рассмотрении агрегометрии заключается в том, что рассеянное излучение зависит от характерных размеров рассеивателей: эритроцитов и их агрегатов. Так, один эритроцит рассеивает падающее на него излучение не так, как массивный эритроцитарный агрегат.

Поскольку при процессе АЭ рассеивающие объекты изменяются в размерах: одиночные эритроциты спонтанно взаимодействуют друг с другом, образуя агрегаты, то по кинетике рассеянного излучения возможно наблюдать за процессом образования этих структур во времени. Для лучшего понимания того, как рассеивают свет частицы разных размеров, обратимся к численным методам.

Чаще всего для решения численных задач рассеяния света пользуются формализмом Стокса–Мюллера, что позволяет учесть интенсивность и поляризацию излучения. Упругое взаимодействие частицы с падающим на него излучением описывается, как линейное преобразование параметров Стокса (I_i, Q_i, U_i, V_i) падающего излучения через матрицу рассеяния Мюллера, результатом которого являются параметры Стокса рассеянного излучения (I_s, Q_s, U_s, V_s) [114, 127, 128]:

$$\begin{pmatrix} I_s \\ Q_s \\ U_s \\ V_s \end{pmatrix} = \frac{1}{k_s^2 r^2} \underbrace{\begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} & S_{13} & S_{14} \\ S_{21} & S_{22} & S_{23} & S_{24} \\ S_{31} & S_{32} & S_{33} & S_{34} \\ S_{41} & S_{42} & S_{43} & S_{44} \end{pmatrix}}_{\text{Матрица Мюллера}} \begin{pmatrix} I_i \\ Q_i \\ U_i \\ V_i \end{pmatrix}, \quad (1.11)$$

где волновое число k_s ($k_s = \text{Re}(k_s)$) и расстояние до рассеивателя r не являются свойствами рассеивателя и поэтому не включаются в матрицу. Заметим также, что матрица Мюллера безразмерна и не нормирована, а также зависит от угла рассеяния и ряда других параметров [128].

В связи с тем, что для неполяризованного света вектор Стокса равен $(I_i, 0, 0, 0)$, то интенсивность рассеянного неполяризованного излучения I_s описывается элементом матрицы Мюллера S_{11} .

На рис.7 приведены индикатрисы рассеяния света сферами 5 мкм и 15 мкм при облучении их плоской неполяризованной волной с длиной волны 650 нм. Данный расчет был проведен автором диссертации методом дискретно-дипольного приближения с помощью программы **ADDA** [129] (см. также инструкцию по использовании программы в [128]). По данному примеру хорошо виден основной принцип однократного рассеяния света микрочастицами: чем больше характерный размер рассеивающего объекта при фиксированной длине волны, тем индикатриса рассеяния более вытянута в переднюю полуплоскость и тем меньше характерный угол рассеяния в малые углы. Данный принцип справедлив в том случае, если можно пренебречь поглощением света. Заметим, что при рассмотрении индикатрис рассеяния от микрочастиц больших по размеру, чем длина волны излучения, свет в основном рассеивается в переднюю полуплоскость. Так, интенсивность рассеянного вперед света ($\theta = 0^\circ$) с длиной волны 650 нм от сферы размером 5 мкм отличается от интенсивности рассеянного назад света ($\theta = 180^\circ$) чуть меньше, чем в 4×10^5 раз (см. рис.7).

Однократное рассеяние света на эритроцитах и агрегатах

Эритроцит в физиологических условиях представляет из себя двояковогнутый диск, толщина которого составляет 2-3 мкм, диаметр — 6-8 мкм, объем — 90 фл, а площадь поверхности - около 136 мкм² [130]. Физиологические условия подразумевают, что эритроцит находится в аутологичной плазме крови или в рас-

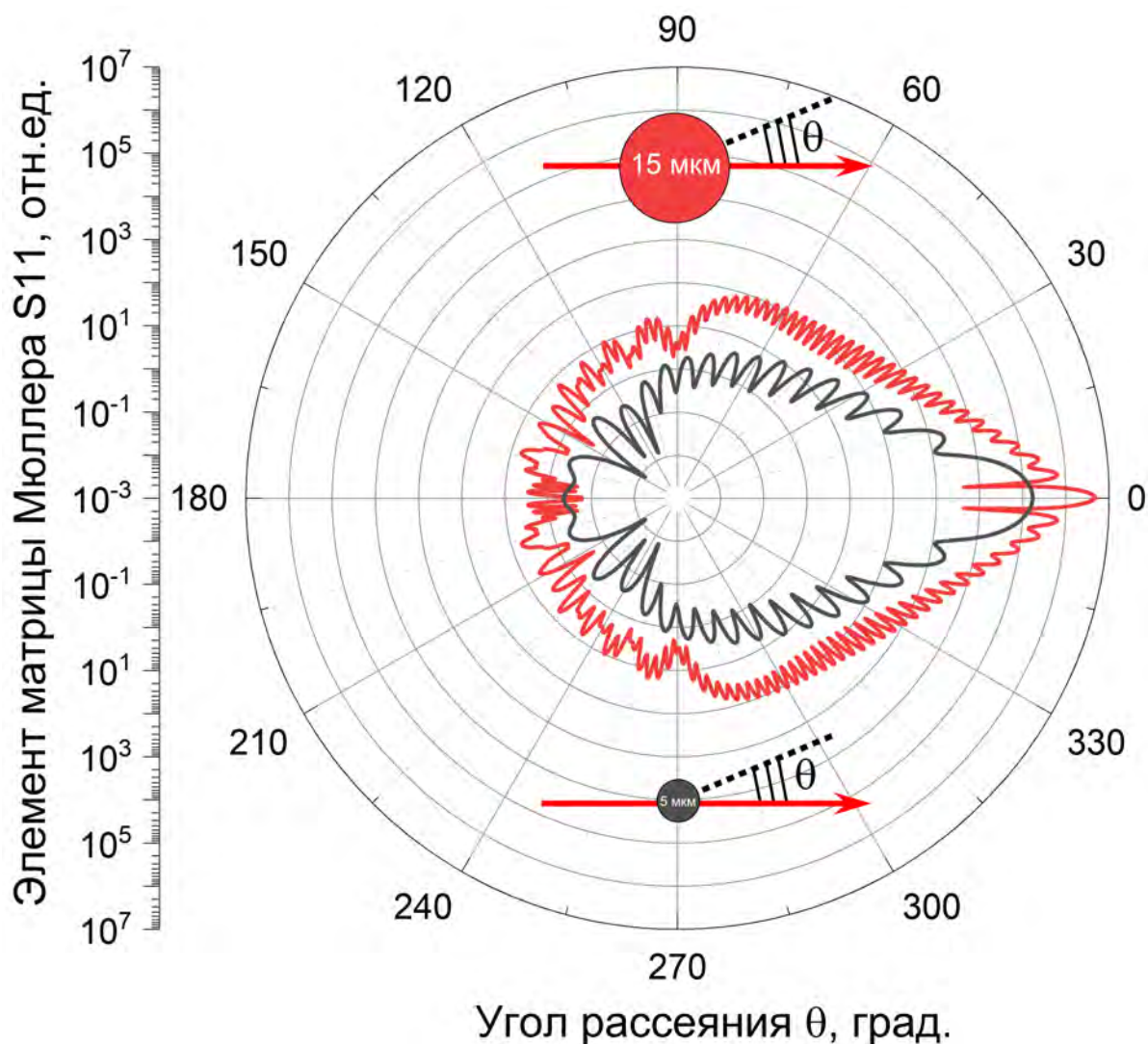


Рис. 7: Индикатрисы рассеяния для сфер размером 5 мкм (черная линия) и 15 мкм (красная линия). Длина волны падающего излучения $\lambda = 650$ нм. Индикатрисы вычислены методом дискретно-дипольного приближения в программе **ADDA** [129].

творе с значением осмолярности $\sim 280 - 300$ мОсм/кг. При изменении ионной концентрации среды эритроцит претерпевает изменения, стараясь осмотически уравновесить концентрацию солей внутри и снаружи: в растворе с малым количеством солей эритроцит заполняется водой и приобретает форму шара (сфероцита), тогда как при избытке солей в растворе вода выкачивается из эритроцита, и он принимает шиповидную форму (эхиноцита [131]) (см. рис.2).

Обычно эритроцит для численного моделирования задач светорассеяния аппроксимируют различными геометрическими фигурами, которые выбираются исходя из поставленных задач и требуемой точности: это может быть эквиобъемная сфера, сфероид вращения, двояковогнутый диск, плавный двояковогнутый диск, овал Кассини и другие [114]. Эритроцитарные агрегаты также можно аппроксимировать различными фигурами. Будем рассматривать эритроциты и их агрегаты

в виде эллипсоидов вращения. Эллипсоид для аппроксимации эритроцита будет иметь оси длины 6 мкм и 3 мкм.

На рис.8 представлены индикатрисы рассеяния для длины волны $\lambda = 650$ мкм) одиночного эритроцита, большая ось которого ориентирована перпендикулярно направлению излучению, и агрегата, состоящего из 5 эритроцитов. Данный расчет был проведен автором диссертации методом дискретно-дипольного приближения с помощью программы **ADDA** [129]. Характерные минимумы и максимумы на рис.8 обусловлены эффектами интерференции. Заметим, что одиночный эритроцит и эритроцитарный агрегат (см. рис.8б) рассеивают падающее излучение преимущественно в переднее полупространство: отношение максимальной интенсивности рассеянного вперед излучения к минимальной ($\frac{I(\theta=0^\circ)}{\min(I(\theta))}$) для одиночного эритроцита составляет порядка $\sim 10^7$, тогда как для агрегата из 5 эритроцитов — $\sim 10^9$. Из этого можно сделать вывод, что чем больше размер частицы, тем больше отношение интенсивности рассеянного вперед света к интенсивности рассеянного назад света.

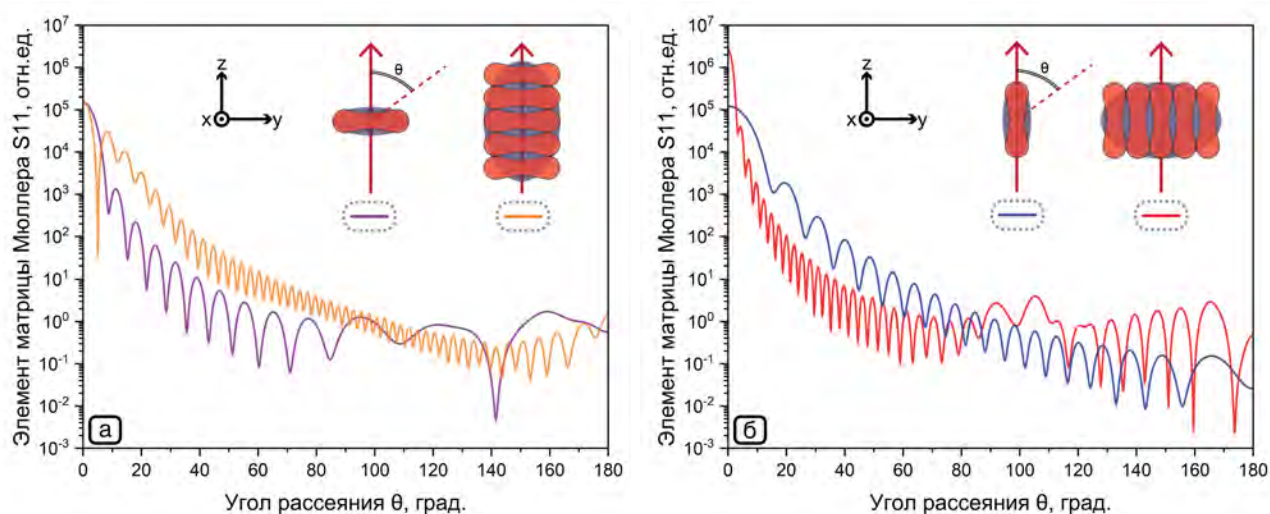


Рис. 8: Индикатрисы рассеяния для одиночного эритроцита и агрегата, состоящего из 5 эритроцитов в двух положениях: (а) большая ось эллипсоида перпендикулярна направлению пучка и (б) параллельна пучка. Пучок распространяется по оси z . Плоскость рассеяния: yz . Длина волны падающего излучения $\lambda = 650$ мкм. Оси сфероида вращения, аппроксимирующего один эритроцит — 6 и 3 мкм. Индикатрисы вычислены методом дискретно-дипольного приближения в программе **ADDA** [129].

Важно отметить, что от ориентации эритроцита [132], а также от его формы [114] индикатриса рассеяния изменяется. Это видно на примере индикатрис рассеяния эритроцита, рассчитанных для случая, когда большая его ось сонаправлена

или перпендикулярна падающему на него излучению (см. рис.8а и рис.8б).

На рис.9 представлены индикатрисы рассеяния, усредненные по 3-ем углам Эйлера (усредненные индикатрисы при вращении эритроцита или агрегата). Видно, что при сравнении индикатрис рассеяния одиночного эритроцита и агрегата из 5 клеток, рассеяние последним больше по абсолютному значению для всех углов. Однако если дополнительно рассмотреть индикатрису рассеяния одиночного эритроцита, умноженную на 5 (т.е., на кол-во эритроцитов в агрегате), то видно, что интенсивность рассеянного назад излучения больше. При этом отношение максимальной интенсивности рассеяния к минимальной для агрегата составляет порядка $4,3 \times 10^6$, а для эритроцита — 9×10^5 . На этом примере видно, что чем больше размер частицы, тем больше абсолютное значение рассеяния вперед, и больше отношение интенсивности рассеянного вперед света к интенсивности рассеянного назад света.

В статьях по большей части рассматривается рассеяние эритроцитами для длины волны красного света (He-Ne лазер $\lambda = 632,8 \text{ нм}$) [133], поскольку в большинстве установок используются красные лазеры, т.к. область частот, соответствующая красному и инфракрасному диапазону попадает в окно прозрачности гемоглобина (см. рис.14). Важно подчеркнуть, что в терминах рассеяния характерные размеры частицы всегда нужно сравнивать с длиной волны излучения. Таким образом, при анализе индикатрис рассеяния в общем случае удобнее пользоваться размерным параметром $\rho = \frac{2\pi}{\lambda}a$, где a — характерный размер рассеивающей микрочастицы или клетки [114]. Также про однократное рассеяние эритроцитами и агрегатами подробнее см. в статье [134].

Многократное рассеяние света на эритроцитах и их агрегатах

Все выводы и результаты, полученные в предыдущем пункте, были получены при однократном рассеянии падающего излучения эритроцитом или эритроцитарным агрегатом. В преимущественном большинстве экспериментальных установок клетками рассеивается не только падающее излучение, но и излучение, рассеянное от других клеток, поскольку толщина измерительных кювет в разы превышает характерные размеры клеток. Данный случай соответствует многократному рассеянию света [114]. Многократное рассеяние можно численно моделировать методами, приведенными выше (к примеру, методом конечных разностей во временной области [135]), но в большинстве случаев из-за большого количества рассеиваю-

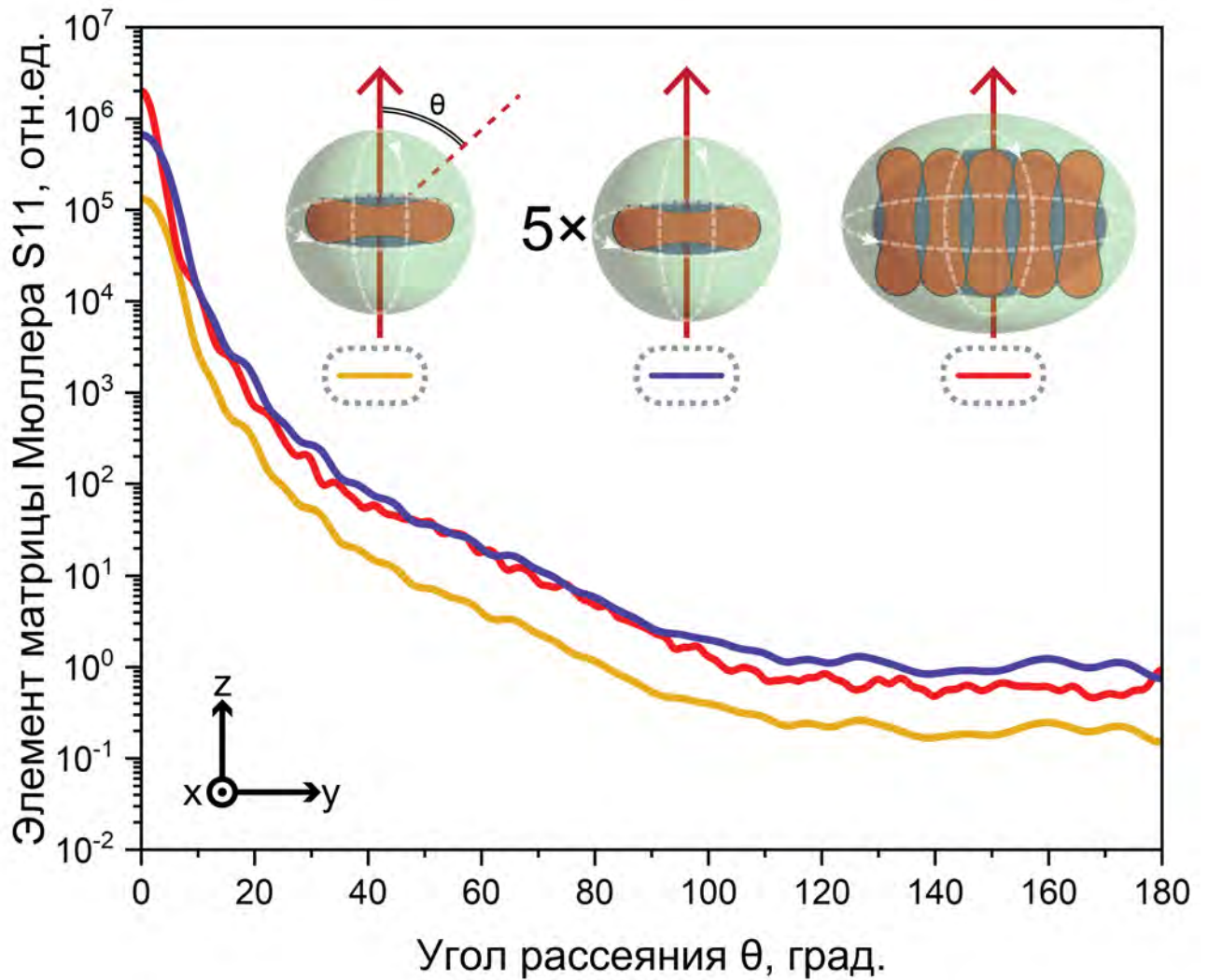


Рис. 9: Усредненные по 3-ем углам Эйлера индикатрисы рассеяния (1) для одиночного эритроцита, (2) для одиночного эритроцита, умноженная на 5, и (3) агрегата, состоящего из 5 эритроцитов. Пучок распространяется по оси z . Плоскость рассеяния: yz . Длина волны падающего излучения $\lambda = 650$ мкм. Оси сфероида вращения, аппроксимирующего один эритроцит — 6 и 3 мкм. Индикатрисы вычислены методом дискретно-дипольного приближения в программе **ADDA** [129].

щих клеток моделирование проводится методом Монте-Карло [136, 137]. В этом методе обычно при моделировании падающее излучение представляется в виде множества парциальных лучей, рассеивающихся (а также с небольшой вероятностью поглощающихся) на эритроцитах и их агрегатах. Каждый луч с какой-то вероятностью рассеивается на эритроците или эритроцитарной структуре в разные углы. Вероятность рассеяния от угла заложена в фазовой функции f (нормированной индикатрисе рассеяния (для 2D: $\int_0^{2\pi} f(\theta) d\theta = 1$; для 3D: $\int_{4\pi} f(\Omega) d\Omega = 1$)) этой частицы, которая была получена одним из численных методов ранее [114].

В книге [114] было исследовано влияние количества слоев (сначала излучение

рассеивается на первом слое клеток; на втором слое рассеивается изначальное излучение и рассеянное на первом слое и т.д.) неагрегированных эритроцитов на индикатрису рассеяния. Анализ проводился для взвеси сфероидов, моделирующих одиночные эритроциты (см. рис.10). Видно, что с увеличением количества слоев увеличивается интегральная интенсивность рассеянного назад излучения. Также видно, что светорассеяние в малые углы монотонно уменьшается с увеличением количества слоев. При однократном рассеянии излучения на первом слое почти всё излучение рассеивается во второй слой. Однако на второй слой падает уже неколлимированный пучок, представляющий смесь рассеянного и изначального излучения. Поэтому доля рассеянного назад излучения от второго слоя будет больше, чем для первого слоя.

Таким образом, чем больше слоев клеток, тем больше интегральная интенсивность рассеянного назад света: видно, что увеличение количества слоев вдвое приводит к увеличению интегральной интенсивности рассеяния назад в 4 раза. Также следует отметить, что учет 64-х слоев в приведенной модели соответствует приблизительно миллиметровому слою суспензии эритроцитов при их концентрации (гематокрите) в растворе 30% [114].

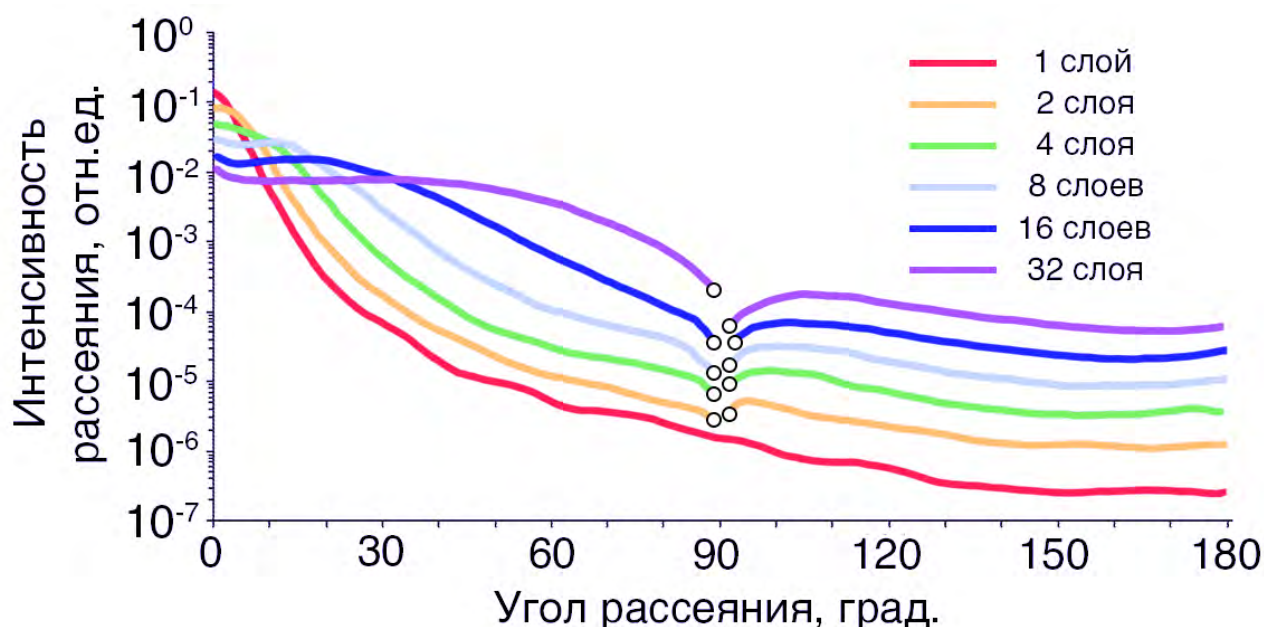


Рис. 10: Индикатрисы многократного рассеяния света взвесью эритроцитов, моделируемых эквивалентными сферами, для разного количества слоев рассеивающих клеток (от 1 до 32 слоев). Разрывы в районе 90° связаны с геометрией моделирования. Переработано из [114].

1.6.3 Лазерная эктацитометрия

Эритроциты имеют способность обратимо деформироваться под действием сдвиговых напряжений. Деформируемость эритроцитов сильно влияет на их способность проходить через капилляры [4]. Для измерения деформируемости эритроцитов применяют, в частности, метод лазерной эктацитометрии, основанный на анализе дифракционной картины Фраунгофера от сильно разбавленной суспензии эритроцитов, движущихся в сдвиговом потоке, при их освещении лазерным пучком [138]. Исторически впервые данный метод был предложен и использован в работе М. Bessis и N. Mohandas в середине 1970-х годов [139]. При удлинении эритроцитов в одном направлении, дифракционная картина вытягивается в перпендикулярном. Таким образом, можно получить характеристику способности клеток к деформации в зависимости от сдвиговых напряжений.

1.6.4 Турбидиметрия для исследования функции тромбоцитов

Турбидиметрия (иногда её называют лазерной агрегометрией тромбоцитов) в ее современном виде была впервые описана Борном [140, 141] и независимо О'Брайеном [142] в 1962 году. Основной принцип турбидиметрии основан на регистрации коллимированного пропускания света через перемешиваемую мутную суспензию тромбоцитов. Присутствие их во взвеси приводит к тому, что свет рассеивается клетками таким образом, что меньшая часть света проходит через суспензию тромбоцитов без акта рассеяния. При добавлении индуктора АТ образуются тромбоцитарные агрегаты, в результате чего количество рассеянного света уменьшается до тех пор, пока он не будет проходить через суспензию тромбоцитов практически беспрепятственно (см. рис.11). Тем самым, количество пропущенного света является мерой оптической плотности суспензии тромбоцитов, и по мере АТ оптическая плотность будет уменьшаться.

Данный метод не может использоваться для измерения агрегации тромбоцитов в цельной крови, поскольку присутствие эритроцитов препятствует прохождению света через среду с тромбоцитами.

Используя различные индукторы АТ при их добавлении в различных концентрациях в среду с тромбоцитами, по зависимости кривой оптической плотности от времени, можно выявить специфические дефекты в путях активации и АТ. Чаще всего используют следующие индукторы АТ: адреналин, аденозиндифосфат

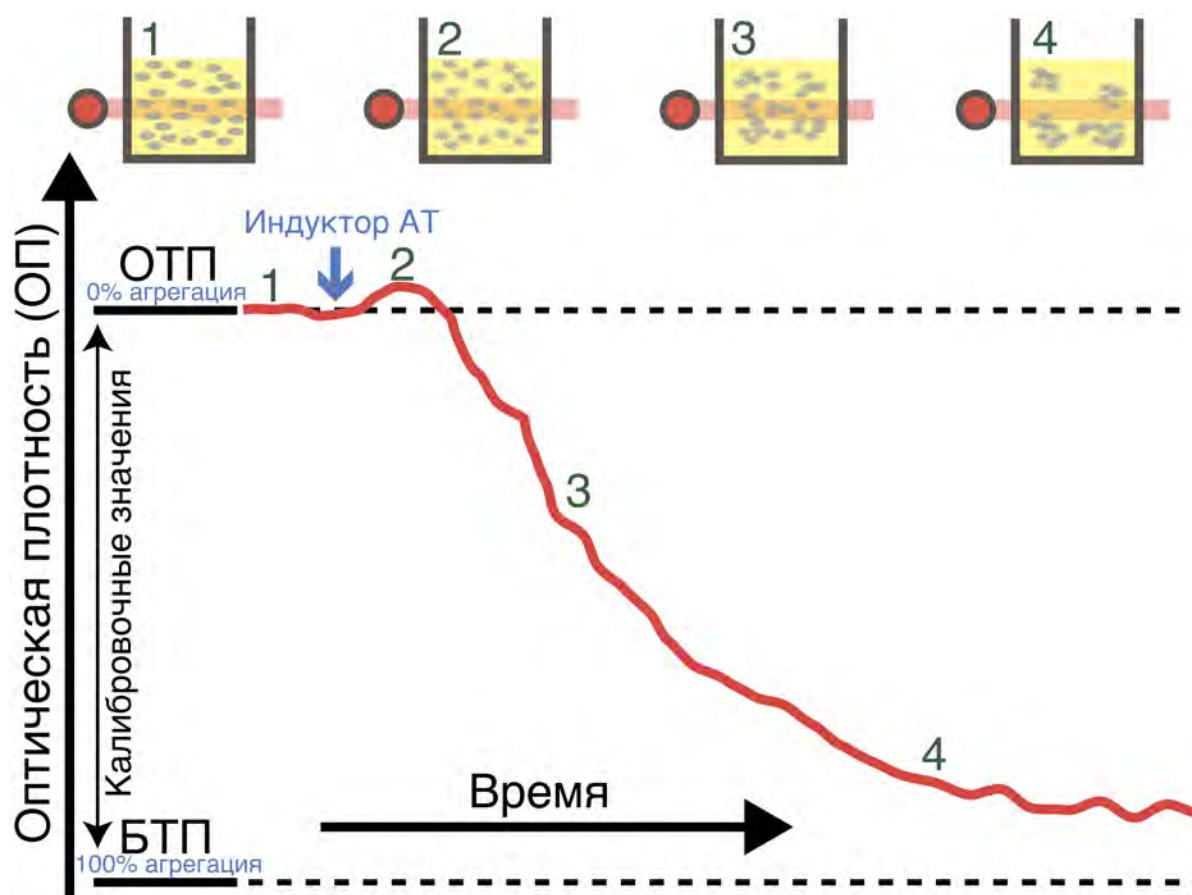


Рис. 11: Схема типичной агрегатограммы, на которой отображена зависимость оптической плотности плазмы с тромбоцитами от времени при добавлении индуктора АТ. Обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП) имеет относительно высокую оптическую плотность (ОП), что принимается за 0% АТ. После добавления индуктора АТ (синяя стрелка) тромбоциты агрегируют, позволяя большему количеству света проходить через суспензию тромбоцитов, что приводит к уменьшению оптической плотности. Бедная тромбоцитами плазма (БТП) имеет оптическую плотность, эквивалентную 100% агрегации. Увеличение ОП после добавления индуктора обусловлено изменением формы тромбоцитов.

(АДФ), коллаген, арахидоновую кислоту, ристоцетин и др. [143].

В ранних исследованиях АТ измеряли по абсолютной оптической плотности, однако чаще всего результаты турбидиметрических агрегометров выражаются в процентах. Это достигается путем калибровки агрегометра таким образом, чтобы оптическая плотность обогащенной тромбоцитами плазмы до добавления индуктора АТ соответствовала 0% агрегации, а оптическая плотность в среде без тромбоцитов — 100% АТ (см. рис.11)).

Про метод турбидиметрии для исследования АТ более подробно смотри в обзоре [143], а также в [144].

1.6.5 Оптический захват

Физический принцип оптического захвата

В 1970-ом году во время своей научной работы в лаборатории Белл (США) Артуром Ашкиным впервые был продемонстрирован и объяснен эффект оптического захвата на примере диэлектрических латексных сфер микронного размера [145]. В дальнейшем была реализована возможность оптической левитации аэрозольных частиц [146], захвата отдельных атомов с дальнейшим их охлаждением в оптической ловушке [147], была предложена установка ЛП для удержания диэлектрических микрочастиц в заданной области пространства с применением одного лазерного пучка [148] и, что самое важное в контексте данной работы, реализован захват и манипулирование отдельными живыми клетками с помощью ЛП [149]. Именно за это открытие в 2018 году Артур Ашкин стал лауреатом нобелевской премии по физике с формулировкой: *"За изобретение оптического пинцета и их применение в биологических системах"*. ЛП открыл множество возможностей для изучения живых клеток; до этого захват и манипулирование клетками был возможен только благодаря механическому контакту, который сильно влияет на свойства клеток. Так на уровне одиночных клеток с помощью ЛП изучались сперматозоиды [150], жгутиковые бактерии [151], вирусы [152], клетки крови [153, 154] и многие другие [155].

Оптическая ловушка представляет собой лазерный пучок, остро сфокусированный с помощью объектива с большой числовой апертурой. В общем случае сила, действующая на частицу в поле сфокусированного лазерного пучка, имеет две составляющие: продольную силу (направленную по вектору распространения пучка) и поперечную силы (направленную вдоль градиента интенсивности света в пучке). Первую силу называют «Рассеивающей силой» ($F_{\text{расс}}$), вторую «Градиентной силой» ($F_{\text{град}}$).

Оптический захват возможен для объектов разных размеров: от атомов до частиц, диаметр которых лежит в пределах нескольких десятков или даже сотен микрон [155]. В зависимости от характерного размера объекта a и длины волны излучения λ выделяют несколько режимов работы ЛП. Рассмотрим разные режимы работы ЛП: режим «Рэлея» ($a \ll \lambda$), режим «Ми» ($a \gg \lambda$) и немного поговорим про промежуточный режим ($a \approx \lambda$).

Заметим, что в дальнейшем в качестве захватываемых микрочастиц будут рассматриваться диэлектрики, поскольку физика захвата металлических частиц

немного отличается [156] от рассмотренной ниже и выходит за рамки данной работы. Для оптического захвата используется одномодовое излучение, обычно это гауссова мода TEM_{00} , поскольку фокусировка лазерного пучка с минимальным диаметром обеспечивает эффективный захват. Лазерные пучки с TEM_{01} или более высокими модами [155], и бесселевы пучки [157] также широко используются в разных конфигурациях экспериментов. В дальнейшем оптический захват будет рассмотрен только с использованием моды TEM_{00} .

Режим «Рэлея» $a \ll \lambda$

Режим «Рэлея» соответствует оптическому захвату частиц, характерный размер a которых много меньше длины волны излучения λ . Поскольку захватываемая частица диэлектрик, она может быть рассмотрена, как диполь. Поведение диполя в электромагнитном поле описывается Лоренцевской силой [158]:

$$\vec{F}_d = (\vec{p} \cdot \nabla) \vec{E} + \frac{\partial \vec{p}}{\partial t} \times \vec{B}, \quad (1.12)$$

где $\vec{p}$ – дипольный момент рассматриваемой частицы, электрическое поле $\vec{E}$ является суперпозицией подающего и рассеянного поля: $\vec{E} = \vec{E}_i + \vec{E}_s$ (i – от incident, а s – scattering).

Для сферической частицы радиусом a с коэффициентом преломления $n_{\text{част}}$, находящийся в среде с коэффициентом преломления $n_{\text{среды}}$, «рассеивающая сила» в направлении падающего пучка с длиной волны λ будет равна $F_{\text{расс}} = \frac{n_{\text{среды}} P}{c}$, где $P_{\text{расс}}$ – это мощность рассеянного излучения. В терминах интенсивности лазерного пучка I_o и относительного показателя преломления $m = \frac{n_{\text{част}}}{n_{\text{среды}}}$ «рассеивающая сила» выражается следующим образом [148]:

$$\vec{F}_{\text{расс}} = \frac{128\pi^5 a^6 n_{\text{среды}}}{3\lambda^4 c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 I_o \vec{e}_1, \quad (1.13)$$

где $\vec{e}_1$ – вектор, сонаправленный с направлением распространения пучка.

«Градиентная сила» имеет похожее выражение:

$$\vec{F}_{\text{град}} = \frac{2\pi a^3 n_{\text{среды}}^3}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla I_o. \quad (1.14)$$

Для того, чтобы частица захватывалась в оптическую ловушку, необходимо, чтобы «градиентная сила» численно была больше «рассеивающей силы», т.е. чтобы

$R = \frac{F_{\text{град}}}{F_{\text{расс}}} > 1$. Для гауссова пучка с перетяжкой ω_0 можно получить следующее выражение [148]:

$$R = \frac{F_{\text{град}}}{F_{\text{расс}}} = \frac{3\sqrt{3}}{64\pi^5} \frac{n_{\text{среды}}^2}{\frac{m^2-1}{m^2+2}} \frac{\lambda^5}{a^3\omega_0^2} \geq 1. \quad (1.15)$$

Из формулы (1.15) видно, что размер перетяжки существенным образом влияет на силу захвата. Причем, чем меньше перетяжка, тем более стабильным будет оптический захват. Также важно заметить, что оптический захват с помощью Гауссова пучка возможен только для частиц, у которых относительный показатель преломления больше 1 ($m > 1$).

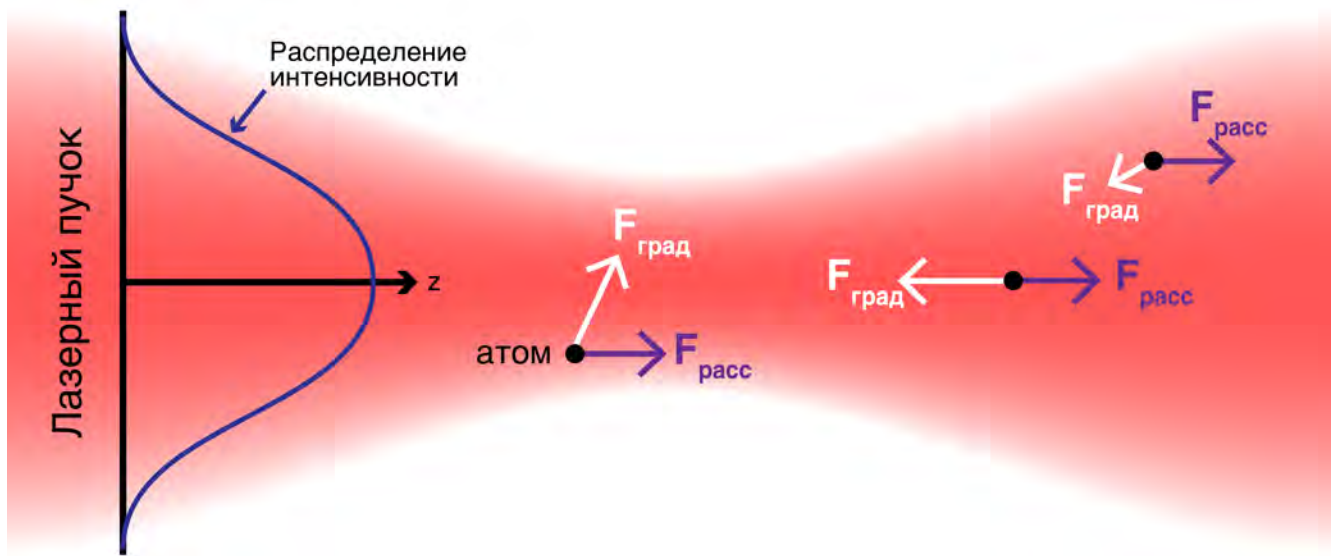


Рис. 12: Схема, поясняющая Рэлеевский режим захвата частиц, размер которых много меньше длины волны ($a \ll \lambda$), в оптической ловушке.

Режим «Ми» $a \gg \lambda$

Режим «Ми» соответствует оптическому захвату частиц, характерный размер a которых много больше длины волны излучения λ . При данном режиме чаще всего используют приближение геометрической оптики, рассматривая сфокусированный пучок, как сумму парциальных лучей, каждый из которых преломляется на частице [159]. Тем самым сила захвата, которая действует на частицу в направлении центра перетяжки возникает из-за того, что лучи преломляются на частице, и, если пренебречь поглощением, изменяется только направление их распространения (рис.13). Это влечет за собой изменения импульса, который в свою очередь передается захватываемой частице. Суммарная сила, действующая на частицу, имеет две составляющие: силу, направленную по распространению

энергии в лазерном пучке, и силу, направленную по градиенту напряжённости поля в этом пучке. Важно заметить, что для оптического захвата в данной конфигурации (рис.13) необходимо, чтобы относительный коэффициент преломления частицы был $m > 1$ [145].

Аналитическое выражение для силы захвата получается при рассмотрении сферической прозрачной частицы в области сфокусированного лазерного пучка. Оптические силы, действующие на частицу, могут быть получены с использованием теории Ми, в которой рассматривается точное аналитическое решение уравнений Максвелла для рассеяния света на сферической частице [114].

Если сферическая частица находится близко к фокусу, задано распределение

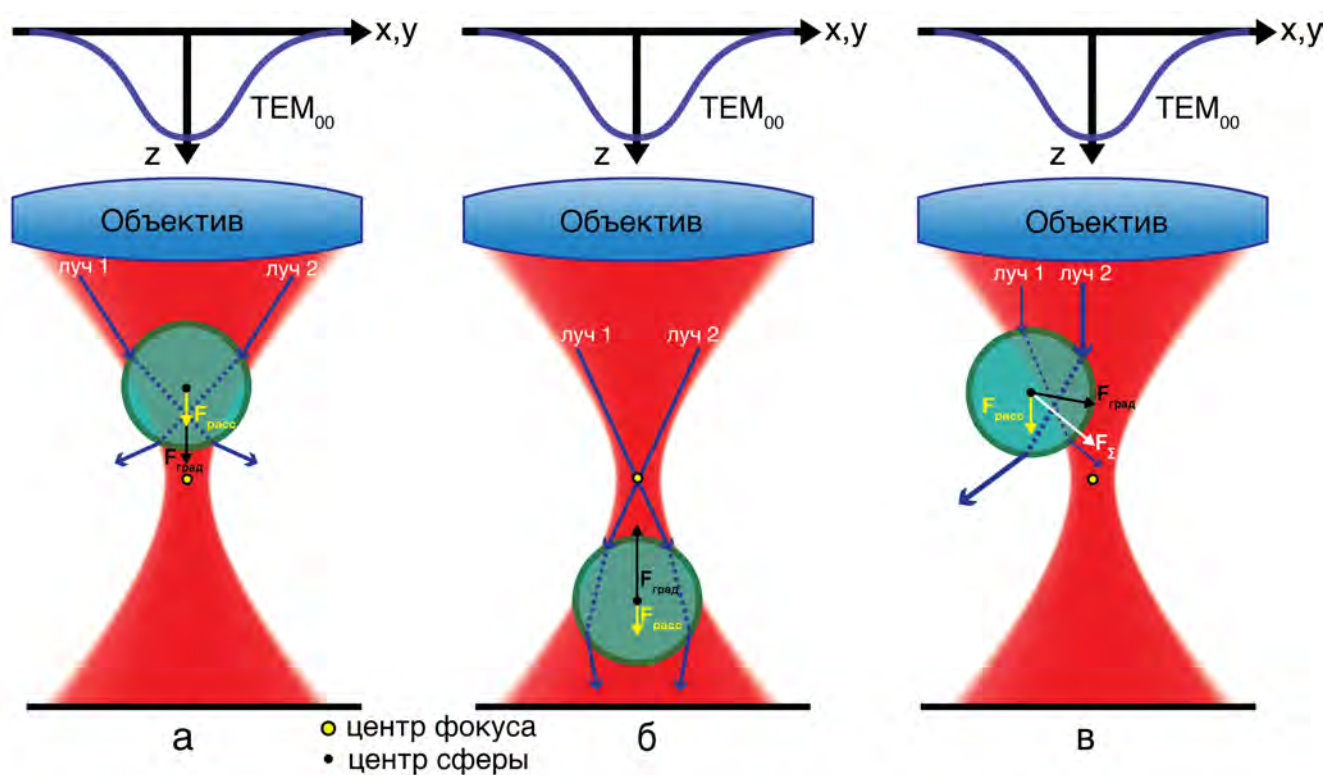


Рис. 13: Схема, поясняющая режим Ми захвата сферической частицы, размер которой много больше длины волны ($a \gg \lambda$), в оптическую ловушку. Слева: Гауссов пучок проходит через частицу; на частицу действует сила, направленная к центру пучка. Справа: Гауссов пучок фокусируется линзой объектива с высокой числовой апертурой; на частицу действует сила, направленная к перетяжке пучка. В двух случаях рассмотрены два парциальных луча «луч 1» и «луч 2», преломляющихся на частице.

парциальных лучей, собирающихся в фокусе линзы, то силы, действующие на сферическую частицу со стороны одного парциального луча, оптической мощностью P , выражаются через коэффициенты Френеля [159]:

$$\begin{aligned}
F_z = F_{\text{расс}} &= \frac{n_{\text{среды}} P}{c} \left\{ 1 + R \cos(2\theta) - \frac{T^2 [\cos(2\theta - 2\phi) + R \cos(2\theta)]}{1 + R^2 + 2R \cos(2\phi)} \right\}, \\
F_r = F_{\text{град}} &= \frac{n_{\text{среды}} P}{c} \left\{ R \sin(2\theta) - \frac{T^2 [\sin(2\theta - 2\phi) + R \sin(2\theta)]}{1 + R^2 + 2R \cos(2\phi)} \right\},
\end{aligned} \tag{1.16}$$

где θ и ϕ – углы падения и отражения, $n_{\text{среды}}$ – показатель преломления среды, R и T – Френелевские коэффициенты отражения и пропускания.

Тем самым получаем силу $\vec{F}_{\text{луч}} = \vec{F}_{\text{расс}} + \vec{F}_{\text{град}}$, действующую на сферическую частицу от одного парциального луча. Чтобы получить полную силу, действующую на частицу со стороны пучка, следует просуммировать все силы от рассматриваемых парциальных лучей ($F_{\Sigma} = \sum_{i=1}^N F_{i \text{ луч}}$). Заметим, что сила захвата должна зависеть от поляризации падающего излучения, поскольку коэффициенты R и T в уравнении (1.16) зависят от неё.

В общем случае для частицы произвольной формы силу оптического захвата можно представить в следующем виде [159]:

$$F = Q \frac{n_{\text{среды}} \tilde{P}}{c}, \tag{1.17}$$

где $\tilde{P}$ – мощность сфокусированного пучка, Q – безразмерный коэффициент эффективности захвата, зависящий от формы и коэффициента преломления частицы, c – скорость света в вакууме.

Выражение $\frac{n_{\text{среды}} \tilde{P}}{c}$ соответствует импульсу пучка, падающему на частицу за единицу времени. Тем самым, в уравнении (1.17) параметр $Q \leq 2$, причем $Q = 2$ соответствует зеркалу, расположенному перпендикулярно падающему пучку (очевидно, что оптического захвата в этом случае не будет). Заметим, что Q можно называть коэффициентом эффективности захвата только, если выполнены вышеперечисленные условия захвата, иначе данный коэффициент (как в случае зеркала) превращается в коэффициент эффективности передачи импульса. Заметим, что как и в случае режима «Рэлея» для оптического захвата необходимо, чтобы градиентная сила была больше по модулю, чем рассеивающая.

Автор диссертации написал программу на Python, которая позволяет симулировать движение сферической частицы в поле оптической ловушки, моделируемой суммой порциальных лучей, а также рассчитывать силы оптического захвата [160].

Промежуточный режим $a \approx \lambda$

Также можно выделить промежуточный режим работы ЛП, при котором размеры частицы a сопоставимы с длиной волны λ . Аналитическое выражение для силы захвата в этом случае можно получить только для сферических частиц, поскольку теория «Ми» о рассеянии излучения сферическими частицами применима при любом соотношении размера частицы и длины волны (не путать теорию «Ми» с режимом «Ми») [114].

В общем случае захватываемую частицу можно представить, как совокупность связанных диполей, каждый из которых находится в поле сфокусированного монохроматического пучка и поле излучения, рассеянного другими диполями [158]. Дипольный момент p малого объема V , который находится в локальном электрическом поле $\vec{E} = \vec{E}_i + \vec{E}_s$ (суперпозиция падающего E_i и рассеянного поля E_s) определяется следующим образом в системе СИ:

$$p = \varepsilon_0 n_{\text{среды}}^2 V \alpha E, \quad (1.18)$$

где ε_0 – электрическая постоянная ($\varepsilon_0 = 8,85 \times \text{пФ/м}$); α – поляризуемость. Согласно формуле Клаузиса-Моссотти $\alpha = 3(m^2 - 1) / (m^2 + 2)$, где $m = n_{\text{част}} / n_{\text{среды}}$ – относительный показатель преломления.

Сила, действующая на малый объем V диполей, после усреднения равна:

$$\mathbf{F}_d = \frac{\varepsilon_0 n_{\text{среды}}^2 V \operatorname{Re}(\alpha)}{4} \nabla E_0^2(\mathbf{r}), \quad (1.19)$$

где E_0 – это амплитуда электрического поля монохроматического лазерного излучения.

Эта дипольная сила может быть отождествлена с плотностью силы $f = F_d/V$, и полная оптическая сила $F_{\text{опт}}$, действующая на частицу получается в результате интегрирования по всему объему диполей. Поскольку локальное поле E фактически является суперпозицией двух полей, падающего и рассеянного, оптическую силу можно разделить на две части: градиентную силу $F_{\text{град}}$ (которая зависит от градиента интенсивности падающего поля) и рассеивающую силу $F_{\text{расс}}$ (которая в основном описывает рассеяние/давление света).

$$\begin{aligned}
\mathbf{F}_{\text{опт}} = \int_V \mathbf{f} dV = & \underbrace{\frac{\varepsilon_0 n_{\text{среды}}^2 \text{Re}(\alpha)}{4} \int_V \nabla |\mathbf{E}_i|^2 dV}_{\mathbf{F}_{\text{град}}} + \\
& + \underbrace{\frac{\varepsilon_0 n_{\text{среды}}^2 \text{Re}(\alpha)}{4} \int_V \left(\nabla |\mathbf{E}_s|^2 + \mathbf{E}_i \mathbf{E}_s^* + \mathbf{E}_i^* \mathbf{E}_s \right) dV}_{\mathbf{F}_{\text{расс}}}.
\end{aligned} \tag{1.20}$$

Тем самым, зная поле падающего пучка, поле внутри частицы и показатель её преломления, а также показатель преломления среды, можно вычислить оптическую силу, действующую на частицу с помощью уравнения 1.20. Важно отметить, что при всех вышеописанных случаях не учитывалось поглощение света частицей, поскольку обычно длина волны излучения подбирается, исходя из минимума поглощения, о чем будет сказано в следующем пункте.

Воздействие оптического захвата на эритроциты

ЛП позволяет захватывать и манипулировать живыми клетками без механического контакта с ними, однако это не значит, что нет никакого воздействия оптической ловушки на захваченные клетки. При изучении живых клеток лазерными методами должны подбираться такие условия и параметры излучения, при которых на них осуществляется минимальное воздействие. Тепловой нагрев является одним из основных воздействий оптической ловушки на живые клетки [155]. Чтобы минимизировать тепловое воздействие выбирают такую длину волны излучения λ , при которой поглощение минимально. Большинство живых клеток и тканей имеют минимум поглощения, лежащий в ближнем ИК диапазоне [27], поскольку вода, из которой по большей части состоят живые организмы, имеет минимум поглощения в этой области. Часто в литературе выделяют диапазон длин волн для оптического захвата (оптической прозрачности) для живых клеток: $790 \sim 1064 \text{ нм}$ [161].

Далее в качестве живых клеток рассмотрим эритроциты. На рис.14 приведены спектры поглощения основных компонентов эритроцита. В связи с тем, что на долю гемоглобина в цитоплазме приходится около 95% среди остальных белков, то спектр поглощения гемоглобина в основном определяет тепловой эффект оптической ловушки.

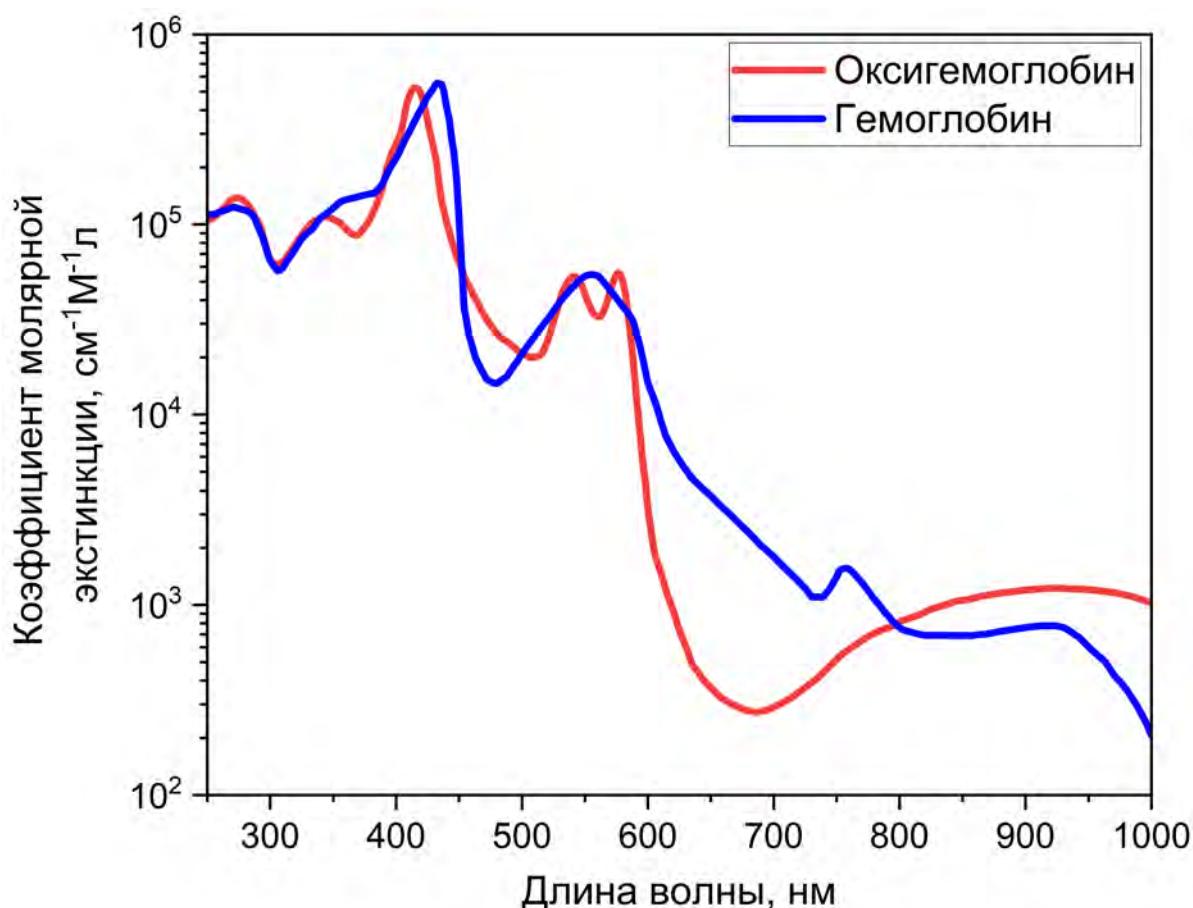


Рис. 14: Спектры поглощения гемоглобина и оксигемоглобина. Данные для построения взяты с открытого ресурса, в котором были усреднены данные из ряда статей и источников для наилучшей оценки [162].

Из рис. 14 видно, что минимум спектра поглощения гемоглобина лежит в ближнем ИК; поэтому для захвата эритроцита часто выбирается длина волны Nd:YAG лазера $\lambda = 1064$ нм. Было показано, что для длины волны лазерного излучения 1064 нм и мощности 30 мВт при длительности оптического захвата 15 мин. никаких внешних изменений в эритроците не наблюдается [163]. Также было показано для той же длины волны, что различие между температурой внутри эритроцита и температурой окружающей среды при мощности излучения $P = 100$ мВт не превышает $7 \sim 12$ °C [164]. В связи с тем, что большинство экспериментов по захвату эритроцитов на ЛП проходит при комнатной температуре ≈ 20 °C и их длительность обычно не превышает нескольких мин., то температура эритроцита в этом случае не превышает физиологической (37 °C). Важно заметить, что данные результаты справедливы для непрерывного режима лазера; для фемтосекундного лазера эти отношения изменятся [165]. С помощью рамановской спектроскопии было показано, что характерные рамановские пики гемоглобина не изменяются на

протяжении 15 мин. при мощности падающего излучения 20 мВт [166]. В статье [167] говорится, что небольшие изменения в рамановских пиках могут проявляться спустя 90 секунд после захвата даже при мощности падающего излучения ~ 5 мВт, причиной чего служит денатурация гемоглобина и формирование фотопродукта, что в конце концов приводит к агрегации гемоглобина внутри клетки.

Оптический захват также влияет на форму клетки [124]. Причем при захвате эритроцита в оптическую ловушку он разворачивается боком [168], как изображено на рис.15а, и принимает грушевидную форму (рис.15б). Оптическая ловушка находится в области большего поперечного размера. До конца непонятно, как изменяет свою форму эритроцит в оптической ловушке: складывается его мембрана, из-за чего мы видим грушевидную форму, или же часть гемоглобина перетекает из одной части клетки в другую, что обусловлено мягкостью мембраны [169].

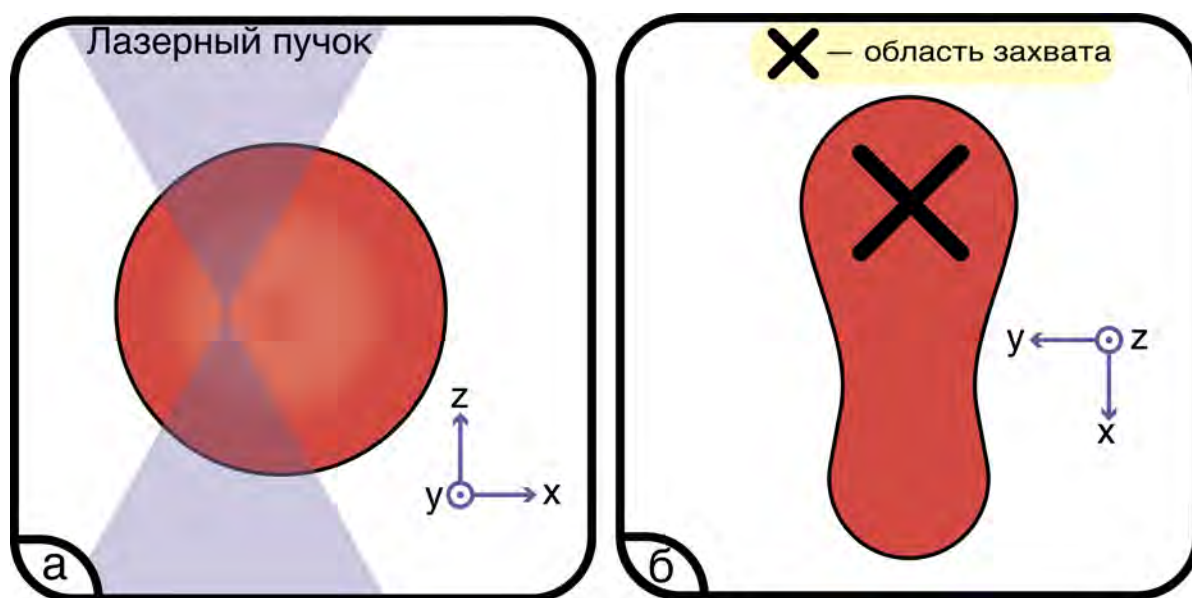


Рис. 15: Захват эритроцита в оптическую ловушку — (а) вид сбоку и (б) вид сверху. Оптическая ловушка схематически изображена черным крестом.

В численном моделировании при захвате эритроцита двумя пучками [170] видно, что эритроцит немного складывается и деформируется так, что места около перетяжки лазерного пучка «набухают». Скорее всего, изменение формы эритроцита при его захвате в одну ловушку сопровождается двумя изменениями: эритроцит складывается, и в то же время часть гемоглобина перетекает в область оптической ловушки до тех пор, пока силы со стороны оптической ловушки и со стороны мембраны не уравновесят друг друга. Данный вопрос рассмотрен автором диссертации в статье [171].

1.6.6 Цифровая капилляроскопия

Одним из методов прижизненного исследования микрореологических свойств крови является цифровая капилляроскопия — метод оптической неинвазивной микроскопии, позволяющий непосредственно визуализировать поверхностные микрососуды кожи и окружающую их ткань *in vivo* [172, 173]. Этот метод применяется в клинической практике для оценки состояния микроциркуляторного русла, что имеет важное значение для диагностики и мониторинга различных заболеваний, включая АГ, диабетическую ангиопатию и ССЗ. В большинстве случаев, под областью измерений цифровой капилляроскопии подразумевается эпонихий (не путать с кутикулой) — это участок кожи, которая находится сверху, вокруг ногтя (см. рис.16). Это связано с тем, что в данной области капилляры в последнем ряду располагаются параллельно коже так, что их можно визуализировать «по всей длине» [174].

Капилляроскопия позволяет проводить неинвазивную количественную оценку статических и динамических параметров микроциркуляции при обработке изображений капилляров [175]. Она позволяет количественно оценить такие важные факторы, как уровень отечности периваскулярных тканей, размер поперечного сечения капилляров, измерить скорость капиллярного кровотока и визуализировать эритроцитарные агрегаты внутри капилляров и оценить их количественно. Эти параметры являются критически важными для оценки микроциркуляторных нарушений и могут служить маркерами для ранней диагностики и прогнозирования развития заболеваний.

Чаще всего метод капилляроскопии используют для диагностики синдрома Рейно, и в меньшей степени системного склероза, дерматомиозита, а также других ревматических болезней [176, 177]. В большинстве исследований рассматриваются морфологические параметры капилляров: их плотность, диаметр в различных отделах и др. [178]. В исследовании [179] была показана корреляция между параметрами, полученными с помощью капилляроскопа и степенью системного склероза. В работе [180] представлен обзор статей по изучению ССЗ с помощью метода капилляроскопии — в большинстве исследований было показано, что у пациентов с ССЗ наблюдаются структурные и функциональные изменения в капиллярах ногтевого ложа при сравнении их со здоровыми донорами.

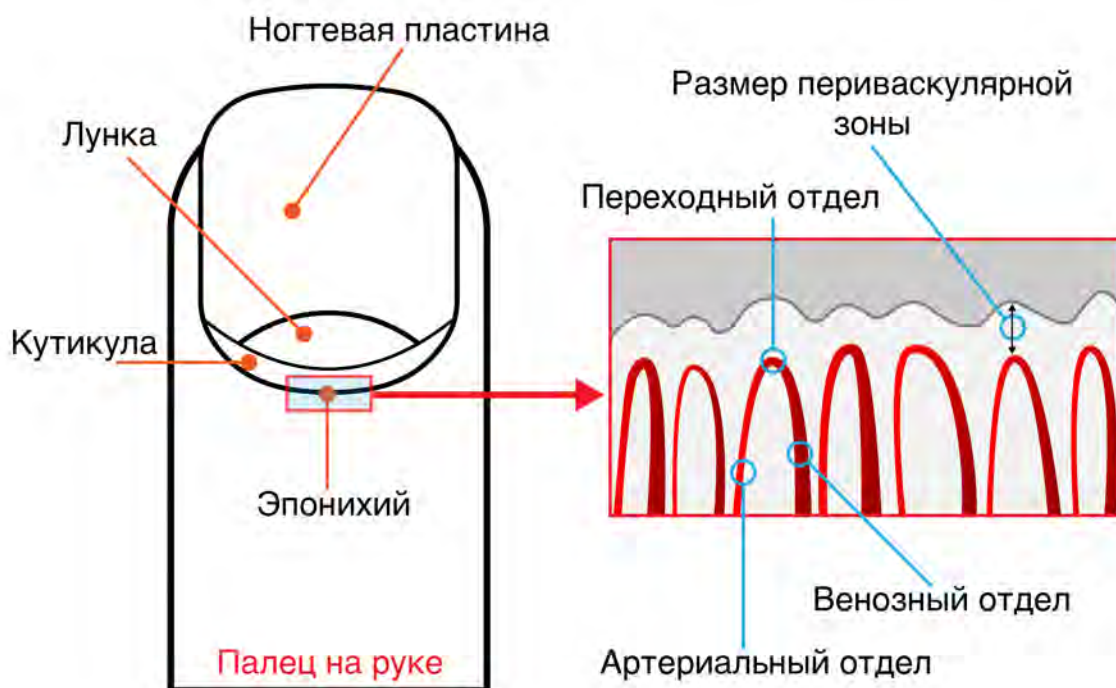


Рис. 16: Строение ногтевого ложа. Схематическое изображение эпонихия и капилляров в его области.

1.6.7 Другие оптические методы

Среди оптических методов, позволяющие изучать свойства клеток крови, нельзя не упомянуть методы рамановской и флуоресцентной микроскопии [181, 182]. Также важно обратить внимание на метод FLIM — микроскопия с визуализацией времени жизни флуоресценции. Данный метод позволяет получать изображения клеток, на которых визуализированы времена жизни разных флуорофоров, которым соответствуют разные цвета. FLIM микроскопия широко применяется при исследовании эритроцитов [183].

Также важным оптическим методом изучения свойств клеток крови является оптическая микроскопия, совмещенная с микрофлюидной камерой. Данный подход позволяет визуализировать одиночные клетки крови и, в частности, количественно оценить параметры АЭ и ДЭ. В работах А.В. Муравьева и соавт. [48, 184] были продемонстрированы преимущества данного подхода, который по ряду аспектов не имеет аналогов.

Также важным методом изучения клеток крови является проточная цитометрия — это метод исследования одиночных клеток, путем измерения рассеянного на них света / сигнала флуоресценции при освещении их лазерным пучком. Про-

точные цитометры широко применяются для изучения эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов [185].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Подготовка образцов крови

Образцы для измерения агрегации и деформации эритроцитов

Кровь для измерения параметров АЭ и ДЭ получали венепункцией локтевой вены пациента/здорового донора утром натощак с использованием антиагулянта ЭДТА КЗ (этилендиаминтетрауксусная кислота) или гепарина лития в зависимости от задачи. При измерении АЭ на лазерном пинцете с участием эндотелия использовалась плазма, полученная из крови с гепарином лития (см. сноску на стр. 69), или сыворотка крови (плазма крови без фибриногена). Для получения сыворотки использовались пробирки с активатором свертывания (SiO_2), которые центрифугировались через 40-50 мин. после забора крови. Центрифугирование происходило при 1000 g в течение 10 мин. Далее сыворотка переливалась в чистую пробирку.

В экспериментах использовалась как цельная, так и центрифугированная кровь. Для выделения эритроцитов цельную кровь центрифугировали при 170 g в течение 10 мин., и переливали надосадочную жидкость (обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП)) в чистую пробирку. Для получения плазмы крови без тромбоцитов, ОТП центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин., и надосадочную жидкость (плазма без тромбоцитов) переливали в чистую пробирку.

В статье [186] было изучено, как влияет температура хранения (4 °C и 25 °C) на агрегационные и деформационные свойства эритроцитов. Было показано, что ДЭ остается неизменной в течение 6 часов после забора крови при температуре хранения 4 °C или 25 °C; различий в индексе деформируемости не было обнаружено даже спустя 8 часов, однако другие параметры ДЭ изменились. Температура хранения влияла на период времени, в течение которого АЭ остается неизменной: при 25 °C были заметны изменения агрегационных свойств через 4-5 часов, а при 4 °C — через 12 часов.

В настоящей работе параметры АЭ и ДЭ измерялись на всех приборах и установках, кроме ЛП, в течение 4-5 часов после взятия крови. Эксперименты с ЛП занимают сравнительно больше времени, чем на других приборах/установках, и поэтому они выполнялись в течение 7-8 часов. Автором диссертации было продемонстрировано, что силы при парной АЭ не изменяются за данный промежуток

времени.

Образцы для измерения агрегации тромбоцитов

Кровь для измерения параметров АТ получали венепункцией локтевой вены пациента/здорового донора утром натощак и стабилизировали цитратом натрия.

В статье изучалось влияние температуры и времени после взятия крови на агрегационные свойства тромбоцитов [187]. Использовался ряд приборов и было показано, что при комнатной температуре АТ не претерпевает значимых изменений в течение 3 часов после взятия крови.

В нашей работе агрегационные свойства тромбоцитов измерялись в течение 3 часов после забора крови.

Эндотелий

Описание ниже справедливо для всех групп экспериментов, за исключением экспериментов по изучению влияния покрытия микрофлюидного канала кюветы RheoScan на микрореологические свойства эритроцитов (см. описание эксперимента и эндотелиальных клеток в разделе *Гидродинамическая прочность эритроцитарных агрегатов в микрофлюидном канале, выстланном эндотелиальными клетками*).

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) выделялись методами, описанными в работах [188] и [189] Ольгой Николаевной Щегловитовой в НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи. Пуповины получали от здоровых доноров после получения информированного письменного согласия. Для проведения экспериментов эндотелиальные клетки выращивали на покровных стеклах в 24-луночных планшетах в CO_2 -инкубаторе при 37 °C до образования монослоя. Для культивирования эндотелиальных клеток использовалась среда роста эндотелиальных клеток (medium 199 (Gibco), гентамицин, гепарин, 10% фетальной телячьей сыворотки (HyClone), фактор роста эндотелия (200 мкг/мл)). Для экспериментов использовались клетки только 1-го пассажа.

Известно, что морфология и функция эндотелиальных клеток в тканях заметно различается от одного пассажа к другому, независимо от того, высевались ли клетки на полимерную поверхность или на стекло [190, 191]. В статье [192] авторы пришли к выводу, что эндотелиальные клетки начинают терять свою характерную морфологию между 3-им и 6-ым пассажами.

Эндотелиальные клетки HUVEC для экспериментов на ЛП представляют собой монослой клеток на стеклышке диаметром 12 мм. Клетки доставлялись от НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи до МГУ имени М.В. Ломоносова на машине. После каждого извлечения стекла с эндотелием планшет незамедлительно заново помещался в эксикатор (в среду 5% CO_2) и далее в термостат при 37 °С.

На рис.17 представлена микрофотография фиксированного эндотелия¹, который получался следующим способом. Стеклышко с эндотелием вынималось из лунки и промывалось дважды холодным раствором PBS. Далее в чашку петри добавлялся раствор глутаральдегида, разбавленный в PBS до достижения концентрации 0,25%, и туда же помещалось стеклышко с эндотелием. Инкубация с глутаральдегидом проходила в течение 10 мин. После инкубации эндотелий вынимался, промывался дважды PBS и помещался в измерительную кювету под микроскоп.

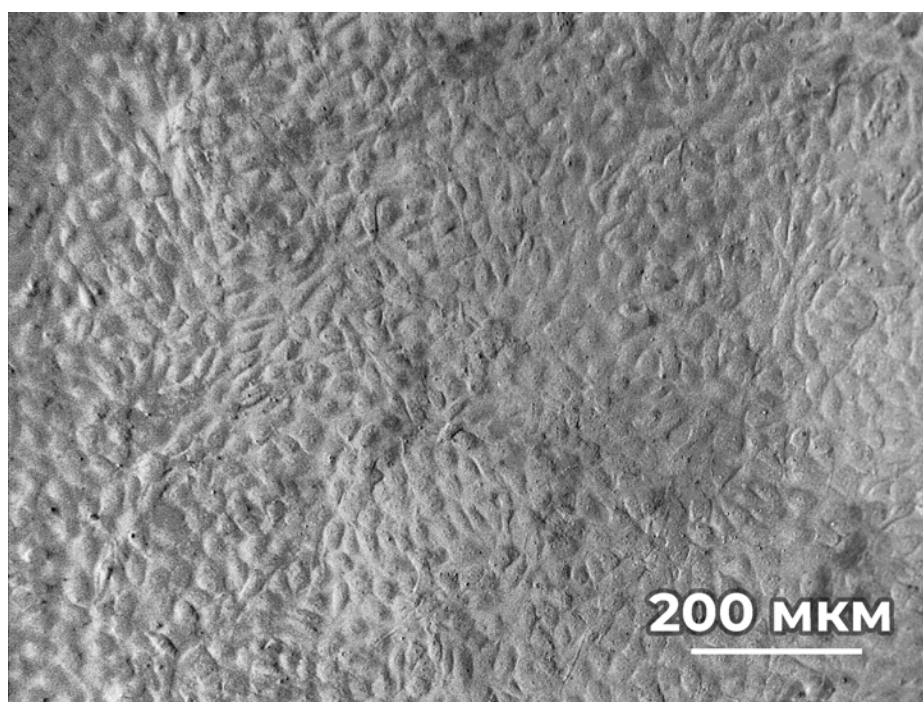


Рис. 17: Микрофотография фиксированного в глутаральдегиде эндотелия в PBS.

2.1.2 Этические нормы работы с кровью

Все добровольцы и пациенты, сдававшие кровь для экспериментов, были проинформированы о цели исследования и дали письменное информированное со-

¹Эндотелий в плазме крови почти неразличим при использовании светлопольной микроскопии из-за близости показателей преломления плазмы и эндотелия. Поэтому для его визуализации следует либо использовать фазово-контрастную микроскопию, либо измерять в растворе с другим показателем преломления.

гласие в соответствии с Хельсинкской декларацией. Работы в рамках диссертации получили разрешения Локального Этического Комитета МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова (№11/22 от 05.12.2022; №1/19 от 18.03.2019).

2.2 Методы

2.2.1 Лазерная агрегометрия эритроцитов

Принципиальная схема установки

Для измерения агрегационных параметров эритроцитов использовался прибор RheoScan AnD-300 (RheoMedTekh, Южная Корея) [124, 126]. Параметры АЭ на этом приборе можно измерять с использованием 2 типов одноразовых пластиковых кювет: RSA-C01 (в дальнейшем «маленькой») и RSD-K01 (в дальнейшем «большой»). На рис.18 представлена принципиальная схема для измерения агрегационных параметров на «большой» кювете². С помощью шприцевого насоса возможно создавать пониженное давление в левом резервуаре, что приводит к течению крови из правого резервуара в левый через соединяющий их канал толщиной 200 мкм. Сверху кювета освещается красным диодным лазером, и детектируется рассеянное назад излучение, интенсивность которого зависит от агрегационного состояния крови.

Протокол измерения

Измерение на «большой» кювете. Образец крови (0,5 мл) помещается в кювету с двумя резервуарами, связанными между собой каналом толщиной 200 мкм (рис.18). Далее кювета помещается в прибор с контролируемой температурой — 37 °С. Канал освещается красным лазером и детектируется свет, рассеянный назад. Начальный момент времени измерения характеризуется большой разницей давления между двумя резервуарами кюветы, и, следовательно, большими напряжениями сдвига (сверху на рис.19а). При протекании крови через канал агрегаты начинают дезагрегировать, т.е. их средний размер уменьшается, и они начинают рассеивать свет на большие углы, что приводит к увеличению интегральной интенсивности света, рассеянного назад³. Поскольку давление между резервуарами монотонно падает, то в какой-то момент эритроциты начинают агрегировать, что приводит к увеличению среднего размера агрегатов, следствием чего стано-

²Данный тип кювет применяется также для измерения деформационных параметров крови. См. следующий пункт.

³Верно и обратное: интенсивность света, рассеянного вперед уменьшается.

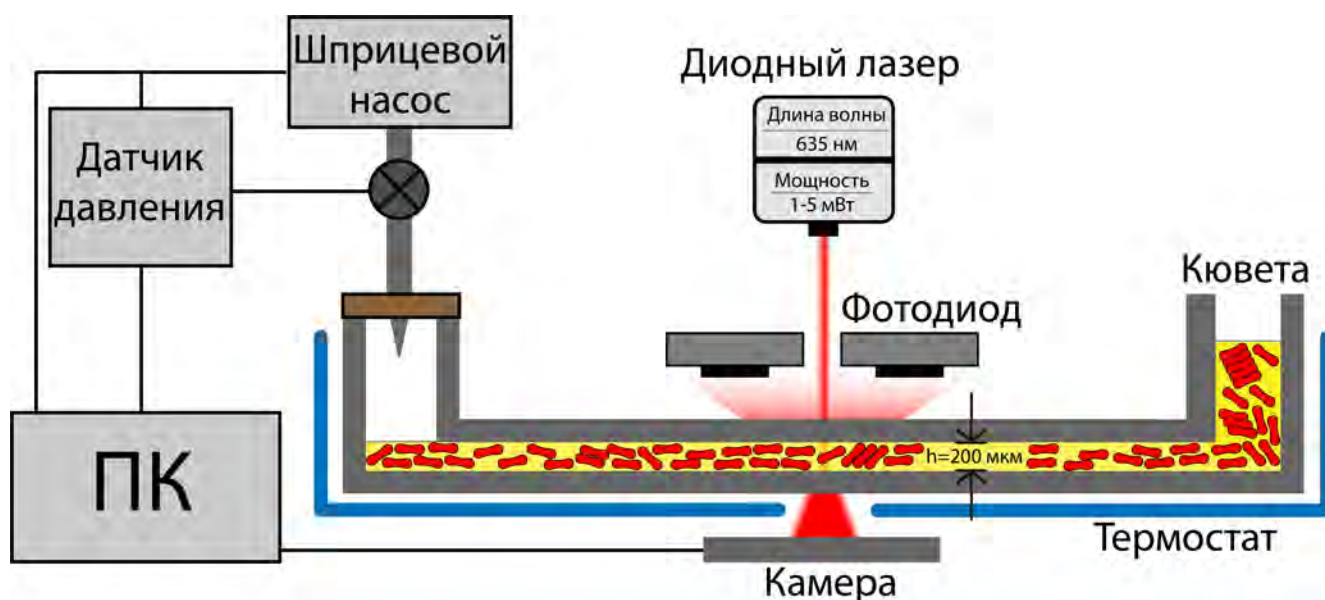


Рис. 18: Схема части прибора RheoScan для измерения агрегационных и деформационных параметров крови с использованием «большой» кюветы. Для измерения АЭ детектируется обратное рассеяние света от суспензии эритроцитов, на которые действуют изменяющиеся во времени сдвиговые напряжения. Для измерения ДЭ регистрируются дифракционные картины при разных сдвиговых напряжениях.

вится уменьшение интенсивности света, рассеянного назад. Экстремум функции зависимости интенсивности света, рассеянного назад, от времени характеризует тот момент T_{crit} , когда скорости процессов агрегации и дезагрегации равны (см. рис.19а). Сдвиговое напряжение, соответствующее этому экстремуму, называют критическим сдвиговым напряжением (*critical shear stress* — CSS). Оно характеризует гидродинамическую прочность агрегатов: чем больше параметр CSS , тем большие напряжения сдвига нужно приложить, чтобы разделить агрегаты на отдельные эритроциты. Измерения АЭ на «большой кювете» для одного пациента/донора проводятся последовательно 6-10 раз.

Измерение на «маленькой» кювете. В кювету с плоским резервуаром и металлическим стержнем помещается образец крови объемом 8 мкл. Далее кювета помещается в прибор с контролируемой температурой — 37 °С. Образец сверху освещается лазерным пучком красного цвета и детектируется свет, рассеянный вперед от эритроцитов и агрегатов. При помещении образца в измерительную ячейку прибора вся кровь имеет максимальную степень АЭ (большие агрегаты) и, следовательно, рассеивает падающее на неё излучение так, что интенсивность этого излучения, измеренная в направлении падающего пучка, максимальна (рис.19б). Далее тонкий металлический стержень, встроенный в кювету, под действием внеш-

него магнитного поля приводится во вращательное движение, создавая в кювете сдвиговые напряжения потока крови, которые разрушают образовавшиеся агрегаты до состояния полной дезагрегации (одиночные клетки) (момент времени $t = 0$ на рис.19б). После остановки перемешивания начинается процесс спонтанной агрегации эритроцитов (длительностью порядка 2 мин.), в течение которого измеряется кинетика интенсивности рассеянного вперед света. Прибор позволяет измерять индекс агрегации (AI), характеризующий количество клеток, проагрегировавших за первые 10 сек. в процентах. AI вычисляется как отношение площади под кривой, описывающей агрегационную кинетику, к суммарной над и под кривой за первые 10 сек. процесса спонтанной агрегации. Также прибор позволяет измерять характерное время АЭ ($T_{1/2}$), которое определяется, как время, которое необходимо, чтобы интенсивность рассеянного вперед света достигла половинного значения от максимального. Также кривая изменения интенсивности светорассеяния во времени на рис.19б отдельно аппроксимируется двумя экспонентами:

$$I(t) = I_{max} - A_1 \exp \frac{-t}{\tau_1} - A_2 \exp \frac{-t}{\tau_2} \quad (2.1)$$

с целью получения характерных времен АЭ τ_1 и τ_2 , а также предэкспонент: A_1 , A_2 .

Измерения АЭ на «маленькой кювете» для одного пациента/донора проводятся последовательно 4 раза.

Измеряемые параметры

Прибор RheoScan позволяет измерять следующие агрегационные характеристики крови на «маленькой кювете»:

- Индекс агрегации (AI) 10 сек. (%) — это отношение площади под кривой агрегатограммы за первые 10 сек. спонтанной АЭ к площади прямоугольника, верхняя граница которого соответствует максимальной интенсивности. Чем больше данный параметр, тем больше клеток проагрегировало за 10 сек. спонтанной АЭ.
- Характерное время АЭ ($T_{1/2}$) (сек.) — время, которое необходимо, чтобы интенсивность рассеянного вперед света достигла половинного значения от максимального. Чем меньше $T_{1/2}$, тем быстрее образуются эритроцитарные агрегаты.

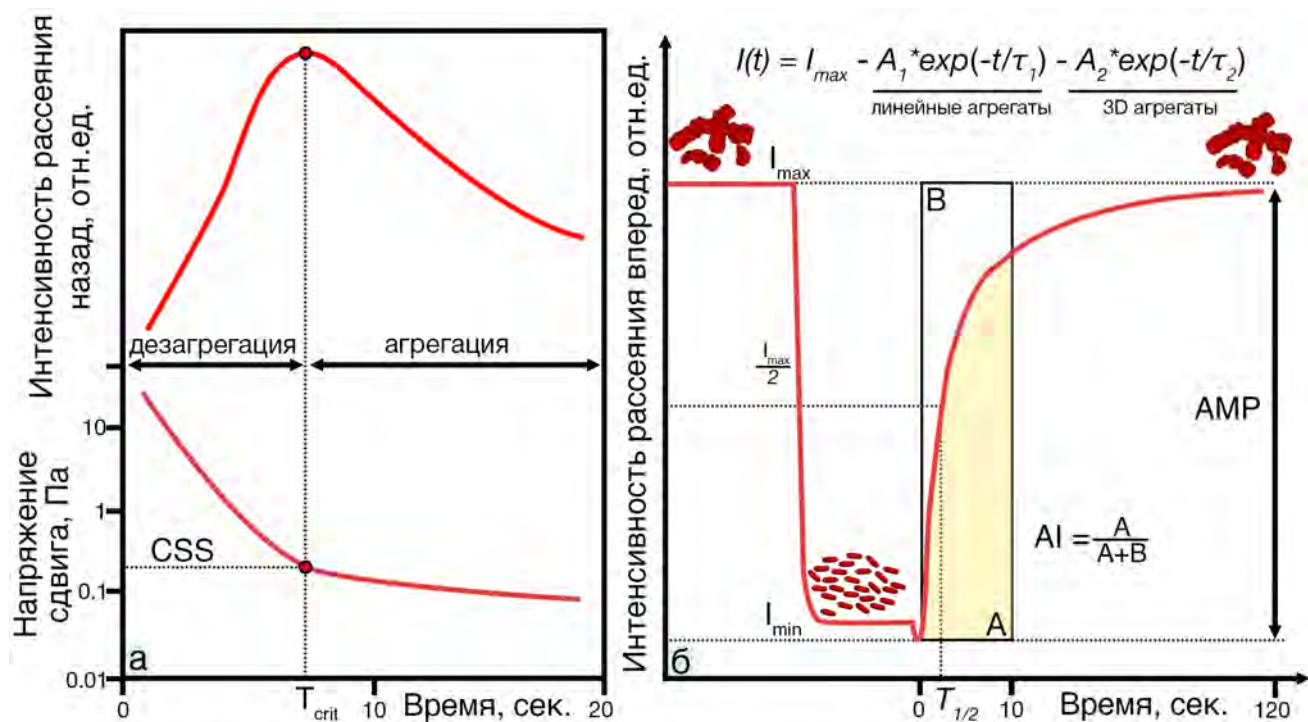


Рис. 19: (а) Измерение на «большой кювете». (внизу) Напряжение сдвига в микроканале как функция времени; (вверху) интенсивность рассеянного назад света от крови в микроканале как функция времени. (б) Измерение на «маленькой кювете». Интенсивность рассеянного света в прямом направлении ($I(t)$) от образца цельной крови в кювете как функция времени. $I(t)$ аппроксимируется двумя экспоненциальными функциями и рассчитываются параметры линейной АЭ (A_1, τ_1) и 3D АЭ (A_2, τ_2).

- Индекс M (отн.ед.) — это численная характеристика АЭ, равная площади под кривой агрегатограммы за первые 10 сек. спонтанной АЭ, т.е. площади A (см. рис.19б). Данный параметр идентичен AI , однако его значение зависит от гематокрита и др.
- Параметр AMP (отн.ед.) — численная разница между интенсивностью рассеяния полностью проагрегировавшего образца крови и дезагрегированного образца крови. Чем выше параметр AMP , тем больше различаются состояния агрегированной и дезагрегированной крови.

Прибор RheoScan позволяет измерять следующие агрегационные характеристики крови на «большой кювете»:

- Параметр CSS (мПа) характеризует гидродинамическую прочность эритроцитарных агрегатов. Чем больше данный параметр, тем большие сдвиговые напряжения необходимо приложить, чтобы разделить агрегаты.

- Критическое время T_{crit} (сек.) — это время, за которое достигается равновесие процессов агрегации и дезагрегации эритроцитов. Зависит от вязкости суспензии.

Производя постобработку данных кривых светорассеяния, полученных для «маленькой кюветы», можно получить следующие параметры:

- Индекс агрегации (AI) X сек. (%) — это отношение площади под кривой агрегатограммы за первые X сек. спонтанной АЭ к площади прямоугольника, верхняя граница которого соответствует максимальной интенсивности. Чем больше данный параметр, тем больше клеток проагрегировало за X сек. спонтанной АЭ. Можно получить индексы агрегации для разных времен.
- Характерное время образования линейных агрегатов (τ_1) (сек.) — характерный показатель быстрой экспоненты в уравнении 2.1. Характеризует время образования линейных агрегатов.
- Характерное время образования 3D агрегатов (τ_2) (сек.) — характерный показатель медленной экспоненты в уравнении 2.1. Характеризует время образования линейных агрегатов.
- Параметр суммарного вклада линейных агрегатов в светорассеяние A_1 (отн. ед.) — это параметр аппроксимации, который характеризует разность светорассеяния между 2 абстрактными состояниями крови: полная дезагрегация и состояние с полностью сформировавшимися линейными агрегатами. Так как $AMP = A_1 + A_2$, то данный параметр дополнительно можно рассматривать в процентном соотношении: $A_1(\%) = \frac{A_1}{AMP} \times 100\%$. Другими словами, параметр A_1 характеризует степень выраженности линейной АЭ в крови.
- Параметр суммарного вклада 3D агрегатов в светорассеяние A_2 (отн. ед.) — это параметр аппроксимации, который характеризует разность светорассеяния между 2 абстрактными состояниями крови: состояние с полностью сформировавшимися линейными агрегатами и с полностью сформировавшимися 3D агрегатами. Так как $AMP = A_1 + A_2$, то данный параметр дополнительно можно рассматривать в процентном соотношении: $A_2(\%) = \frac{A_2}{AMP} \times 100\%$. Другими словами, параметр A_2 характеризует степень выраженности 3D АЭ в крови.

2.2.2 Лазерная эктацитометрия эритроцитов

Принципиальная схема установки

Для измерения деформационных параметров эритроцитов использовался эктацитометр, который реализован в приборе RheoScan AnD-300 (RheoMedTekh, Южная Корея) [138]. Параметры ДЭ на этом приборе измеряются с использованием типа кюветы RSD-K01 (в дальнейшем «большой») (см. рис.18). С помощью шприцевого насоса возможно создавать пониженное давление в левом резервуаре, что является причиной течения крови из правого резервуара в левый через соединяющий их канал (200 мкм). Сверху кювета освещается красным диодным лазером, и после кюветы с помощью видеокамеры детектируется картина дифракции от сильно разбавленного образца крови.

Протокол измерения

Для приготовления образца цельная кровь (10 мкл) добавляется в 0,5 мл 5,5% раствора поливинилпироллидона (PVP) (вязкость PVP = 35 мПа*сек. при 37 °С), далее образец перемешивается и помещается в кювету. Далее кювета помещается в прибор с контролируемой температурой — 37 °С. Шприцевой насос создает разность давлений между двумя резервуарами (см. рис.18), что создает сдвиговые напряжения в канале и эритроциты начинают деформироваться. Картина дифракции от разбавленной суспензии эритроцитов также начинает вытягиваться в перпендикулярном направлении и по мере уменьшения разности давления (см. снизу на рис.20а) она из эллипса становится кругом (см. сверху на рис.20а). После измерения рассчитывается индекс деформируемости DI при разных сдвиговых напряжениях по картине дифракции, на которой выделяется линия интенсивности на определенном уровне. Картина дифракции аппроксимируется эллипсом и DI вычисляется по формуле:

$$DI = \frac{A - B}{A + B}, \quad (2.2)$$

где A и B – большая и малая полуось эллипса (см. сверху на рис.20а). Далее строятся графики зависимости DI от приложенных сдвиговых напряжений. В качестве анализируемых параметров обычно берутся DI при 3 и 20 Па.

Дополнительно зависимость между DI и напряжением сдвига в полулогарифмическом масштабе можно аппроксимировать с помощью линейной регрессии, что позволяет рассчитать 2 параметра: предел текучести и вязкость внутрикле-

точного содержимого эритроцита, или внутренней вязкости эритроцитов (ВВЭ). Определение этих параметров описано в статье Фирсова, Приезжева, Климова и Тюрина⁴ [193]. ВВЭ характеризуется наклоном графика зависимости DI от логарифма напряжения сдвига, а предел текучести определяется по пересечению DI с осью X (см. рис.20б). Предел текучести представляет собой минимальное напряжение сдвига, необходимое для ДЭ, а ВВЭ соответствует вязкости внутриклеточного содержимого эритроцитов.

Измерения ДЭ для одного пациента/донора проводятся от 1 до 3 раз.

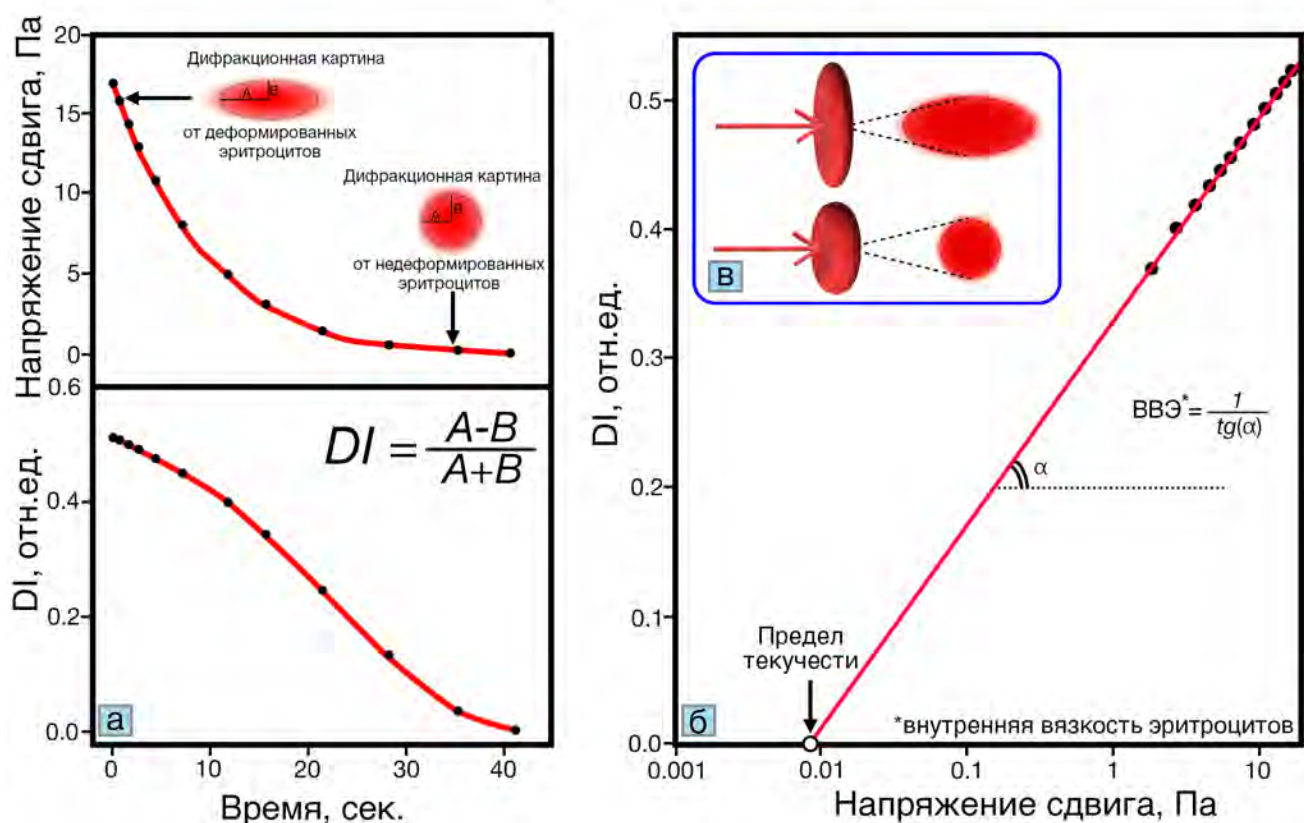


Рис. 20: (а) (внизу) Сдвиговое напряжение и индекс деформируемости (DI) как функция времени (DI соответствует относительному удлинению эритроцитов); (вверху) зависимость давления между двумя резервуарами кюветы от времени. (б) Зависимость DI от напряжения сдвига в полулогарифмических осях. α – угол наклона кривой. (в) Схематичная картина дифракции от деформированного и недеформированного эритроцита.

Измеряемые параметры

Прибор RheoScan позволяет измерять следующие деформационные характеристики крови:

⁴Данная статья есть также и на русском, однако текст статьи довольно сложно найти в интернете: Н. Н. Фирсов, А. В. Приезжев, Н. В. Климова, А. Ю. Тюрина. Основные закономерности деформационного поведения эритроцитов в сдвиговом потоке // Инженерно-физический журнал. том 79, №1. с. 114.

- Индекс деформируемости DI (отн.ед.) — это характеристика вытянутости эритроцитов в сдвиговом потоке по дифракционной картине, которая вычисляется по формуле 2.2. DI вычисляется на разных сдвиговых напряжениях – в обработке участвуют DI , вычисленные при 3 и 20 Па. Чем выше по значению DI , тем более вытянуты эритроциты.

Можно получить следующие параметры при постобработке полученных данных:

- Предел текучести (Па) — минимальное сдвиговое напряжение, которое необходимо приложить, чтобы начать деформировать эритроциты. Характеризует эластичность мембраны эритроцита.
- Внутренняя вязкость эритроцитов (ВВЭ) (отн.ед.) — это характеристика внутренней вязкости эритроцитов, выраженная в относительных единицах.

2.2.3 Оптическая турбидиметрия и ФСП-метод

Принципиальная схема установки

Турбидиметрический метод Борна и метод, основанный на измерении среднего размера агрегатов по флуктуациям светопропускания (ФСП) реализован в лазерном агрегометре тромбоцитов Алат-2 модели LA-230-2 (НПФ Биола, Россия) [194]. В данном лазерном агрегометре наряду с обычной агрегометрией (измерения по методу Борна [140]), реализован метод мониторинга размера агрегатов, основанный на флуктуациях светопропускания [195], который используется для оценки относительных размеров агрегатов при низкой концентрации активатора тромбоцитов. Прибор позволяет также измерять концентрацию тромбоцитов в плазме крови и их фактор формы (степень дискоидности).

Принципиальная схема установки представлена на рис.21. Лазерный пучок с длиной волны 785 нм освещает кювету, в которую помещена обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП). Позади кюветы находится фотодиод, который измеряет сигнал коллимированного пропускания света. Сигнал с фотодиода пропускается через фильтр низких частот (измерение по Борну) и через фильтр высоких частот (измерения по флуктуациям).

Протокол измерения

Агрегометр Алат-2 LA-230-2 позволяет исследовать АТ при их активации

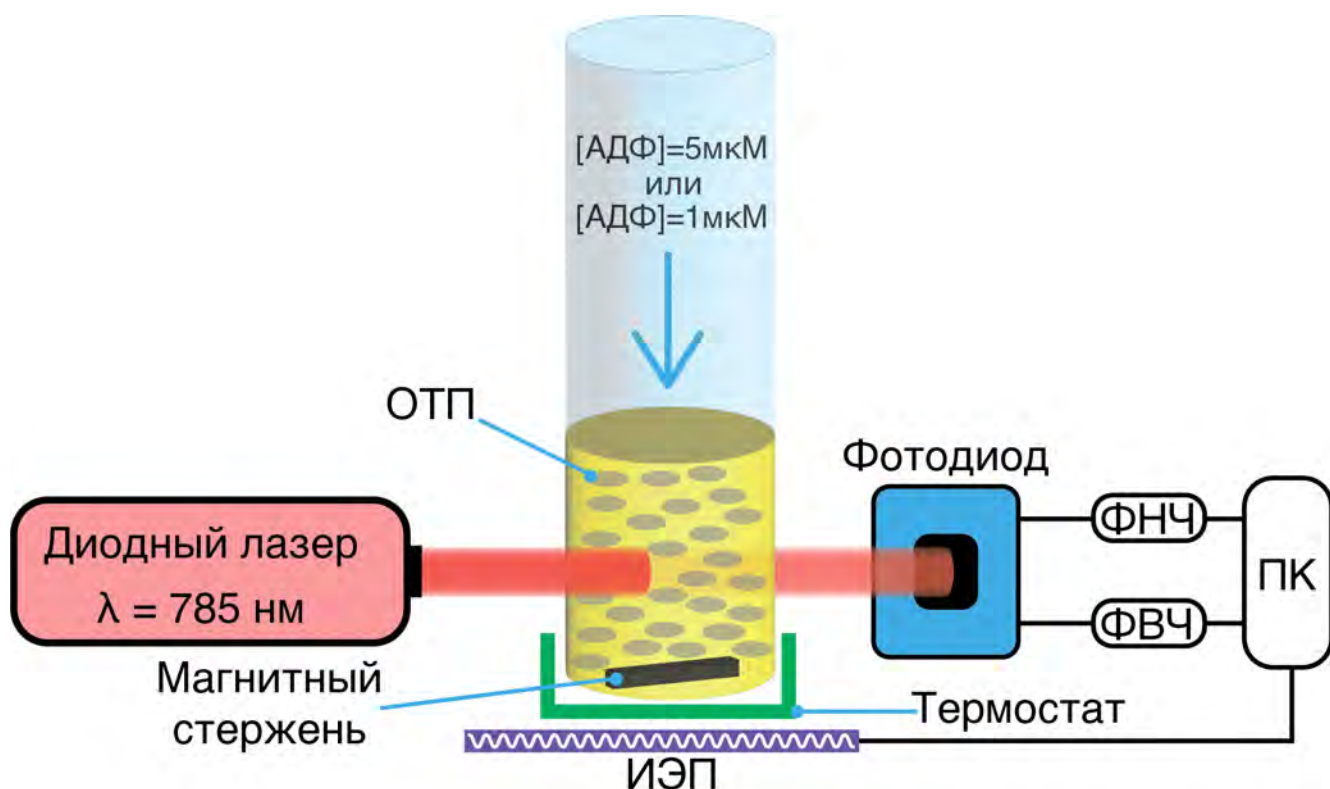


Рис. 21: Принципиальная схема тромбоцитарного агрегометра Алат-2 модели LA-230-2. ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма. ФНЧ и ФВЧ – фильтр низких и высоких частот соответственно. ИЭП – источник электромагнитного поля.

различными индукторами. В данной работе измерения АТ проводились с использованием индуктора АТ аденозиндифосфата (АДФ).

При повреждении стенки кровеносного сосуда тромбоциты активируются коллагеном и тромбином, что запускает каскад АТ и инициирует гемостаз. Тромбоциты выделяют ауторегуляторные агонисты, такие как АДФ, которые активируют соседние покоящиеся тромбоциты и тем самым вызывают АТ. Среди всех агонистов АДФ-индуцированная АТ привлекает особое внимание исследователей и клиницистов благодаря участию двух типов тромбоцитарных АДФ-рецепторов: высокоаффинных P2Y₁ и низкоаффинных P2Y₁₂ - в АДФ-опосредованной АТ [196].

Измерения проводились на ОТП, которая получалась следующим образом: цельную кровь помещали в эппендорфы по 2 мл и центрифугировали в течение 7 мин. при 1700 об/мин (200 g). Далее верхний слой плазмы с тромбоцитами отделялся в отдельный эппендорф. После центрифугирования и перед измерениями необходимо было ожидание 30 мин., поскольку сразу после центрифугирования активация тромбоцитов может быть ниже. Далее ОТП в объеме 300 мкл помещали

в цилиндрическую кювету, которая ставилась в термостат прибора (температура 37 °С) на 3 мин. перед измерением. Активация тромбоцитов производилась путем добавления 15 мкл индуктора агрегации АДФ в концентрациях 1 или 5 мкМ⁵. С помощью источника электромагнитного поля магнитный стержень вращался, способствуя перемешиванию образца плазмы с тромбоцитами в течение всего измерения. Скорость перемешивания составлялась 800 об/мин.

На рис.22 представлены характерные кривые, получаемые в ходе эксперимента 2-мя методами. На рис.22а представлена зависимость интенсивности света, рассеянного вперед, от времени для суспензии активированных тромбоцитов. Измеряемая интенсивность нормирована в %: 0% – светопропускание ОТП перед добавлением индуктора АТ, 100% – светопропускание воды. Индуктор агрегации АДФ добавляется на 10-ой сек. после начала измерения. Поскольку в процессе при АТ образуются агрегаты всё больших размеров, то интенсивность света, рассеянного вперед будет увеличиваться. Уменьшение интенсивности светопропускания сразу после добавления АДФ связано с изменением формы тромбоцитов при их активации. На рис.22б представлена зависимость среднего размера агрегатов от времени, измеренная с помощью метода флуктуаций.

Измерение кинетики АТ производится в течение 5 мин. и одновременно для одной концентрации проводятся измерения по Борну и по флуктуациям. Однако в обработке результатов учитываются измерения по Борну (рис.22а) только для концентрации АДФ 5 мкМ, тогда как для метода флуктуаций — АДФ 1 мкМ (рис.22б). Это связано с применимостью методов при разных концентрациях индуктора АТ.

После измерения каждая полученная кинетика АТ характеризуется двумя параметрами: (1) максимальным значением светопропускания (или среднего размера агрегатов) и (2) максимальным наклоном кривой светопропускания (или среднего размера агрегатов) в течение первых 5 мин.

Измерения кинетики АТ для одного образца при одной концентрации АДФ проводятся только один раз.

Измеряемые параметры

Параметры АТ по кривой светопропускания (рис.22а):

- Степень агрегации (%) — это максимальное значение светопропускания по-

⁵Конечные концентрации АДФ в 315 мкл раствора ОТП+АДФ. Концентрации добавляемых растворов 10,5 и 105 мкМ соответственно.

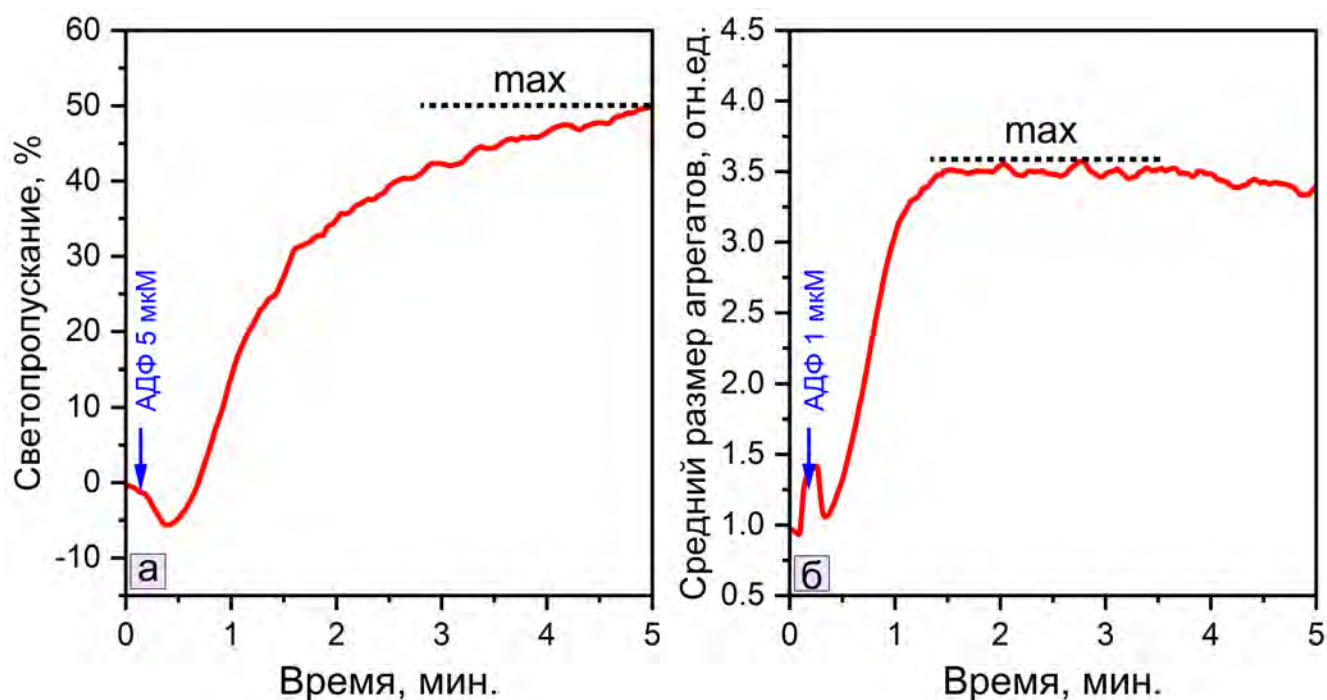


Рис. 22: (а) Зависимость интенсивности света, рассеянного вперед, от времени для ОТП при добавлении АДФ в концентрации 5 мкМ и (б) зависимость среднего размера агрегатов тромбоцитов от времени для ОТП при добавлении АДФ в концентрации 1 мкМ.

сле начала АТ при добавлении АДФ в концентрации 5 мкМ относительно воды и ОТП перед добавлением АДФ.

- Скорость агрегации (%/мин.) — это максимальный наклон кривой светопропускания после начала АТ при добавлении АДФ в концентрации 5 мкМ относительно воды и ОТП перед добавлением АДФ.

Параметры АТ по кривой среднего размера агрегатов (рис.22б):

- Максимальный размер агрегатов (отн.ед.) — это максимальное значение среднего размера агрегатов после начала АТ при добавлении АДФ в концентрации 1 мкМ.
- Максимальная скорость образования агрегатов (отн.ед./мин.) — это максимальный наклон кривой среднего размера агрегатов после начала АТ при добавлении АДФ в концентрации 1 мкМ.

Дополнительно⁶ измеряемые параметры на агрегометре Алат-2 LA-230-2:

⁶В данной модели агрегометра также можно было измерять фактор Виллебранда с использованием ристоцетина. Однако в данной диссертации измерений с ристоцетином произведено не было.

- Концентрация тромбоцитов (тыс./мкл).
- Фактор формы тромбоцитов (%) — это степень дискоидности тромбоцитов.

2.2.4 Лазерный пинцет

Принципиальная схема двухканального лазерного пинцета

Двухканальный лазерный пинцет (ЛП) использовался как для захвата двух эритроцитов и исследования их агрегационных свойств, так и для измерения сил адгезии эритроцитов к монослою сосудистого эндотелия. Схема установки приведена на рис.23. Основными её элементами являются диодный лазер Nd:YAG ($\lambda = 1064$ нм, 1 Вт), водно-иммерсионный объектив OLYMPUS с высокой числовой апертурой ($NA = 1,00$) и 100-кратным увеличением. Расстояния между поворотным зеркалом, поляризационным кубом, телескопом, дихроичным зеркалом и объективом на рис.23 должны подчиняться правилу сопряженных плоскостей [197].

Видео-изображения взаимодействующих эритроцитов во время каждого измерения записываются на CMOS камеру DCC1645C (Thorlabs). В установке изначальный лазерный пучок с помощью поляризационного куба делится на два, мощности которых изменяются с помощью поляризаторов (пластинок $\lambda/2$). Один из лазерных пучков является неподвижным, а другой подвижным, благодаря поворотному зеркалу, что позволяет целенаправленно манипулировать захваченными эритроцитами. Мощность лазера устанавливается на уровне примерно 750 мВт, при этом большая часть мощности теряется на оптических элементах — основные потери излучения происходят на объективе. Мощность светового пучка в перетяжке одной оптической ловушки составляет порядка 30 мВт. Небольшая часть мощности для основного пучка проходит сквозь дихроичное зеркало на фотодетектор, что необходимо для калибровки ЛП.

Протокол измерения на лазерном пинцете

При измерениях с эндотелием использовалась кровь, стабилизированная гепарином лития, а без эндотелия — ЭДТА КЗ⁷. Цельную кровь сначала центри-

⁷Ольгой Николаевной Шегловитовой был проведен МТТ тест, который показал, что плазма, выделенная из цельной крови, стабилизированной гепарином лития не является токсичной для эндотелия, а в случае плазмы с ЭДТА КЗ наблюдалась выраженная токсичность.

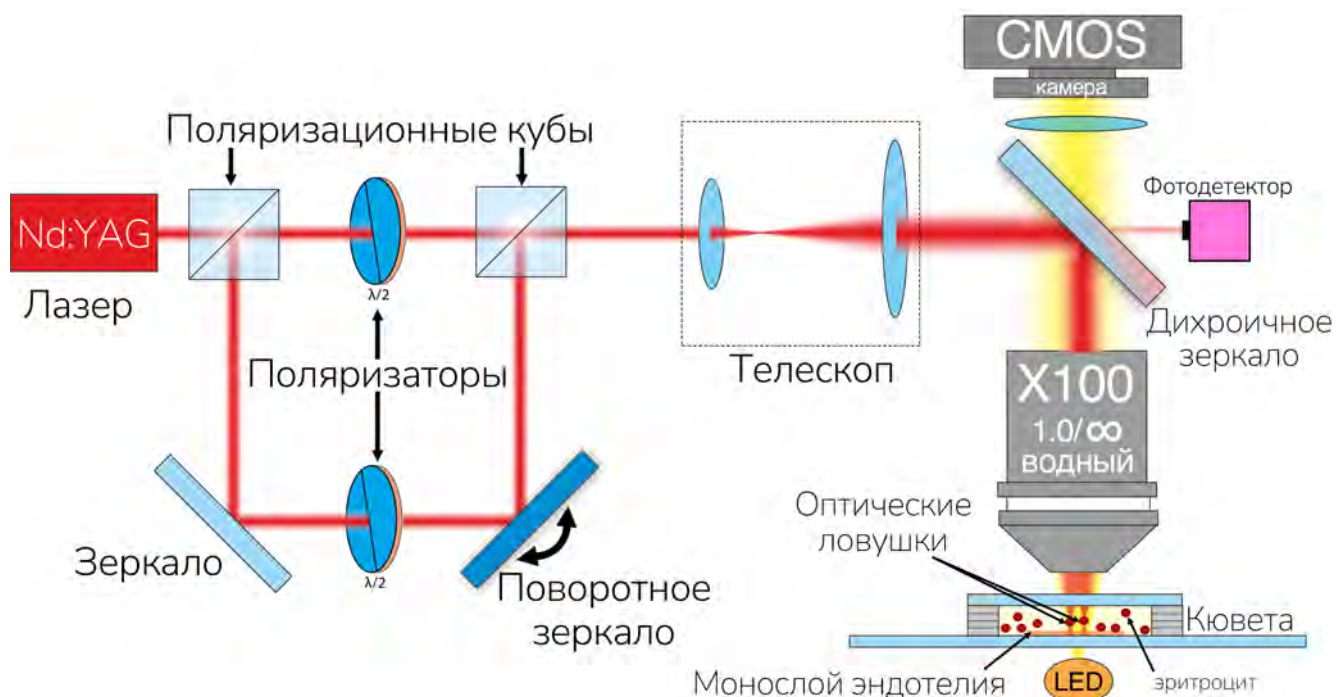


Рис. 23: Упрощенная схема двухканального лазерного пинцета. Изначальный лазерный пучок делится на два пучка, которые используются при захвате эритроцитов. Кювета находится на 3D столике, который позволяет перемещаться относительно статичной видео-камеры в разные области кюветы. См. описание в тексте.

фугировали при 170 g в течение 10 мин. для разделения эритроцитарной массы и плазмы с тромбоцитами, и далее плазму с тромбоцитами центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин. для осаждения тромбоцитов. Эндотелий хранится в среде CO_2 в эксикаторе, который помещен в термостат (37 °C). Для приготовления образца крови к плазме без тромбоцитов добавлялись дополнительные вещества (к примеру, L-аргинин) в соотношении 9:1, и далее добавилась небольшая часть крови так, что конечный гематокрит составлял 0,1%.

Кювета для образца крови создается на основе двухстороннего скотча, предметного и покровного стекла (см. рис.23). Кювета для измерения эндотелия отличается от таковой без эндотелия количеством полосок двухстороннего скотча. Так, кювета для эндотелия создается следующим путем: на предметное стекло помещают по 4 полоски двухстороннего скотча, и в зазор между ними помещают стеклышко с монослоем эндотелия. Далее на эндотелий незамедлительно помещается образец крови, и сверху накладывается покровное стекло. Далее объем кюветы полностью заполняется образцом крови с помощью дозатора. Для кюветы без эндотелия на предметное стекло наносится по 2 полоски двухстороннего скотча. Стыки кюветы изолируются от воздуха с помощью вазелина.

После помещения кюветы с эритроцитами под объектив, настройки фокуса объектива и поиска двух одиночных эритроцитов осуществлялись их поочередный захват двумя оптической ловушками и непосредственно сами измерения. Для количественной оценки сил адгезии эритроцитов к эндотелию, одиночный эритроцит захватывается в неподвижную оптическую ловушку, а подвижная ловушка перекрывается. В экспериментах с ЛП в общем случае измеряется 4 разных параметра: время АЭ, сила агрегации, сила дезагрегации [198] и сила взаимодействия эритроцита и эндотелия [199]. Однако в большинстве экспериментов одновременное измерение 4 параметров сильно обременительно по времени, так как продолжительность работы с одним образцом не должна превышать 1 часа. Измерения сил происходят следующим образом (см. рис.24):

- Время агрегации — мощность неподвижной и подвижной оптических ловушек поднимается до максимума. Захватываются два эритроцита (рис.24а1), с помощью подвижной ловушки приближаются друг к другу и коллинеарно перекрываются поверхностями до минимально возможного контакта (рис.24а2). Далее оптические ловушки перекрываются и измеряется время спонтанной парной АЭ (рис.24а(3-4)). Время агрегации можно оценивать (I) эмпирически (вручную определять моменты начала и конца АЭ) или (II) программно (зависимость крайних точек эритроцитов l от времени аппроксимируется функцией $l(t) = l_0 - A \times \exp(-\frac{t}{\tau})$. Тем самым время агрегации будет равняться τ).
- Сила агрегации — мощность неподвижной и подвижной оптических ловушек повышается до максимума (30 мВт). Захватываются два эритроцита (рис.24б1), с помощью подвижной ловушки приближаются друг к другу и перекрываются поверхностями примерно на 40% (рис.24б2). Далее сила захвата монотонно уменьшается (рис.24б3), пока эта сила не сможет воспрепятствовать силе спонтанной АЭ (рис.24б4). Измерения на одном образце повторяются 5 раз с разными эритроцитами в разных частях кюветы. Если при измерении сила сильно отличалась от измеренных ранее, то измерение повторялось на новой паре эритроцитов.
- Сила дезагрегации — мощность неподвижной и подвижной оптической ловушки поднимается до максимума (30 мВт). Захватываются два эритроцита (рис.24в1), с помощью подвижной ловушки приближаются друг к другу и перекрываются поверхностями примерно на 40% (рис.24в2). Подвижная оп-

тическая ловушка перемещается таким образом, чтобы разделить клетки, но не разделяет их до конца (рис.24в3). Если разделение почти полное, то два эритроцита возвращают в начальное положение (рис.24в2), сила захвата монотонно уменьшается, и заново происходит попытка разделить клетки. Если она успешна, то шаги повторяются до тех пор, пока силы захвата будет недостаточно, чтобы предотвратить спонтанную АЭ (рис.24в4). Измерения на одном образце повторяются 5 раз с разными эритроцитами в разных частях кюветы. Если при измерении сила сильно отличалась от измеренных ранее, то измерение повторялось на новой паре эритроцитов.

- Сила взаимодействия между эритроцитом и эндотелием — мощность захвата опускается до минимума. Далее ищется эритроцит, который находится на монослое эндотелия. С помощью 3D столика неподвижная оптическая ловушка помещается ровно на эритроцит, и далее идет постепенное увеличение мощности оптического излучения (т.е. увеличение силы захвата). Фиксируется та величина силы, при которой эритроцит захватывается в оптическую ловушку, и свободно может перемещаться по монослою эндотелия. Измерения на одном образце повторяются 6-7 раз с разными эритроцитами в разных частях кюветы. Если при измерении сила сильно отличалась от измеренных ранее, то измерение повторяется на новом эритроците.

Калибровка лазерного пинцета

Для измерения сил с помощью ЛП необходима его калибровка: необходимо найти коэффициент пропорциональности между мощностью лазерного пучка и силой захвата — в простейшем случае коэффициент пропорциональности Q в уравнении 1.17. Существует множество методов калибровки оптической ловушки [197, 200], в том числе при использовании машинного обучения [201]. Важно отметить, что оптическая сила со стороны пучка появляется при отклонении частицы в оптической ловушке от положения равновесия. При малом отклонении потенциал, создаваемый оптической ловушкой близок к гармоническому, так что $F_{\text{захвата}} = k\Delta x$, где $\Delta x = x - x_0$ — это отклонение от положения равновесия, а k — коэффициент жесткости оптической ловушки. На рис.25 приведены зависимости силы и потенциала для сферической частицы в оптической ловушке от смещения частицы относительно положения равновесия.

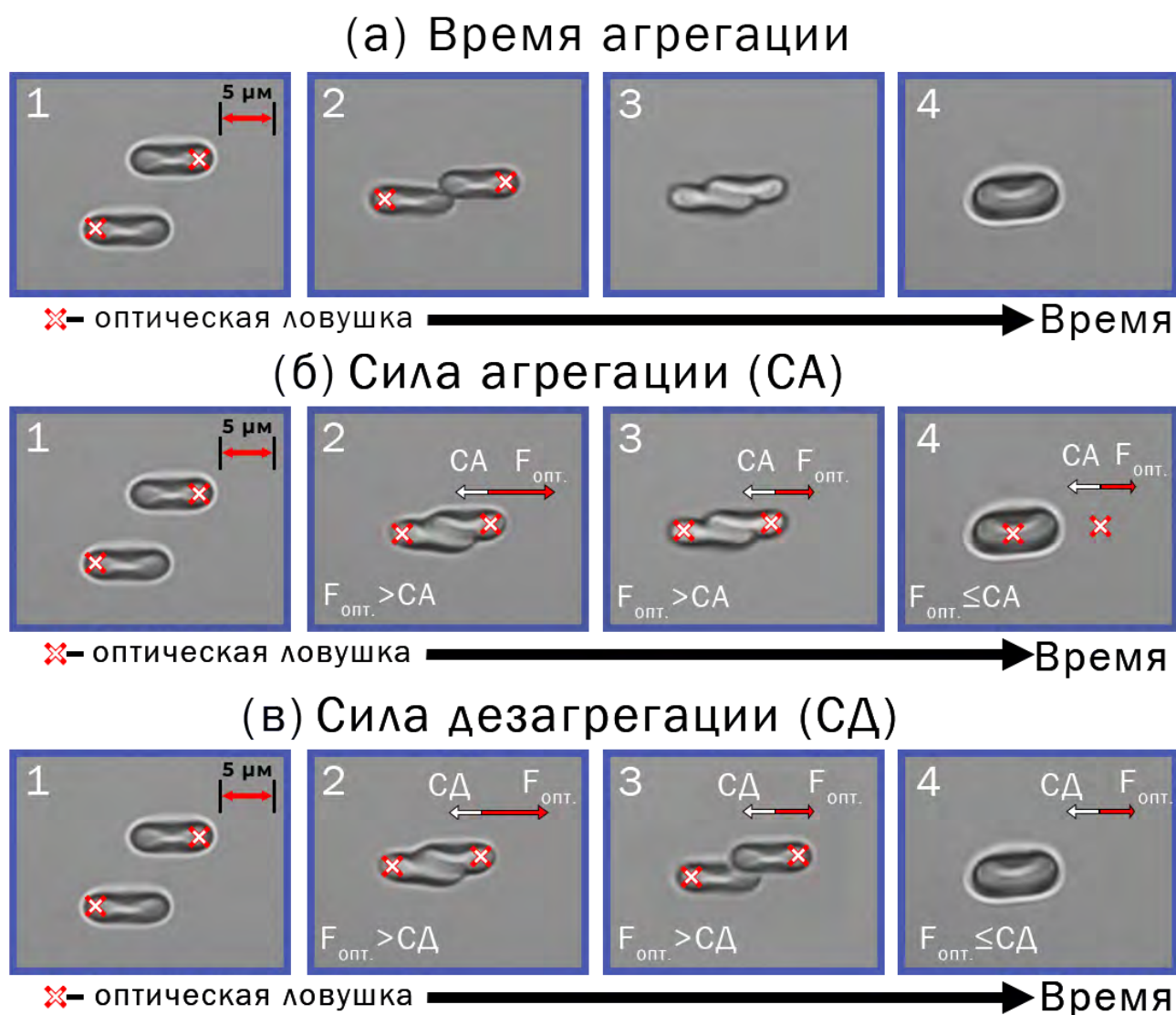


Рис. 24: Фотоиллюстрация процессов измерения (а) времени парной АЭ, (б) силы агрегации (СА) и (в) силы дезагрегации (СД). $F_{\text{опт.}}$ — сила оптического захвата эритроцита.

В данной работе использовалась только калибровка по силе Стокса, которая основана на сопоставлении сил вязкого трения, действующих на частицу, движущуюся в потоке, с силой оптического захвата [203]. Причем калибровка заключалась в нахождении максимальной силы захвата при определенной мощности (см. максимальные значения сил на рис.25а). Калибровка осуществлялась следующим способом:

1. Фиксируется определенное значение мощности лазерного пучка, падающего на эритроцит.
2. Один эритроцит захватывается в одну оптическую ловушку и с помощью 3D столика немного поднимался над поверхностью (10-15 мкм).

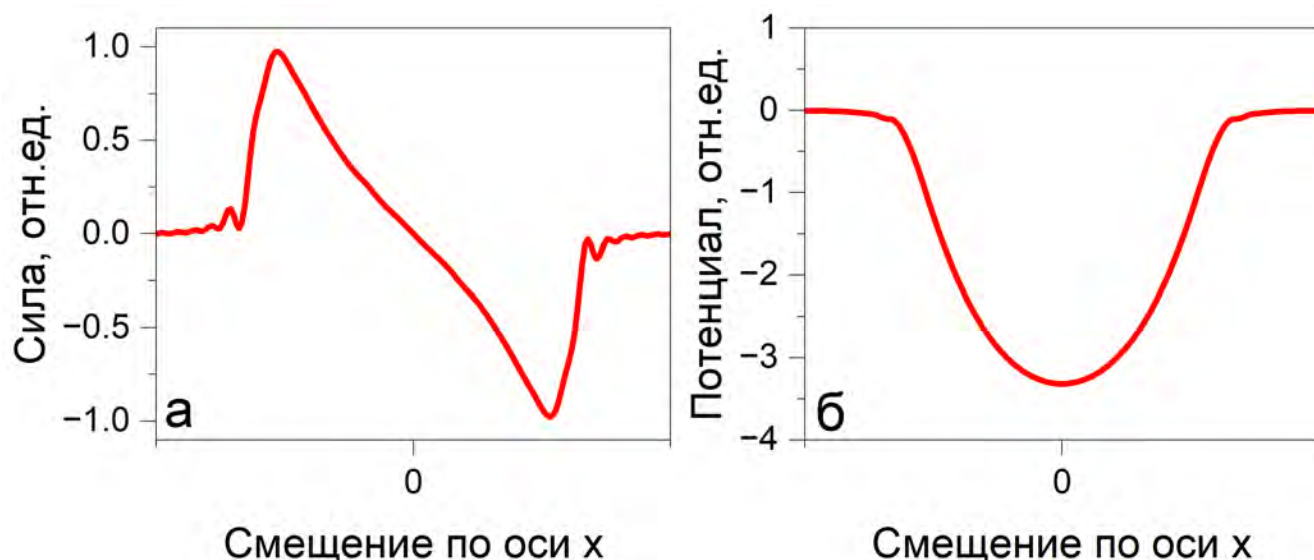


Рис. 25: Типичный профиль (а) силы и (б) потенциала для сферической частицы в оптической ловушке при её смещении из положения равновесия в направлении, перпендикулярном направлению распространения лазерного пучка (к примеру, ось x на рис.15). Профили рассчитаны автором диссертации в программе Optical Tweezers Toolbox [202].

3. 3D столик с помощью контроллера начинает двигаться с постоянным небольшим ускорением (1-4 мкм/с²).
4. Сила вязкого трения увеличивается с увеличением скорости, и в определенный момент эритроцит выпадает из оптической ловушки.
5. Фиксируется значение скорости, при которой силы вязкого трения оказались больше силы захвата.

Тем самым, в момент выпадания эритроцита из оптической ловушки считается, что сила вязкого трения равняется силе оптического захвата [163]. Для оценки силы вязкого трения используется закон Стокса для частиц эллипсоидальной формы — т.е. форма эритроцита аппроксимируется сплюснутым эллипсоидом, большая и малая ось которого равняется a и b :

$$\vec{F} = -6K\pi\eta a\vec{v}, \quad (2.3)$$

где K — коэффициент (фактор) формы для эллипсоида вращения, η — коэффициент динамической вязкости среды, v — скорость частицы в потоке жидкости. Для коэффициента K существует аналитическое решение, которое при движении

эллипсоида в направлении большей его оси равняется [204]^{8,9}:

$$K = \frac{\frac{8}{3}(\alpha^2 - 1)}{\frac{\alpha(3\alpha^2 - 2)}{(\alpha^2 - 1)^{1/2}} \operatorname{arctg}[(\alpha^2 - 1)^{\frac{1}{2}}] - \alpha} \quad (\alpha = \frac{a}{b}). \quad (2.4)$$

В Приложении 2. Численный расчет силы Стокса для эритроцита описано продолжение работы, начатой в бакалаврской работе автора диссертации [206] по численному моделированию эритроцита в потоке жидкости для валидации использования модифицированного закона Стокса.

Важно заметить, что во многих публикациях и работах при аппроксимации эритроцита сфероидом вращения авторы приводят коэффициент K для вытянутого сфероида [207], тогда как более правильно использовать коэффициент для сплюснутого сфероида, который приведен выше. Однако это почти никак не должно влиять при сравнении сил от разных образцов.

Иногда в формулу 2.3 добавляют дополнительный фактор, учитывающий близость поверхности кюветы при перемещении эритроцита, так как в этом случае возрастает сдвиговое напряжение и сила вязкого трения увеличивается. Таким образом, закон Стокса дополняется ещё одним членом β :

$$\vec{F} = -6K\beta\pi\eta a\vec{v}, \quad (2.5)$$

где коэффициент β равен [203]:

$$\beta = \frac{1}{1 - \frac{9}{16}(\frac{a}{h}) + \frac{1}{8}(\frac{a}{h})^3 - \frac{45}{256}(\frac{a}{h})^4 - \frac{1}{16}(\frac{a}{h})^5}, \quad (2.6)$$

где a – характерные размеры захватываемого объекта, h – расстояние от захватываемого объекта до поверхности.

В данной работе близость к покровному стеклу при калибровке никак не учитывалась, т.е. считалось, что $\beta = 1$.

Валидация метода измерения сил взаимодействия между эритроцитом и эндотелием

⁸Однако коэффициент K для калибровки в данной работе был рассчитан по немного измененной формуле, где вместо $\operatorname{arctg}[(\alpha^2 - 1)^{\frac{1}{2}}]$ фигурирует $\ln[(\alpha^2 - 1)^{\frac{1}{2}} + \alpha]$. Данное допущение было сделано намеренно с целью сравнения полученных данных со старыми результатами. См. магистерскую работу автора диссертации в [205].

⁹При экспериментальной обработке данных калибровки вместо полуоси эллипсоида a использовалось значение большей оси $2 \times a$ для удобства. Соответственно, коэффициент K был в 2 раза меньше.

При внимательном рассмотрении метода измерения силы между эритроцитом и эндотелием (см. раздел *Протокол измерения на лазерном пинцете*) можно обнаружить кажущуюся несостоятельность метода: измерение силы происходит при эритроците, лежащем на дне кюветы, и по сути измеряется сила отрыва эритроцита от эндотелия, тогда как калибровка оптической ловушки происходит для развернутого эритроцита (см. рис.15). Заметим, что даже при несоответствии калибровки при расчете реальных сил адгезии, данное допущение не должно повлиять на относительное измерение сил для разных образцов.

Также важно учесть, что гравитационными силами, действующими на эритроцит можно пренебречь. К примеру, если взять средний объем эритроцита 100 фл [23], плотность плазмы 1025 кг/м^3 , и плотность эритроцита порядка 1100 кг/м^3 [205], то сумма гравитационной и архимедовой силы составляет менее 0,1 пН.

С помощью программного пакета для MatLab Optical Tweezers Toolbox [202] автором диссертации были рассчитаны максимальные силы оптического захвата ($\lambda = 1064 \text{ нм}$) для сплюснутого эллипсоида вращения¹⁰ ($n_{\text{среды}} = 1,3$, $n_{\text{эллипс.}} = 1,365$) с полуосями 2 и 1 мкм в двух положениях: плоскость с большей стороной лежит в плоскости кюветы (плоскость xy , положение I) и перпендикулярно плоскости кюветы (плоскость xz , положение II, как на рис.15). Результаты численного моделирования представлены в табл.2. Из таблицы видно, что максимальная оптическая сила при смещении оптической ловушки по оси x для положения I меньше почти на 20%. Применяя данную оценку для эритроцита, можно сделать вывод, что при перемещении его по эндотелию, оцениваемая сила завышена примерно на 20% относительно реальной. Также из табл.2 видно, что максимальная сила по оси z почти в 4 раза для положения I и 2 раза для положения II меньше силы по оси x . Однако в положении I на эллипсоид действует момент силы по оси y — рассчитанная сила «вращения» составляет порядка 5 отн.ед., что в 3 раза меньше, чем по оси x . Тем самым, можно дать оценку сверху минимально измеримой силы адгезии эритроцитов, которая не должна быть меньше нуля: Мин.оценка силы (пН) = $\frac{\text{Измеренная сила (пН)} \cdot 0,8}{3} - 0,1 \text{ (пН)}$, где 0,1 пН – оценка гравитационной силы. Исходя из данного подхода, силы адгезии, вычисленные по калибровке выше, должны быть больше 0,38 пН. Данное положение оказалось справедливым для всех измерений.

¹⁰Эллипсоид вращения моделировал эритроцит. Размеры были взяты из соображений производительности используемой ЭВМ.

Таблица 2: Результаты численного моделирования оптических сил, действующих на сплюснутый эллипсоид в разных положениях. Силы приведены в относительных единицах, поскольку ключевое значение имеет не их абсолютная величина, а отношение между силами в различных конфигурациях.

Сила	Положение I	Положение II
Макс. сила по оси x	13,8	17,4
Макс. сила по оси z	3,6	7,6
Сила по x / сила по z	3,8	2,3

Дополнительно проводились измерения *in vitro*, характеризующие движение эритроцита на монослое эндотелия и стекла под действием броуновских сил. Для 10 одиночных эритроцитов здорового донора на стекле и на эндотелии был вычислен коэффициент их диффузии по среднеквадратичному отклонению, который составил для эндотелия порядка 9×10^{-3} мкм²/сек., а для стекла — $8,5 \times 10^{-3}$ мкм²/сек. В то же время силы адгезии, измеренные с помощью оптического захвата, составили для эндотелия 0,8 пН, а для стекла — 1,1 пН. В связи с тем, что более высокий показатель диффузии соответствует меньшей силе между эритроцитом и подложкой, то полученные данные согласуются между собой.

Измеряемые параметры

С помощью используемого ЛП можно измерять следующие параметры:

- Время агрегации (сек.) — характерное время парной АЭ, можно измерять эмпирически или программно. В разделе результатов у каждого графика, где будет присутствовать этот параметр, будет дополнительно указано, как оно было измерено/вычислено.
- Сила агрегации (пН) — это минимальная сила, необходимая для предотвращения спонтанной агрегации двух отдельных эритроцитов.
- Сила дезагрегации (пН) — это минимальная сила, необходимая для разделения пары частично проагрегированных эритроцитов.
- Сила взаимодействия между эритроцитом и эндотелием (пН) — это минимальная сила, необходимая для захвата одного эритроцита, находящегося в покое на монослое эндотелия.

2.2.5 Цифровая капилляроскопия

Принципиальная схема установки

Для визуализации капилляров ногтевого ложа человека использовался цифровой капилляроскоп «Капилляроскан-1» («АЭТ», Россия), оснащенный высокоскоростной ПЗС-камерой TM-6740GE (JAI, Япония) с разрешением 640×480 пикселей и частотой съемки 100 кадров в сек. Подсветка ногтевого ложа осуществляется с помощью светодиодной системы освещения. Используется два варианта увеличения: 125-кратное и 400-кратное. 125-кратное увеличение применялось для получения панорамных изображений капиллярного русла. 400-кратное увеличение позволяло получать более детальные изображения циркулирующей в капиллярах крови, наличие или отсутствие эритроцитарных агрегатов и др.

Принципиальная схема установки капилляроскопа приведена на рис.26. Капилляроскоп оснащен камерой, 3D столиком для её перемещения во всех направлениях, системой подсветки, телескопом с изменяемым увеличением.

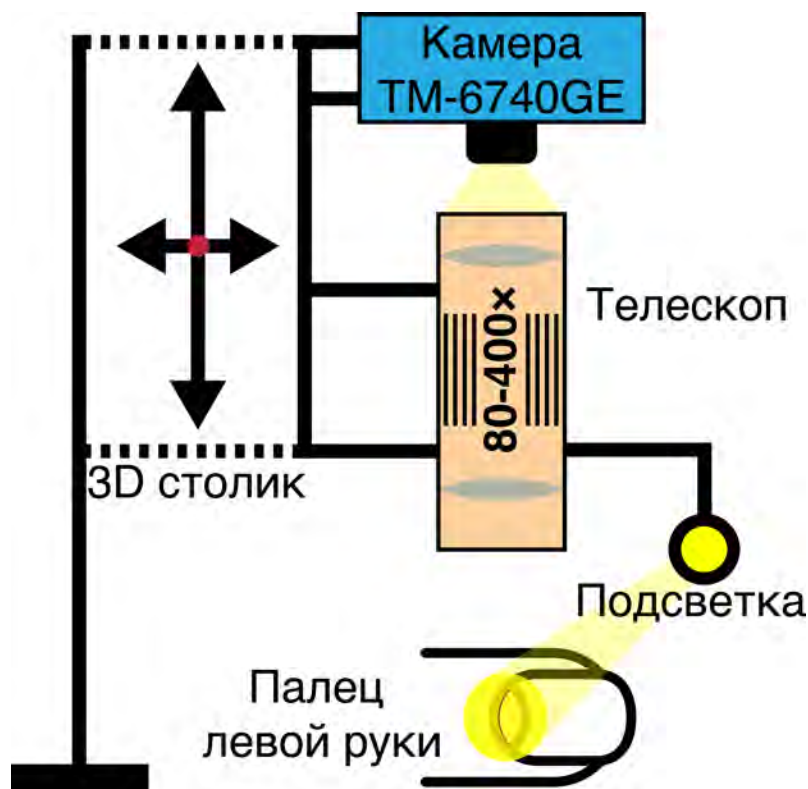


Рис. 26: Принципиальная схема капилляроскопа, оснащенного камерой, телескопом и подсветкой. 3D столик позволяет перемещать объектив во всех направлениях.

Протокол измерения

Исследование на капилляроскопе проводилось после 15–20 мин. отдыха паци-

ента или здорового добровольца в положении сидя в комнате с контролируемой температурой в районе 23 °С. Исследование проводилось на пальцах левой руки. В зависимости от видимости капилляров, измерения могли проводиться на нескольких пальцах, но предпочтение при измерениях отдавалось в следующем порядке: безымянный палец, средний палец, указательный палец, мизинец. При измерении палец помещался под объектив и на область эпонихия наносилось кедровое масло, которое выполняет роль просветляющего агента [208].

Температуру кожи измеряли с тыльной стороны средней фаланги пальца испытуемого с помощью бесконтактного термометра. Средняя температура пальцев всех испытуемых после 15-20 мин. отдыха составляла $33,2 \pm 1,7$ °С. Существенных различий в исследуемых группах найдено не было.

Экспериментатор в процессе измерения находит область эпонихия и фокусируется на продольных капиллярах (увеличение 400×), расположенных около оси центра пальца. Далее с помощью специальной программы записываются видеофрагменты течения крови в капиллярах длительностью 5 сек. каждый. Для каждого пациента/здорового добровольца записывается 6–10 видеофрагментов, что в общей сложности содержит информацию о 10-12 капиллярах.

После эксперимента видеофрагменты анализировались с помощью программы, разработанной Юрием Ильичем Гурфинкелем и Андреем Ямаевым. Программа позволяет измерять ряд параметров, характеризующих АЭ в капиллярах *in vivo*. В первую очередь, это скорость капиллярного кровотока (СКК). Для определения СКК программа стабилизирует видеофрагмент по выделенному капилляру и сохраняет положение эритроцитов и агрегатов на каждом кадре. Далее при сравнении кадров вычисляется скорость агрегатов и эритроцитов, а потом усредняется за все время наблюдения. Подробная процедура измерения СКК описана в статье [209]. Также программа позволяет автоматически рассчитывать следующие параметры: количество эритроцитарных агрегатов в мин., среднюю площадь агрегатов крови, количество агрегатов на погонный мм.

Измеряемые параметры

При обработке видеофрагментов, полученных с помощью капилляроскопа, можно определить следующие параметры, характеризующие АЭ *in vivo*:

- Скорость капиллярного кровотока (СКК) (мкм/сек.) — усредненная скорость течения отдельных эритроцитов и агрегатов в течение интервала измерения

(5 сек.).

- Количество эритроцитарных агрегатов в мин. (шт./мин.) — отношение числа наблюдаемых агрегатов в капилляре к интервалу измерения (5 сек.). Количество агрегатов рассчитывается по числу пересечений фиксированного поперечного сечения капилляра.
- Средняя площадь агрегатов (мкм^2) — средняя площадь агрегатов, наблюдаемых за интервал измерения (5 сек.). Площадь одиночных эритроцитов не учитывается при вычислении данного параметра.
- Количество агрегатов на погонный мм. (шт./мм) — среднее отношение количества наблюдаемых агрегатов в капилляре к линейному размеру капилляра за интервал измерения (5 сек.).

2.3 Статистическая обработка данных

Данные были обработаны, а графики построены с использованием написанной автором диссертации программы на языке программирования Python. Данная программа находится в открытом репозитории GitHub [210] и позволяет также обрабатывать и систематизировать данные, полученные с помощью лазерного агрегометра эритроцитов RheoScan, лазерного анализатора агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 и ЛП. Программа позволяет автоматически строить различные типы графиков и рассчитывать статистическую значимость между выборками, рассчитывать корреляции. Часть результатов была обработана с помощью программы Origin 2024.

2.3.1 Определение статистической значимости

В последующих главах на рисунках отображены коробчатые диаграммы, на которых нижняя и верхняя граница прямоугольника соответствует первому (Q_1) и третьему квартилям (Q_3) с медианой внутри данного прямоугольника. Усы на рисунках обозначают стандартные отклонения, средние значения (белые ромбы) находятся посередине. Статистическую значимость между экспериментальными группами определяли с помощью непараметрического теста Бруннера-Мюнцеля, если в подписи к рисунку явно не указан другой используемый статистический

тест. Две выборки, представляющие экспериментальные группы, считались статистически значимо различающимися, если значение p было меньше 0,05 (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$). Данные в таблицах представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение или ошибка. Также в *Приложении 3. Расширение парного пермутационного теста* автором диссертации был разработан новый непараметрический тест для расчета статистической значимости между зависимыми выборками на основе парного пермутационного теста. Данный тест позволяет избежать ложноположительных заключений, когда наблюдаются статистические различия при сравнительно большой ошибке измерения при использовании других тестов с зависимыми выборками.

2.3.2 Расчет корреляций между параметрами

Корреляции в последующих главах рассчитаны через коэффициенты корреляции Пирсона или Спирмена [211]. Коэффициенты корреляции оценивались следующим образом, приведенным в табл.3.

Таблица 3: Количественные критерии оценки коэффициента корреляции. Данные переработаны из [212].

Коэффициент корреляции	Характеристика корреляции
$ r > 0,7$	Сильная
$0,5 < r \leq 0,7$	Средняя
$0,3 < r \leq 0,5$	Слабая
$ r \leq 0,3$	Нет

Корреляция Пирсона — это параметрический тест на корреляцию между двумя непрерывными переменными. Допущения для применения теста следующие: нормальное распределение, независимость наблюдений и линейная зависимость двух переменных. Если первое предположение, то есть нормальность данных, не выполняется или если одна переменная является порядковой по своей природе, применялся непараметрический тест корреляции Спирмена.

ГЛАВА 3. МИКРОРЕОЛОГИЯ КРОВИ ПРИ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В рамках научной работы по изучению микрореологических параметров крови были проведены измерения на крови более 500 пациентов, поступивших в кардиологическое отделение МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова с 2017 по 2024 год. В зависимости от задачи все пациенты делились на подгруппы при анализе данных.

3.1 Влияние основного и сопутствующего заболевания на микрореологические параметры крови

3.1.1 Группы пациентов

В данном разделе было проведено сравнение микрореологических параметров при различных заболеваниях. В качестве рассматриваемых заболеваний выступали следующие: артериальная гипертензия (АГ); ишемическая болезнь сердца (ИБС); сахарный диабет 2-го типа (СД2Т); фибрилляция предсердий (ФП). Всего было выделено 6 групп пациентов с разным набором приведенных заболеваний и контрольная группа из здоровых добровольцев. У всех исследованных пациентов среди заболеваний была АГ. В табл.4 приведены характеристики возраста, пола и размера исследуемых групп.

Таблица 4: Данные возраста и пола по исследуемым группам с различными диагнозами. Артериальная гипертензия (АГ); ишемическая болезнь сердца (ИБС); сахарный диабет 2-го типа (СД2Т); фибрилляция предсердий (ФП). М – мужчины, Ж – женщины, SD – стандартное отклонение.

Группа пациентов/доноров	N	М / Ж	Возраст (среднее $\pm$ SD)
НОРМА	27	19 / 8	23 $\pm$ 4
АГ	101	48 / 53	61 $\pm$ 14
АГ+ИБС	56	43 / 13	68 $\pm$ 12
АГ+ФП	73	38 / 35	71 $\pm$ 10
АГ+ИБС+ФП	65	45 / 20	76 $\pm$ 9
АГ+СД2Т+ФП	44	22 / 22	70 $\pm$ 11
АГ+ИБС+СД2Т+ФП	39	20 / 19	72 $\pm$ 8

3.1.2 Полученные результаты и их анализ

Для приведенных групп пациентов проводилось сравнение по параметрам, характеризующим АЭ и ДЭ: индекс агрегации (AI), характерное время агрегации эритроцитов ($T_{1/2}$), гидродинамическая прочность агрегатов (CSS), а также индекс деформируемости при 3 Па (DI). Полученные данные приведены на рис.27. Для каждой группы был рассчитан критерий Шапиро-Уилка, который не соответствовал нормальности данных — статистическая значимость рассчитывалась с помощью теста Бруннера-Мюнцеля.

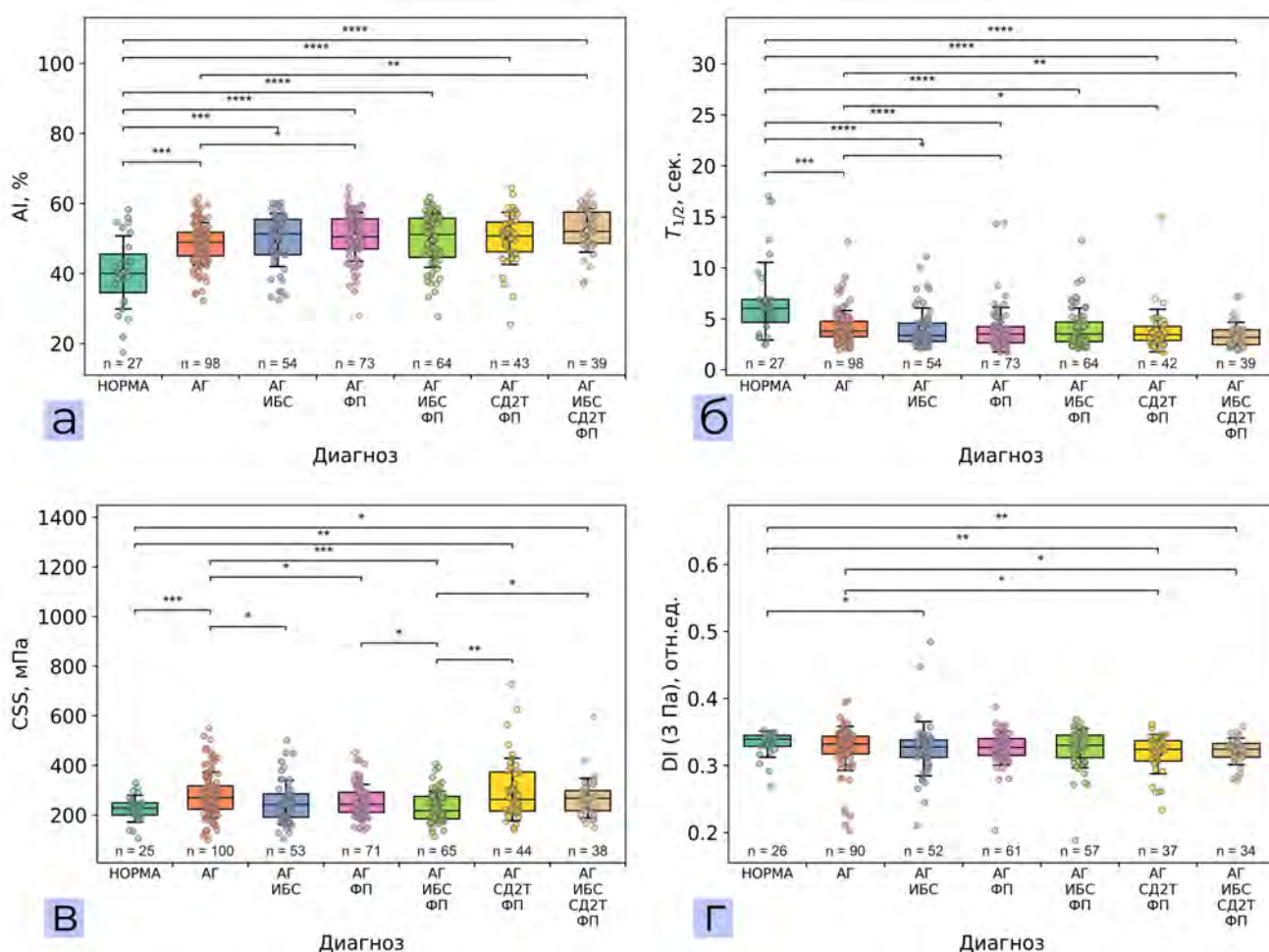


Рис. 27: (а) Индекс агрегации AI (10 сек.), (б) характерное время АЭ $T_{1/2}$, (в) гидродинамическая прочность агрегатов CSS и индекс деформируемости при DI 3 Па для групп пациентов с различными болезнями и сопутствующими заболеваниями. Артериальная гипертензия (АГ); ишемическая болезнь сердца (ИБС); сахарный диабет 2-го типа (СД2Т); фибрилляция предсердий (ФП). Статистическая значимость рассчитана с помощью теста Бруннера-Мюнцеля. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$. Несоответствие количества значений для определенной группы при рассмотрении разных параметров связано с наличием выбросов в данных.

На рис.27а видно, что при рассмотрении параметра AI для групп пациен-

тов только с АГ и с сопутствующими заболеваниями наблюдаются статистически значимые отличия, к примеру, между группой АГ и АГ+ФП ($p < 0,05$). Для параметра $T_{1/2}$ наблюдается аналогичная зависимость. На рис.27а-г видно большое перекрытие параметров при рассмотрении приведенных групп. Это значит, что по параметрам, характеризующим АЭ и ДЭ нельзя однозначно сказать, к какой группе принадлежит пациент. АЭ растет при наличии приведенных выше заболеваний, причем сопутствующие заболевания также повышают АЭ, хоть и не так значимо, как при полном их отсутствии. Интересно, что гидродинамическая прочность агрегатов уменьшается при рассмотрении некоторых сопутствующих заболеваний (см. рис.27в). Возможно, данное изменение связано с компенсаторными механизмами АЭ. ДЭ статистически значимо уменьшается при сравнении групп НОРМА↔АГ+ИБС; НОРМА↔АГ+СД2Т+ФП; НОРМА↔АГ+ИБС+СД2Т+ФП. Также наблюдается межгрупповое различие между группами пациентов.

Не было обнаружено статистически значимых различий между приведенными параметрами при сравнении подгрупп мужчин и женщин в одной группе заболеваний. Однако повышенная АЭ у женщин наблюдалась в группе АГ+ИБС+ФП, хоть данное различие не было статистически значимым.

Важно отметить, что отличия между контрольной группой и остальными группами отчасти определено тем, что наблюдаются большие различия в среднем возрасте (см. табл.4). Так, средний возраст для группы НОРМА составляет 23 года, тогда как для групп пациентов — порядка 60-70 лет. Между тем из литературы известно, что с возрастом АЭ повышается (см. раздел 8.1.2 в [4]).

Группы разделили на подгруппы по приёму антикоагулянтов или антиагрегантов. Антикоагулянты подавляют образование тромбина, препятствуя свёртыванию крови, а антиагреганты блокируют тромбоцитарные рецепторы. В отличие от них, антиагреганты воздействуют на тромбоциты, блокируя рецепторы на их поверхности. Полученные результаты приведены на рис.28. При расчете статистической значимости использовалась поправка Бонферрони, чтобы контролировать ошибку первого рода. Из рис.28 видно, что АЭ повышается при наличии антиагрегантной терапии у группы пациентов АГ+ФП. Гидродинамическая прочность агрегатов статистически значимо повышена в группе АГ+СД2Т+ФП при антиагрегантной терапии и статистически значимо понижена при антикоагулянтной терапии. АТ статистически значимо отличается при наличии той или иной терапии только для группы АГ+ИБС. Полученные результаты опубликованы в [198, 213—215].

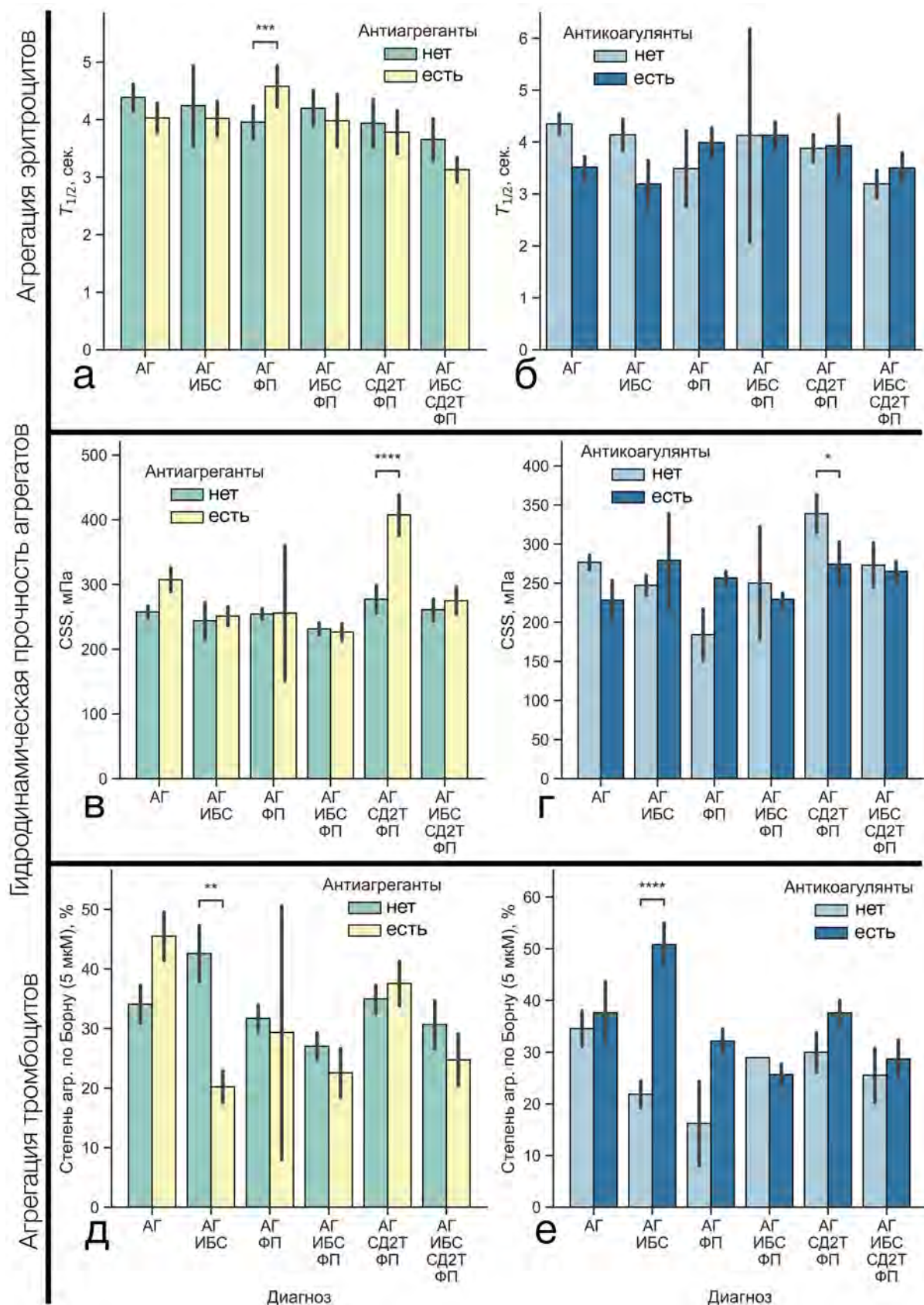


Рис. 28: Зависимость параметров $T_{1/2}$, CSS и степени агрегации для групп пациентов с различными болезнями и сопутствующими заболеваниями при наличии антикоагулянтной или антиагрегантной терапии. Погрешности – стандартные ошибки. Статистическая значимость рассчитана с помощью теста Бруннера-Мюнцеля с поправкой Бонферрони и приведена на рисунке только между подгруппами. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$.

3.2 Корреляции микрореологических параметров крови

3.2.1 Группы пациентов

В данном разделе приведено сравнение агрегационных параметров, измеренных *in vitro* с помощью лазерной агрегометрии и лазерного пинцета, с параметрами, измеренными *in vivo* с помощью цифровой капилляроскопии. Анализ проводился для тех же групп пациентов, что и в предыдущем разделе (см. пункт *Влияние сопутствующих заболеваний на микрореологические параметры крови*). Был проведен корреляционный анализ данных, результаты которого приведены на рис.29. Рассматривались следующие параметры:

- **Клинические показатели:** скорость оседания эритроцитов (СОЭ) и общий белок (ОБ).
- **Показатель *in vivo*:** скорость капиллярного кровотока (СКК).
- **Показатели *in vitro*:** индекс агрегации (AI), гидродинамическая прочность агрегатов (CSS) — данные параметры характеризуют АЭ в ансамбле; время агрегации ($T_{\text{агр.}}$)¹¹ — характеризует АЭ на уровне одиночных клеток; степень агрегации тромбоцитов (Степень Агр.Тромб.) — характеризует АТ.

3.2.2 Полученные результаты и их анализ

Индекс агрегации эритроцитов AI положительно статистически значимо коррелирует с гидродинамической прочностью агрегатов CSS для следующих групп пациентов: АГ+ФП; АГ+ИБС+ФП; АГ+ИБС+СД2Т+ФП, тогда как для групп пациентов АГ; АГ+ИБС; АГ+СД2Т+ФП статистически значимой корреляции не обнаружено (см. табл.5). Также положительная корреляция обнаружена для группы здоровых добровольцев. Обнаруженные различия в корреляции между данными параметрами могут быть объяснены следующими причинами:

- **Роль ФП.** При ФП нарушается кровоток вследствие нерегулярных сердечных сокращений, что приводит к возникновению застоя крови и формированию турбулентного потока. Данные изменения определенно ведут к повышению изменчивости сдвиговых напряжений в сердце, что, возможно, ведет к повышению АЭ, чтобы снизить возникающую турбулентность за счет повышения

¹¹ $T_{\text{агр.}}$ оценивалось эмпирически (см. пункт *Протокол измерения на лазерном пинцете*).

вязкости крови, а также к повышению гидродинамической прочности агрегатов для большей стабильности агрегатов в турбулентном кровотоке.

- **Роль ИБС.** В большинстве случаев ИБС сопровождается атеросклерозом, а именно образованию бляшек, состоящих из липидов, соединительной ткани и др. Атеросклероз возникает при воспалении стенок сосуда, и одновременно служит источником воспаления. Всё это приводит к изменению состава плазмы крови, что в свою очередь влияет на АЭ и также может влиять на зависимость AI от CSS .
- **Роль СД2Т.** При СД2Т деформируемость эритроцитов снижается, что может нарушать процесс АЭ, что в свою очередь меняет зависимость AI от CSS . В группе АГ+СД2Т+ФП это может нивелировать корреляцию, несмотря на наличие ФП. Однако в комбинации с ИБС (группа АГ+ИБС+СД2Т+ФП) системное воспаление и эндотелиальная дисфункция могут перевесить эффекты СД2Т, восстанавливая связь между AI и CSS .
- **Роль АГ.** АГ характеризуется повышенным давлением и сдвиговым напряжением в крови. Повышенная АЭ в этом случае, возможно, возникает вследствие компенсаторных механизмов для поддержания оптимального значения вязкости. Однако при систематически повышенном давлении при отсутствии других факторов прочность эритроцитарных агрегатов может оставаться на одном уровне. Это может объяснить отсутствие корреляции AI и CSS при АГ.

Сравнение корреляций параметров в норме с корреляциями при патологии может быть неоднозначным, поскольку за схожие корреляции могут отвечать разные процессы. Именно поэтому положительную корреляцию AI и CSS в НОРМЕ (см. табл.5) нельзя напрямую сравнивать с положительными корреляциями при патологиях. Положительная корреляция в НОРМЕ скорее всего обусловлена прямой связью между образованием агрегатов и их прочностью, тогда как при исследуемых заболеваниях патологические факторы превалируют, причем при различных осложнениях корреляция AI с CSS изменяется.

Было получено, что параметры AI и CSS положительно коррелируют с параметром СОЭ почти для всех групп (см. рис.29б-г,е). Единственное, для группы АГ+СД2Т+ФП не обнаружено корреляции между параметрами СОЭ и AI (см.

рис.29д), и для группы АГ корреляции данных параметров немного меньше порогового значения для выявления слабой корреляции ($r < 0,3$) (см. рис.29а). Параметр СОЭ является неспецифическим показателем, который зависит от многих факторов, в том числе от АЭ. Отсутствие выраженной корреляции параметра СОЭ с параметрами АЭ может быть важным фактором при анализе параметров крови пациентов.

Таблица 5: Корреляция параметров *AI* и *CSS* в норме и патологии. Красным цветом выделены группы, где обнаружены положительные статистически значимые корреляции.

Диагноз	N	Коэффициент корреляции Пирсона (r)	Статистическая значимость (p value)
АГ	97	0,13	0,211
АГ+ИБС	52	0,27	0,056
АГ+СД2Т+ФП	43	0,12	0,460
АГ+ФП	71	0,51	0 ¹²
АГ+ИБС+ФП	64	0,31	0,012
АГ+ИБС+СД2Т+ФП	38	0,48	0,002
НОРМА	27	0,54	0,005

Корреляционным анализом на рис.29 показано, что измеренные *in vivo* показатели АЭ не коррелируют с измеренными *in vitro* показателями *AI* и *CSS*. Однако наблюдается их корреляция с параметром времени агрегации одиночных эритроцитов $T_{\text{агр.}}$. Скорее всего данное обстоятельство связано с тем, что *AI* и *CSS* измеряется в кюветах, толщина которых составляет около 200 мкм, что больше соответствует мелким сосудам, но никак не капиллярам. Поэтому наблюдается корреляция *in vivo* параметров (также присутствует корреляция с другими параметрами, которые опущены в настоящем анализе) с $T_{\text{агр.}}$, который характеризует время образования парного эритроцитарного агрегата. Важно отметить, что корреляции между СКК и $T_{\text{агр.}}$ так же, как и между количеством агрегатов на погонный мм и $T_{\text{агр.}}$ наблюдаются как положительные, так и отрицательные. К примеру, для групп на рис.29а-д наблюдается положительная корреляция СКК с $T_{\text{агр.}}$, а для группы пациентов АГ+ИБС+СД2Т+ФП наблюдается отрицательная корреляция ($r = -0,45$) (рис.29е). Положительная корреляция между данными параметрами означает то, что, чем дольше происходит агрегация двух эритроцитов при их контакте, тем выше СКК; отрицательная корреляция — наоборот. Скорее всего полученные результаты для группы АГ+ИБС+СД2Т+ФП говорят о том, что у данной группы пациентов присутствует компенсаторный механизм АЭ, приводящий

¹²Для проверки статистической значимости используется *t*-статистика: $t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$, где *n* — объем выборки. При справедливости нулевой гипотезы эта статистика следует *t*-распределению с *n* – 2 степенями свободы. Значение *p*-уровня значимости вычисляется как $p = 2 \cdot (1 - F_t(|t|, n - 2))$, где $F_t(t, n - 2)$ — функция распределения Стьюдента с *n* – 2 степенями свободы. Поэтому могут быть значения *p* почти неотличимые от нуля.

к увеличению скорости капиллярного кровотока, что, соответственно, улучшает перфузию тканей.

Хоть среднее значение концентрации общего белка (ОБ) у всех групп было примерно одинаковым (~ 70 г/л), именно для группы АГ+ИБС+СД2Т+ФП наблюдается положительная корреляция между СОЭ и ОБ (рис.29е).

В корреляционном анализе на рис.29 также представлены корреляции между обсужденными выше параметрами с параметром степени агрегации тромбоцитов, измеренным с помощью прибора Биола. Видно, что отрицательная корреляция между степенью агрегации тромбоцитов и параметром *AI* наблюдается только для групп пациентов АГ и АГ+ИБС. Для других групп пациентов статистически значимых положительных или отрицательных корреляций не наблюдается.

По полученным результатам можно сделать вывод, что параметры АЭ, измеренные *in vivo* и *in vitro* не всегда коррелируют друг с другом, и они дополняют друг друга для выявления особенности АЭ в каждой конкретной группе пациентов с различными заболеваниями. Полученные данные могут быть полезными при разработке новых протоколов терапии пациентов с ССЗ. В частности, полученные данные гипотетически позволяют улучшить существующий метод использования плазмафереза [216] в качестве контроля реологических свойств крови при разных ССЗ у пациентов.

Полученные результаты частично опубликованы в статьях [209, 217].

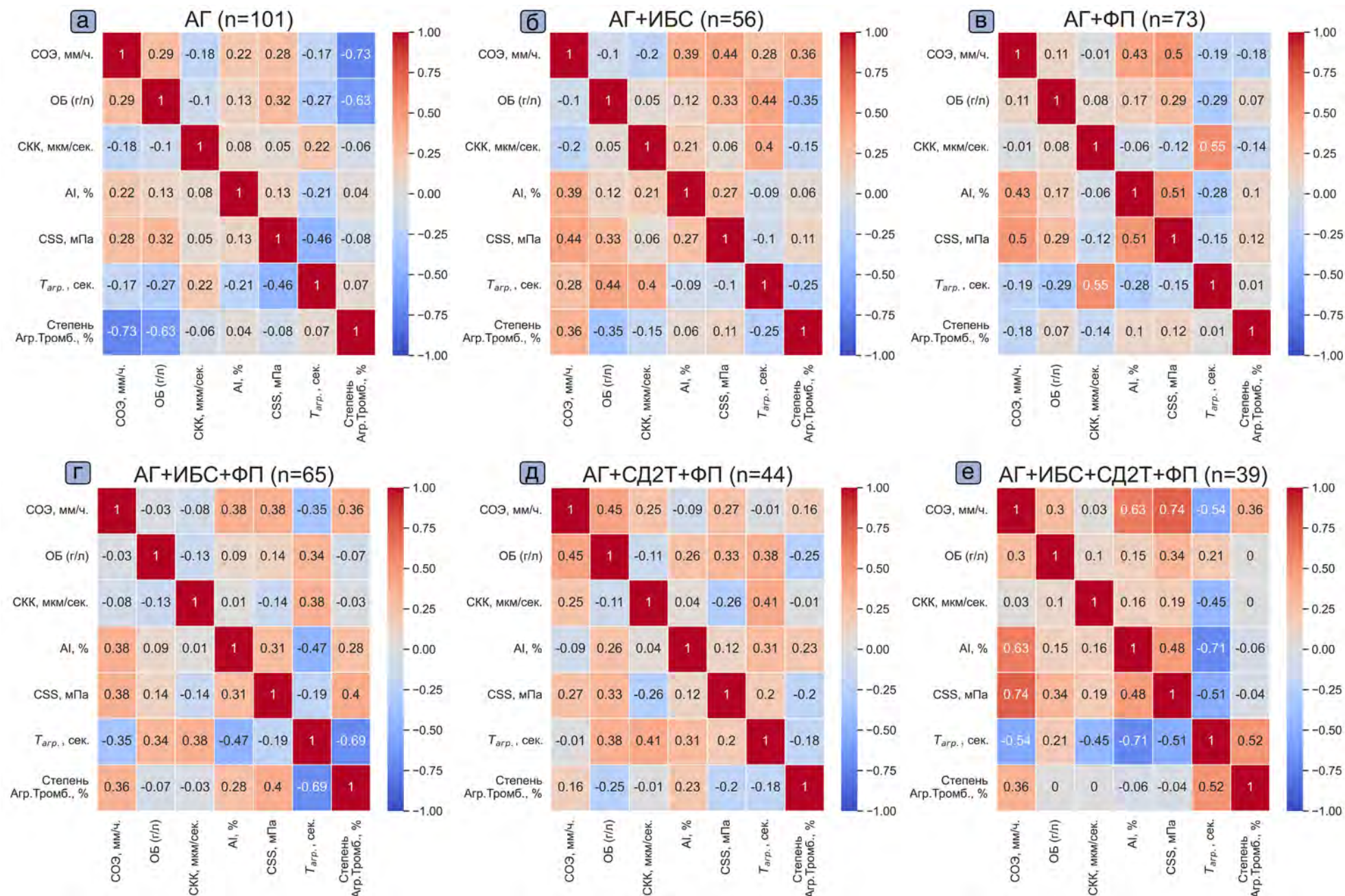


Рис. 29: Корреляционные матрицы параметров агрегации эритроцитов, а также скорости оседания эритроцитов (СОЭ) и концентрации общего белка (ОБ) для групп пациентов с различными заболеваниями. В таблицах представлены коэффициенты корреляции Пирсона. Артериальная гипертензия (АГ); ишемическая болезнь сердца (ИБС); сахарный диабет 2-го типа (СД2Т); фибрилляция предсердий (ФП). Степень Агр.Тромб. – степень агрегации тромбоцитов, СКК – скорость капиллярного кровотока.

3.3 Характеристика капиллярного кровотока в норме, при ишемической болезни сердца, и при фибрилляции предсердий

3.3.1 Группы пациентов

В данном разделе приведены результаты исследования параметров микроциркуляции, измеренных с помощью цифрового капилляроскопа, на 132 взрослых испытуемых, среди которых были выделены 3 группы: 44 здоровых добровольца (НОРМА), 44 пациента с ишемической болезнью сердца (ИБС) и 44 пациента с фибрилляцией предсердий (ФП) (см. табл.6). Критерии исключения из исследования были следующими: пациенты старше 85 лет, пациенты с онкологической патологией, хроническими заболеваниями печени и почек, наличием сахарного диабета 2-го типа, заболеваниями соединительной ткани или заболеваниями центральной нервной системы. Кроме того, из исследования были исключены пациенты, у которых одновременно диагностировалось ИБС и ФП.

В контрольной группе по сравнению с группами ИБС и ФП наблюдается широкий диапазон различных возрастов (см. табл.6). Корреляций между измеряемыми параметрами микроциркуляции и возрастом донора обнаружено не было.

Таблица 6: Данные возраста и пола по исследуемым группам здоровых добровольцев (НОРМА), пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) и пациентов с фибрилляцией предсердий (ФП). SD – стандартное отклонение.

Показатель	НОРМА	ИБС	ФП
Количество	44	44	44
Количество женщин	19	14	25
Количество мужчин	25	30	19
Средний возраст $\pm$ SD (лет)	37 ± 18	70 ± 9	73 ± 10

3.3.2 Полученные результаты и их анализ

Сравнение параметров микроциркуляции в трех исследуемых группах представлено на рис.30. Средняя скорость капиллярного кровотока (СКК) статистически значимо выше ($p < 0,0001$) в контрольной группе по сравнению с группами ИБС и ФП (рис.30а). Статистически значимых различий в СКК между группами ИБС и ФП не выявлено. Однако статистически значимые различия между группами

ИБС и ФП наблюдаются ($p < 0,01$) по количеству агрегатов крови в минуту и по количеству агрегатов крови на погонный мм (рис.30б). В контрольной группе эритроцитарные агрегаты не наблюдались. Параметр средней площади агрегатов статистически значимо не отличается между группами ИБС и ФП. По приведенным данным видно, что СКК не отличается при сравнении пациентов с ИБС и ФП, однако количество агрегатов на погонный мм статистически значимо выше для пациентов с ФП.

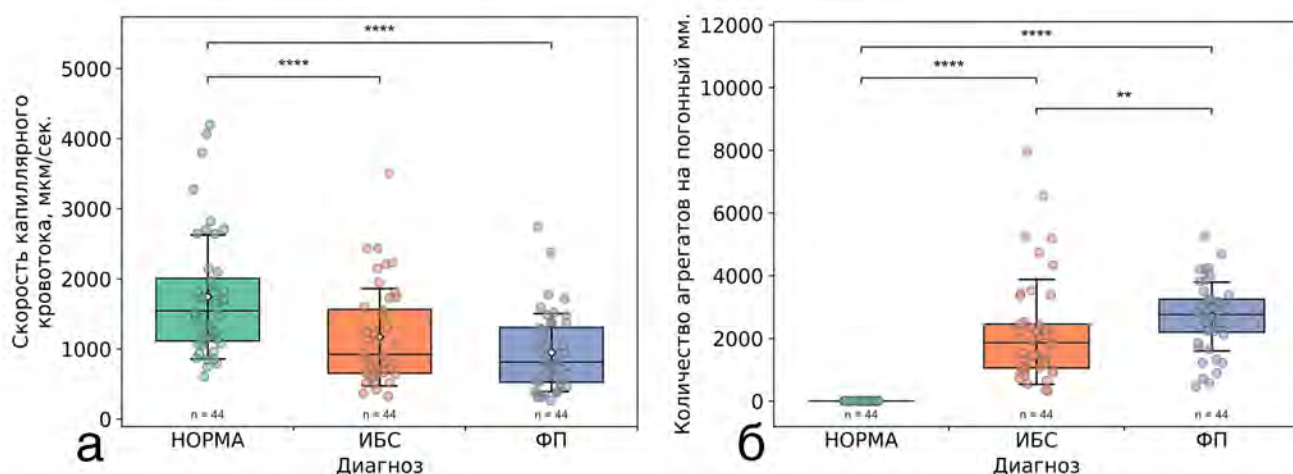


Рис. 30: (а) Средняя скорость капиллярного кровотока и (б) количество агрегатов на погонный мм. для трех групп: НОРМА, пациенты с ИБС и пациенты с ФП. Каждая точка на рисунке соответствует среднему значению для одного здорового донора или пациента с ИБС или ФП. Статистическая значимость рассчитана с помощью теста Бруннера-Мюнцеля. ** : $p < 0,01$; **** : $p < 0,0001$.

На рис.31 приведена матрица рассеяния параметров микроциркуляции для 3-х изучаемых групп пациентов. Видно, что увеличение количества агрегатов на 1 погонный мм у пациентов обеих групп сопровождается снижением СКК. Эта корреляция более выражена у пациентов с ИБС (рис.31), что, по-видимому, связано с тем, что нарушение микроциркуляции крови является одной из причин возникновения ИБС. Также видно, что СКК отрицательно коррелирует с количеством агрегатов в мин. в группе пациентов с ИБС ($r = -0,37$), в то время как в группе пациентов с ФП корреляция между этими параметрами отсутствует ($r = 0,14$). Это может свидетельствовать о том, что увеличение количества эритроцитарных агрегатов может выступать в качестве компенсаторного механизма при ФП, т.к. увеличение их количества не снижает СКК. СКК также коррелирует со средней площадью агрегата у пациентов с ФП ($r = 0,37$), в то время как корреляция этих параметров у пациентов с ИБС не столь значительна ($r = 0,20$). Можно пред-

положить, что это связано с компенсаторной реакцией организма на улучшение прохождения агрегатов через микрососуды, т.е. чем больше размер эритроцитарных агрегатов, тем выше скорость кровотока. Средняя площадь агрегата обратно коррелирует с количеством агрегатов на 1 погонный мм для обеих групп пациентов ($r < -0,3$). Это объясняется тем, что увеличение размера агрегатов приводит к уменьшению количества агрегатов, присутствующих в капилляре.

Также видно, что количество агрегатов крови на 1 погонный мм коррелирует с количеством агрегатов крови в мин. преимущественно у больных ИБС ($r = 0,55$) по сравнению с пациентами с ФП ($r = 0,26$). Это может свидетельствовать о большем участии сердечно-сосудистой системы в регуляции процесса микроциркуляции, поскольку периферические артерии у больных ИБС так же поражаются, как и коронарные, хотя и в меньшей степени.

Полученные отличия в корреляции параметров микроциркуляции могут быть связаны с различиями в природе изучаемых заболеваний: если при ИБС в основе заболевания лежат нарушения микроциркуляторной системы, то при ФП — нарушения сокращений сердечной мышцы. Подводя итог, можно сказать, что при ИБС и ФП СКК снижена относительно здоровых доноров, и наблюдается ряд отличий микроциркуляции при сравнении пациентов двух рассматриваемых групп.

Полученные результаты частично опубликованы в статье [218].

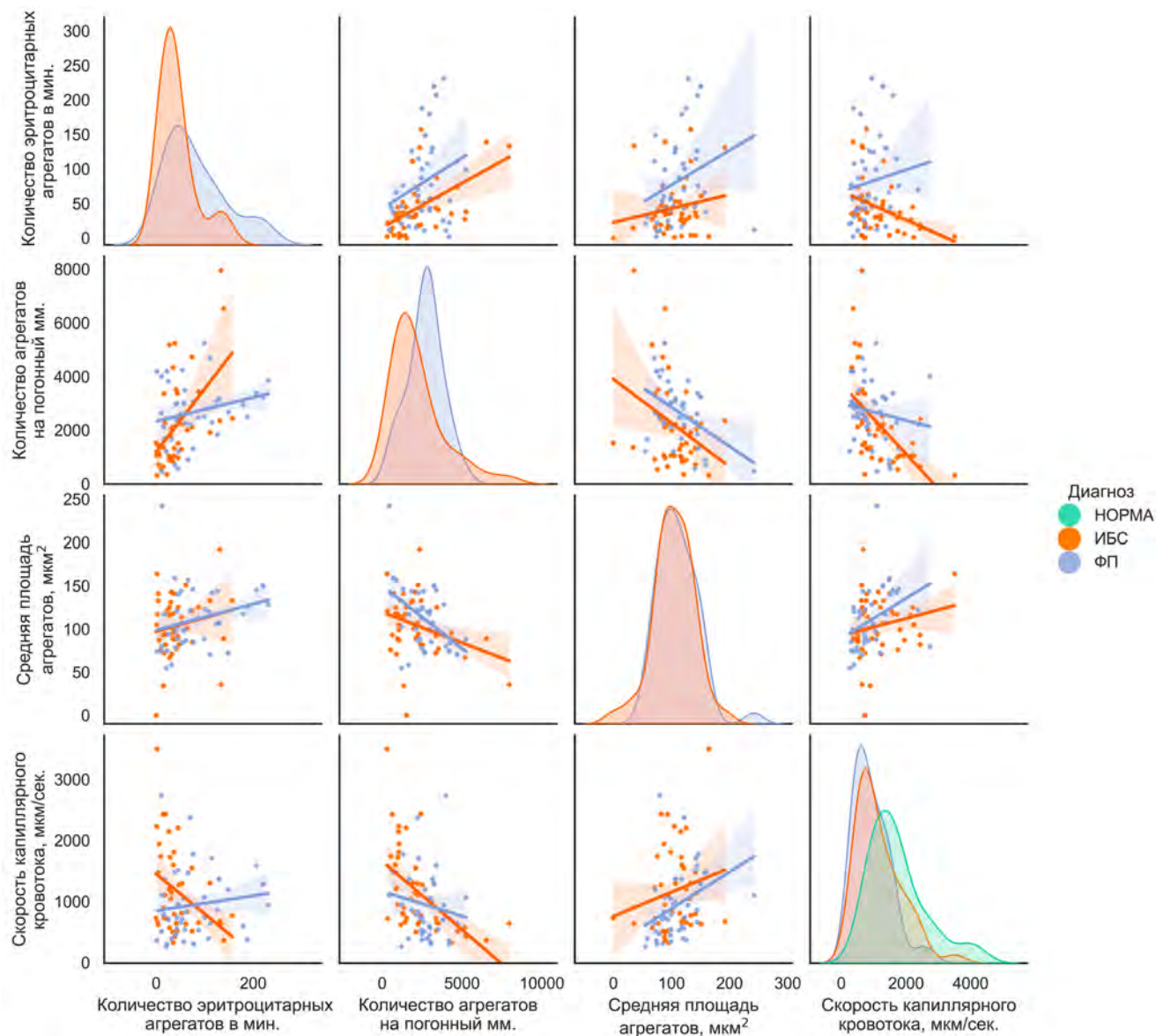


Рис. 31: Матрица рассеяния параметров микроциркуляции для трех групп: НОРМА, пациенты с ИБС и пациенты с ФП. Каждая точка на рисунке соответствует среднему значению для одного здорового донора или пациента с ИБС или ФП. Для группы НОРМА агрегатов в капиллярном кровотоке обнаружено не было. Прямые линии на рисунке и закрашенная область — это линейная регрессия и 95% доверительный интервал.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ И ВНУТРЕННИХ ФАКТОРОВ, ВКЛЮЧАЯ СОСУДИСТЫЙ ЭНДОТЕЛИЙ, НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК КРОВИ

4.1 Влияние нитропруссид натрия на микрореологические свойства эритроцитов

В условиях *in vivo* агрегация и деформация эритроцитов регулируются различными сигнальными механизмами, включая те, которые связаны с сигнальными молекулами, то есть газотрансммитерами [48, 219]. В кровотоке одной из наиболее важных сигнальных молекул является оксид азота (NO). Это нестабильный радикал с временем жизни около 100 мс, и *in vivo* он в основном секретируется эндотелиальной NO-синтазой [220].

Что касается секреции NO, существуют две группы веществ: (1) соединения, которые высвобождают NO спонтанно (например, нитропруssid натрия (НПН)) и (2) соединения, которые требуют ферментативного метаболизма для генерации NO (например, L-аргинин) [221]. Поскольку в эритроцитах присутствует NO-синтаза, обе группы доноров NO могут влиять на свойства эритроцитов [222].

Влияние доноров NO НПН и L-аргинина на микрореологические свойства эритроцитов исследовалось *in vitro* в ряде работ, в которых было показано, что под влиянием доноров NO увеличивается деформируемость эритроцитов, а агрегация эритроцитов уменьшается [110, 184, 219, 223, 224]. Следует отметить, что агрегация и деформация эритроцитов в данных работах оценивались в растворах декстрана или сильно разбавленных растворах аутологичной плазмы.

В литературе есть некоторые свидетельства того, что механизмы агрегации, а также деформации эритроцитов в плазме крови отличаются от их механизмов в растворах искусственных макромолекул, таких как декстраны [4, 225]. В основном предполагается, что АЭ в плазме крови более сложная, чем в растворе искусственных макромолекул, например, декстранов [226]. Для *in vitro* исследований АЭ необходимо установить, какой антикоагулянт предпочтительнее и как он влияет на измеряемые параметры.

Целью данной части исследования было изучение влияния оксида азота на микрореологические свойства эритроцитов в образцах эритроцитов, то есть цельной крови, стабилизированной различными антикоагулянтами (ЭДТА КЗ или литий-гепарин) или отмытых эритроцитов, ресуспендированных в растворе декстрана (130 кДа), после добавления НПН, как донора NO, в различных концентрациях. В

данной части исследования использовался лазерный агрегометр RheoScan.

4.1.1 Подготовка образцов

Кровь для всех измерений была взята из локтевой вены 3 здоровых мужчин-доноров (22-25 лет) натощак. Пробирки для образцов крови содержали антикоагулянты ЭДТА К3 или литий-гепарин. Измерения в цельной крови и в растворах декстрана проводились отдельно в разные дни (каждый донор сдавал кровь дважды для этого исследования), чтобы соблюсти временные рамки эксперимента.

НПН (Sigma-Aldrich) был разбавлен в дистиллированной воде до концентраций в диапазоне 5-100 мМ. Раствор НПН добавляли к образцам эритроцитов в соотношении 1:100 (1 часть раствора НПН и 100 частей крови) для получения конечных концентраций 0, 50, 100, 200, 1000 мкМ. Контрольный образец состоял из 1 части дистиллированной воды и 100 частей образца крови.

Цельная кровь: гепарин лития и ЭДТА К3

НПН добавляли к цельной крови, стабилизированной ЭДТА К3 или литий-гепарином, для получения следующих концентраций НПН: 0, 50, 100, 200, 1000 мкМ. Инкубация цельной крови с НПН проводилась в течение 30 мин. при 37 °С перед измерениями.

Декстран

Для получения отмывых эритроцитов в растворе декстрана (130 кДа) были выполнены следующие шаги:

1. Цельная кровь объемом 1,5 мл была налита в пробирки объемом 2 мл и центрифугирована в течение 10 мин. при 180 g при комнатной температуре (22 °С). Затем слой плазмы с тромбоцитами был удален с помощью дозатора.
2. К объему осажденных эритроцитов добавлялся 1 мл PBS , затем пробирку хорошо перемешивали для получения однородной суспензии. Затем суспензию эритроциты+PBS центрифугировали в течение 3 мин. при 1000 g при комнатной температуре (22 °С). Далее с помощью дозатора удаляли надосадочную жидкость. Данный шаг повторялся 3 раза.
3. Была приготовлена смесь растворов Рингера и Волювена (6% гидроксиэтил-крахмал 130/0,4 в 0.9% хлориде натрия) в соотношении 6:4. Конечная кон-

центрация декстрана (гидроксиэтилкрахмала) составляла 24 мг/мл, а теоретический рН приготовленного раствора находился в диапазоне 6,5-6,7 рН. Отмытые эритроциты добавлялись к приготовленному раствору до достижения гематокрита 40%.

4. Раствор НПН добавлялся к образцу для получения следующих концентраций: 0, 50, 100, 200, 1000 мкМ. Инкубация образца крови с НПН проводилась в течение 30 мин. при 37 °С перед измерениями.

4.1.2 Полученные результаты и их анализ

Гидродинамическая прочность агрегатов

Полученные результаты для параметра CSS при различных концентрациях НПН представлены на рис.32а-в. Наблюдается существенная разница в эффекте НПН при рассмотрении различных сред для АЭ. В частности, снижение CSS в гепариновой крови наблюдалось при концентрации НПН 200 мкМ (рис.32а), в то время как в растворе декстрана наблюдается увеличение CSS при концентрации НПН выше 100 мкМ (рис.32в).

В статье [69] было показано, что молекулы декстрана адсорбируются на мембране эритроцитов, что напрямую влияет на АЭ. Увеличение CSS для раствора декстрана может быть связано с изменением адсорбции молекул декстрана при различных концентрациях НПН. Необходимы дальнейшие исследования в данном направлении.

Параметр CSS статистически значимо не изменяется при концентрациях НПН 0-200 мкМ для образцов с ЭДТА (рис. 32в). Однако наблюдается статистически значимое падение CSS при сравнении концентраций 0 и 1000 мкМ.

Агрегация эритроцитов

Полученные результаты для параметров τ_1 и τ_2 при различных концентрациях НПН представлены на рис.32г-и. Известно, что гепарин является индуктором АЭ [4], что объясняет разницу в контрольных значениях между образцами с гепарином лития и ЭДТА К3 (см. рис.32г и рис.32е). В крови, стабилизированной гепарином, наблюдается статистически значимое увеличение АЭ при добавлении НПН, заметное по уменьшению времени образования 3D агрегатов (τ_2) (рис.32ж).

В крови с антикоагулянтом ЭДТА К3 выражена лишь тенденция к снижению

АЭ. Для параметра τ_1 наблюдаются статистически значимые различия при сравнении концентраций НПН 0 и 100 мкМ, а также 0 и 1000 мкМ.

Для раствора декстрана наблюдается тенденция к снижению АЭ при повышении концентрации НПН (рис.32д,з), однако статистически значимые различия обнаружены только для параметра τ_2 при сравнении концентраций НПН 200 и 1000 мкМ.

Полученные данные не противоречат напрямую тем результатам, что были получены при исследовании АЭ в растворе декстрана с помощью проточной камеры[219]. В статье Муравьева А.В. наблюдалось значительное снижение АЭ при концентрации НПН 100 мкМ, тогда как в данной работе наблюдалась тенденция к снижению агрегации при концентрации НПН 100 мкМ для раствора декстрана и даже увеличение АЭ в гепаринизированной крови. Причина этих различий может заключаться в разных методах (проточная камера [227] — лазерная агрегометрия), подготовке крови и образцах эритроцитов (гематокрит около 1% — гематокрит 40%). Основной вывод, который можно сделать на основе данных, представленных на рис.32г-и, заключается в том, что эффект НПН, то есть NO, зависит от среды, в которой происходит АЭ. Это означает, что NO может быть как индуктором, так и ингибитором АЭ в зависимости от среды, в которой происходит агрегация клеток. Поскольку основным отличием в действии двух антикоагулянтов (ЭДТА К3 и гепарина лития) является сохранение или почти полное связывание кальция в крови, то, по-видимому, кальций выступает в качестве одного из регуляторов в механизмах действия оксида азота на агрегационные свойства эритроцитов. В используемом растворе декстрана содержится кальций, и поэтому, наблюдая различия между образцами с гепарином лития и декстраном, можно определенно утверждать, что кальций является не единственным регулятором в механизме действия NO на эритроциты.

Деформируемость эритроцитов

Полученные результаты для предела текучести и внутриклеточной вязкости эритроцитов (ВВЭ) при различных концентрациях НПН представлены на рис.32й-о. Наблюдается соответствие между образцами гепарина лития и декстрана, проявляющееся в снижении предела текучести и увеличении ВВЭ при концентрации НПН 100 мкМ (см. рис. 32й-к,м-н). Для образцов крови, стабилизированных ЭДТА К3, предел текучести и ВВЭ оказались нечувствительными к концентрации

НПН в диапазоне до 1 мМ (рис. 32л,о). Это может быть связано с отсутствием ионов кальция в данном образце крови. Однако есть основания предполагать, что деформируемость эритроцитов, полученных из крови, стабилизированной ЭДТА, увеличивается при добавлении НПН, что наблюдается при измерениях, проведенных для отмытых эритроцитов [228].

Двухвалентные ионы кальция играют важную роль в поддержании механического состояния эритроцитов. Известно, что увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} приводит к нарушению деформируемости эритроцитов [229]. Некоторые результаты позволяют предположить, что НПН взаимодействует с тиоловыми группами мембранных белков эритроцитов и образует неспецифические дисульфидные связи, которые ингибируют приток кальция [230]. Таким образом, НПН предотвращает внутриклеточное накопление Ca^{2+} и оказывает защитное действие. Это также означает, что защитный эффект НПН, распространяющийся на деформируемость эритроцитов, может проявляться только в среде, в которой присутствует Ca^{2+} . При данном рассмотрении имеется согласование с результатами, приведенными на рис.32й-о. Кроме того, поскольку во время измерений эритроциты подвергаются внешнему механическому воздействию, механочувствительный рецепторный комплекс Piezo1, локализованный на мембране, может активироваться. Это может привести к усилению работы Ca^{2+} каналов, которые регулируют активность протеинкиназы С, кальций-АТФазы и Гардос-каналов, влияющих на деформируемые свойства эритроцитов [231]. Таким образом, можно ожидать значительных изменений в деформируемости эритроцитов при добавлении НПН через метаболические пути в Ca^{2+} -добавленной среде.

Полученные результаты опубликованы в статье [232].

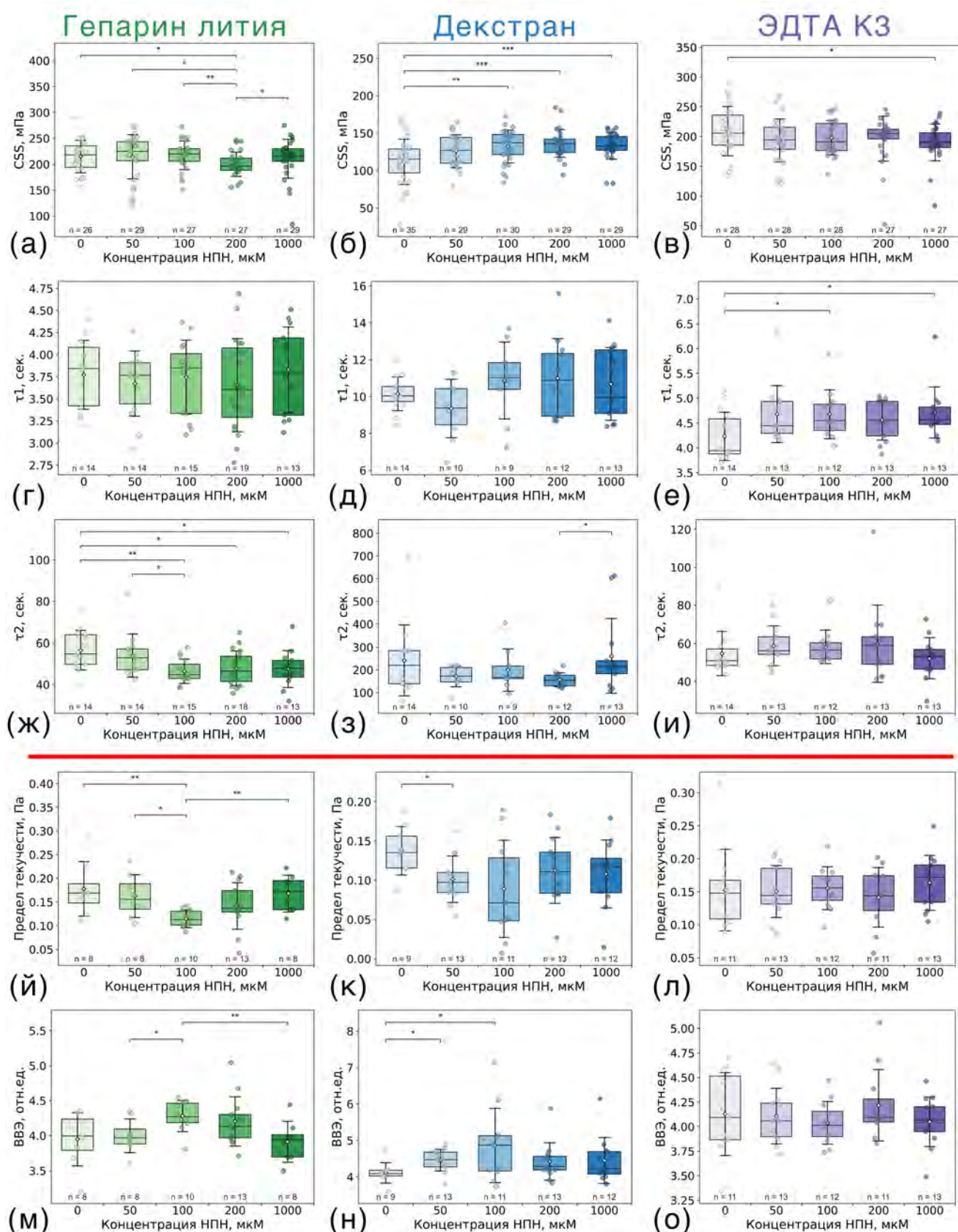


Рис. 32: Зависимость (а-и) агрегационных и (й-о) деформационных параметров эритроцитов при разных концентрациях нитропрусида натрия (НПН) при использовании разных антиагулянтов в цельной крови (гепарин лития или ЭДТА КЗ) или декстрана в качестве среды для АЭ. Статистическая значимость рассчитана с помощью теста Манна-Уитни. Каждая точка представляет собой одно измерение с одним из образцов от трех здоровых доноров. Красная линия отделяет агрегационные параметры от деформационных.

4.2 Влияние фибриногена на взаимодействие эритроцитов и эндотелия

В данном разделе приведены результаты исследования взаимодействия эндотелия и эритроцитов здоровых добровольцев при различных концентрациях фибриногена (как основного проагрегантного белка в плазме крови) в стационарных условиях на уровне отдельных клеток *in vitro* с помощью лазерного пинцета. Изменение концентрации фибриногена в среде моделирует физиологическое и патологические состояния плазмы крови.

4.2.1 Подготовка образцов

Кровь для всех экспериментов брали из локтевых вен здоровых доноров мужского пола ($N = 4$) для получения сыворотки с использованием пробирок с активатором свертывания SiO_2 (5 мл) и цельной крови с антикоагулянтом ЭДТА КЗ (4 мл). Образец, помещаемый в кювету для измерений (см. рис.23), состоял из сыворотки с добавлением бычьего фибриногена (номер MDL: MFCD00163624) в определенной концентрации и небольшого количества цельной крови (1 часть крови на 1000 частей сыворотки с фибриногеном). В данном исследовании использовался бычий фибриноген, который по своей структуре близок к человеческому. В статье [233] было показано, что между человеческим и бычьим фибриногеном нет существенной разницы в адгезивных свойствах эндотелия.

4.2.2 Полученные результаты и их анализ

Полученные результаты показали, что с увеличением концентрации фибриногена, добавленного в сыворотку крови, сила взаимодействия между эритроцитом и эндотелием монотонно возрастает вплоть до концентрации фибриногена 4 мг/мл, а в диапазоне от 4 до 8 мг/мл сила взаимодействия достигает насыщения (см. рис.33). Насыщение достигается, когда концентрация фибриногена превышает норму — норма находится в диапазоне 2-4,5 мг/мл, с медианой около 3 мг/мл, и незначительно различается у мужчин и женщин [234]. При патологических и воспалительных процессах в организме концентрация фибриногена повышается, например, было показано, что среднее значение фибриногена у пациентов с диабетической язвой стопы (степень 3) составляло около 5 мг/мл [235]. На основании этих результатов можно сделать вывод, что концентрация фибриногена не является ведущим фактором адгезии эритроцитов к эндотелию для эритроцитов из

крови здоровых добровольцев и эндотелия в физиологических условиях.

Влияние фибриногена на адгезию эритроцитов к эндотелию при патологии

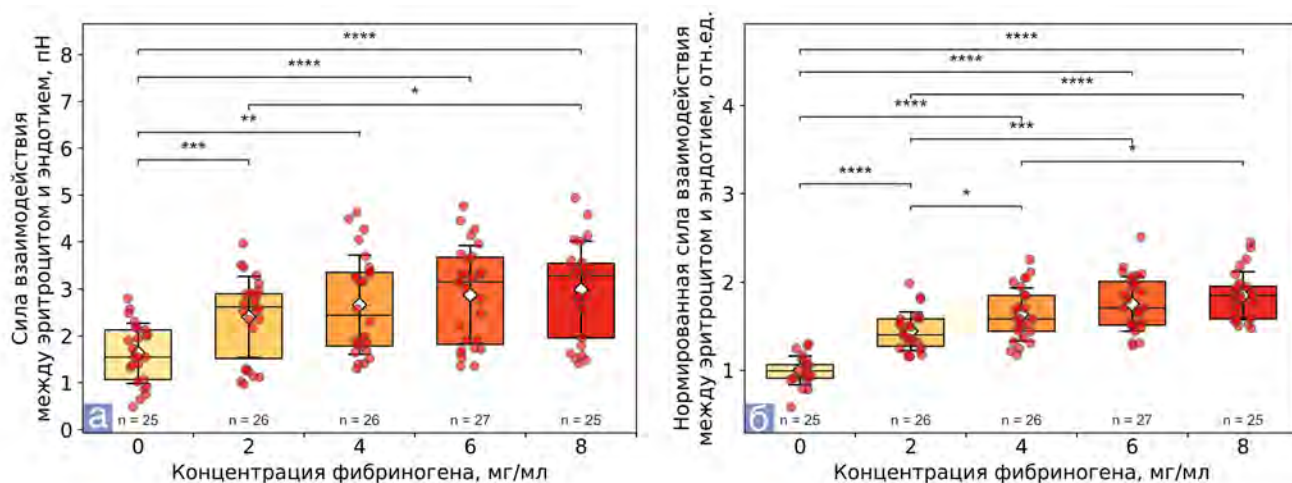


Рис. 33: (а) Зависимость силы взаимодействия и (б) нормированная (по концентрации 0 мг/мл для каждого донора) зависимость силы взаимодействия между эритроцитом и эндотелием от концентрации бычьего фибриногена в сыворотке крови. Статистическая значимость рассчитана с помощью теста Манна-Уитни. Каждая точка представляет собой одно измерение с одним из образцов от четырех здоровых доноров.

требует дополнительных исследований. Скорее всего, оно будет иным, поскольку при ряде патологий, как было сказано в первой главе, наблюдается значительное увеличение адгезии эритроцитов к эндотелию [110]. Также на рис.33а видно, что эритроцит и эндотелий в сыворотке крови пусть и слабо, но взаимодействуют друг с другом, что предполагает наличие других факторов, индуцирующих взаимодействие эритроцит-эндотелий. Это так же может означать, что взаимодействие между эритроцитом и эндотелием является результатом синергетического эффекта нескольких макромолекул плазмы [52]. Также при сравнении совокупных данных (рис.33а) с нормированными данными по каждому донору (рис.33б), видна большая разница в силах взаимодействия эритроцита и эндотелия между разными донорами. Это может быть связано с различиями в эндотелии от разных доноров. Нормировка силы взаимодействия по силе при нулевой концентрации фибриногена каждого донора, дает более четкую зависимость (рис.33б).

Также были получены ожидаемые результаты, согласно которым силы агрегации и дезагрегации эритроцитов монотонно возрастают с увеличением концентрации фибриногена (см. рис.34). Эти результаты хорошо согласуются с нашими результатами, полученными ранее для эритроцитов в сыворотке аутологичной крови [226]. Интересно, что силы агрегации эритроцитов и силы взаимодействия

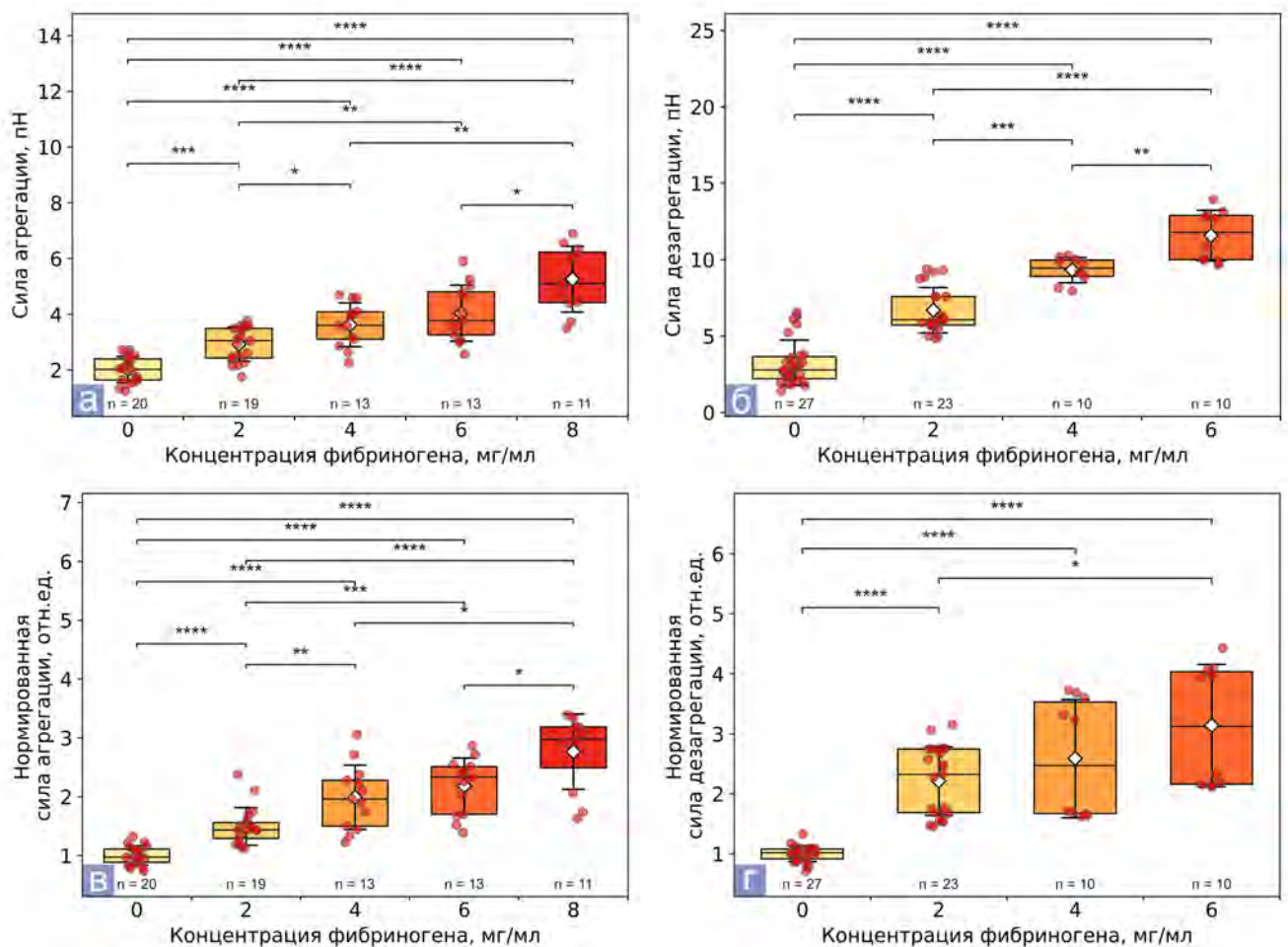


Рис. 34: (а) Зависимость силы агрегации, (б) силы дезагрегации, (в) нормированной силы агрегации (по концентрации 0 мг/мл для каждого донора) и (г) нормированной силы дезагрегации (по концентрации 0 мг/мл для каждого донора) от концентрации бычьего фибриногена, добавляемого в сыворотку крови. Статистическая значимость рассчитана с помощью теста Манна-Уитни. Каждая точка представляет собой одно измерение с одним из образцов от четырех здоровых доноров.

между эритроцитом и эндотелием имеют один порядок. По сравнению с нормированными силами взаимодействия эритроцитов с эндотелием (см. рис.33б), нормированные силы агрегации и дезагрегации демонстрируют разницу между донорами (см. рис.34вг).

Абсолютные значения сил между эритроцитом и эндотелием отличаются от тех же сил в нашей предыдущей работе [199] по нескольким причинам: (1) в этой работе в качестве среды использовалась сыворотка, а не плазма с ЭДТА; (2) использовался монослой эндотелиальных клеток, а не отдельные эндотелиальные клетки. Таким образом, экспериментальный дизайн в данной работе более близок к условиям *in vivo*, чем в предыдущей.

Сила взаимодействия между эритроцитом и эндотелием в физиологических

условиях на уровне одиночных клеток была изучена ранее, насколько известно автору диссертации, в статье Mohandas [112]. В этой статье измерения проводились с помощью метода аспирации микропипеткой, а диапазон сил составлял около 22 пН. Поскольку различные методы измерения сил между одиночными эритроцитами основаны на разных физических принципах, результаты могут сильно зависеть от используемого метода. Например, силы, измеренные с помощью лазерного пинцета, отличаются от сил, измеренных с помощью метода аспирации микропипеткой или атомно-силовой микроскопии [236]. Два последних метода являются прямыми методами, при которых эритроциты подвергаются механическому контакту, и силы агрегации эритроцитов, измеренные с помощью этих методов, находятся в диапазоне нН [237]. Поскольку лазерный пинцет позволяет захватывать клетки без механического контакта, диапазон измеряемых сил лучше соответствует физиологическим условиям, чем при аспирации микропипеткой или атомно-силовой микроскопии.

Также полученные данные были обработаны с использованием нового статистического теста (см. Приложение 3. *Расширение парного пермутационного теста*) с помощью средних значений сил и их стандартных отклонений для каждого донора и каждой концентрации. Было показано, что результаты статистического анализа коррелируют с результатами, полученными для нормированных данных. Так, в частности, наблюдается статистически значимые различия ($p < 0,05$) между силой взаимодействия эритроцита и эндотелия при сравнении концентрации фибриногена 0 мг/мл и 6 мг/мл; а также 0 мг/мл и 8 мг/мл. При искусственном завышении стандартного отклонения сил статистическая значимость пропадает, что является одним из подтверждений состоятельности данного теста.

Полученные результаты опубликованы в статье [238].

4.3 Влияние L-аргинина и L-NAME на взаимодействие эритроцитов и эндотелия

В данном разделе приведены результаты исследования взаимодействия эндотелия и эритроцитов здоровых добровольцев при добавлении L-аргинина, как субстрата для NO-синтазы эндотелия и эритроцитов, и L-NAME, как ингибитора NO-синтазы, в стационарных условиях на уровне отдельных клеток *in vitro* с помощью лазерного пинцета. Другими словами, цель экспериментов состояла в определении влияния оксида азота (NO), вырабатываемого NO-синтазой при уве-

личении концентрации L-аргинина на АЭ и адгезию эритроцитов к эндотелию в условиях *in vitro*.

4.3.1 Подготовка образцов

Кровь для всех экспериментов брали из локтевых вен здоровых доноров мужского пола (N = 4) для получения цельной крови с гепарином лития в качестве антикагулянта.

L-аргинин (Sigma-Aldrich, США) является субстратом NO-синтазы, и заранее был развешан на весах и разведен в дистиллированной воде до достижения концентрации в растворе 100 мМ. Данный раствор был разлит по пробиркам и заморожен. Допускалось только однократное размораживание. Данный маточный раствор дополнительно разбавлялся до необходимой концентрации 10 или 20 мМ и далее добавлялся в лунки платы с эндотелием, и/или в плазму крови (до добавления эритроцитов).

L-NAME (Sigma-Aldrich, США) является неселективным ингибитором синтазы NO и заранее был развешан на весах и разведен в дистиллированной воде до достижения концентрации в растворе 85,7 мМ. Данный раствор был разлит по пробиркам и заморожен. Допускалось только однократное размораживание. Данный маточный раствор дополнительно разбавлялся до необходимой концентрации 40 мМ и добавлялся в лунки платы с эндотелием.

Для каждого донора исследовалось 6 образцов, которые приведены в табл.7.

Таблица 7: Образцы, используемые в экспериментах по влиянию L-аргинина и L-NAME на взаимодействие эритроцитов и эндотелия. «+» – происходило добавление; «-» – не происходило.

№	L-NAME	L-Аргинин к эндотелию	L-Аргинин к эритроцитам
1	—	— +10 мкл дист.вода	— 500 мкл плазмы+5 мкл дист.вода
2	—	+ +10 мкл L-аргинин (10 мМ)	+ 500 мкл плазмы+5 мкл L-аргинин (10 мМ)
3	—	— +10 мкл дист.вода	+ 500 мкл плазмы+5 мкл L-аргинин (10 мМ)
4	—	+ +10 мкл L-аргинин (10 мМ)	— 500 мкл плазмы+5 мкл дист.вода
5	+ +5 мкл L-NAME (40 мМ)	+ +5 мкл L-аргинин (20 мМ)	+ 500 мкл плазмы+5 мкл L-аргинин (10 мМ)
6	+ +5 мкл L-NAME (40 мМ)	+ +5 мкл L-аргинин (20 мМ)	— 500 мкл плазмы+5 мкл дист.вода

В табл.7 «+» – происходило добавление; «-» – не происходило. Конечная кон-

концентрация L-NAME соответствует 200 мкМ в образцах «5,6», концентрация L-аргинина соответствует 100 мкМ в образцах «2,3,5». К эндотелию (1 мл среды) добавлялся L-аргинин (в качестве контроля добавлялась дистиллированная вода), инкубация с L-аргинином длилась 1 час. При добавлении L-аргинина к плазме крови (500 мкл) инкубации не проводилась. При исследовании воздействия L-NAME сначала к эндотелию добавлялся L-NAME, происходила инкубация с ним в течение 1 часа и далее добавлялся L-аргинин, с которым инкубация также длилась 1 час. Инкубация с эндотелием происходила при 37 °С. Добавление дистиллированной воды к плазме было сделано для того, чтобы у всех образцов были одинаковые концентрации белков и осмолярность раствора. Добавление такого количества воды не изменяет форму эритроцита, так как осмолярность изменяется не более, чем на 3-5 мОсм/кг.

4.3.2 Полученные результаты и их анализ

В исследовании А.В. Муравьева [184] о влиянии различных концентраций L-аргинина на агрегационные свойства эритроцитов было выяснено, что максимальный эффект падения АЭ наблюдается при концентрации L-аргинина 100 мкМ. Это же было показано в статье, в которой опубликованы результаты описываемого эксперимента [239]. При этом наблюдается характерная колоколообразная зависимость сил агрегации эритроцитов от концентрации L-аргинина, что объясняется ингибированием NO-синтазы своим же собственным продуктом, т.е. NO [240]. Это происходит в основном при высоких концентрациях NO, что физиологически защищает клетки от цитотоксически высоких концентраций NO. Именно поэтому во всех образцах, в которые добавлялся L-аргинин, его конечная концентрация составляла 100 мкМ.

Результаты измерения сил агрегации и дезагрегации, представленные на рис.35, показали, что добавление L-аргинина к эритроцитам в плазме непосредственно перед экспериментом не вызывает статистически значимых изменений в АЭ (см. рис.35, образец 1 и 2). Учитывая эти результаты, можно сделать вывод, что NO-синтаза эритроцита не вызывает значительных изменений в АЭ. Однако предварительная инкубация эндотелия с L-аргинином вызывает значительное снижение сил АЭ (на рис.35, сравнение образцов 1 и 3-4). На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что (а) добавление L-аргинина к эритроцитам не влечет за собой изменения сил агрегации и дезагрегации в присут-

ствии эндотелия (сравнение образцов 1-2 и 3-4), (б) предварительная инкубация эндотелия с L-аргинином вызывает выработку NO, которая продолжается даже без L-аргинина в образцах во время измерений (образцы 3 и 4), (в) эффект от эндотелий-производного NO проявляется раньше, чем через 15 мин. (среднее время одного измерения, включая время подготовки кюветы, составляет порядка 30-40 мин.). Предварительная инкубация эндотелия с L-NAME нивелирует влияние NO на АЭ (образцы 5 и 6), что еще больше подтверждает гипотезу о влиянии эндотелий-производного NO на АЭ. Измеренные силы агрегации и дезагрегации составляли от 4 до 6 пН.

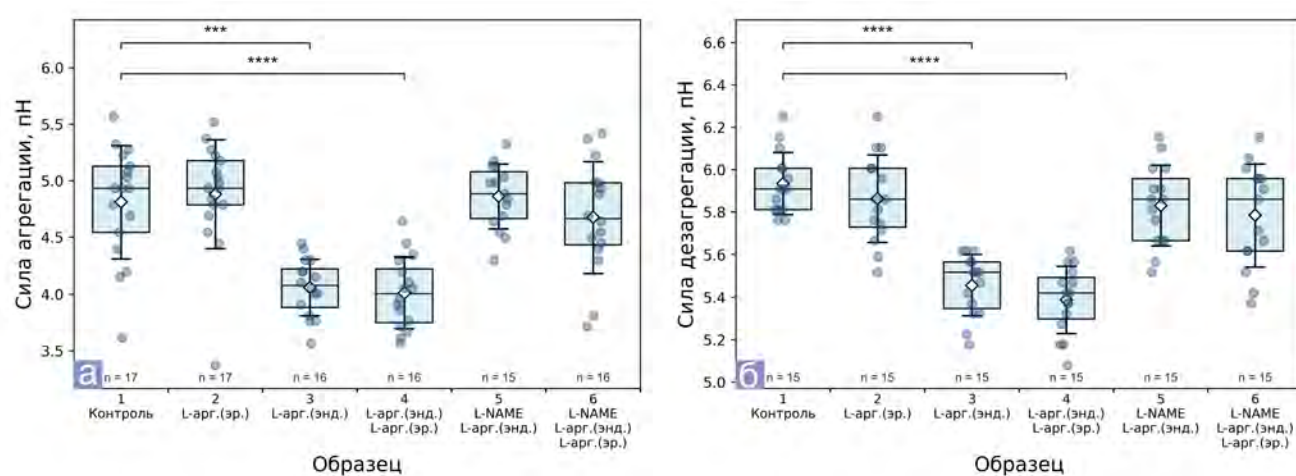


Рис. 35: (а) Зависимость силы агрегации, (б) силы дезагрегации, от образца при добавлении L-аргинина/L-NAME (см. табл.7). Статистическая значимость рассчитана с помощью теста Манна-Уитни и графически отображена только между 1 и 3, а также 1 и 4 образцами. Каждая точка представляет собой одно измерение с одним из образцов от четырех здоровых доноров.

Зависимость силы взаимодействия между эндотелием и эритроцитами для разных образцов при добавлении L-аргинина/L-NAME представлена на рис.36. Ни L-аргинин, ни L-NAME не вызывали значительных изменений в силе адгезии эритроцитов к эндотелию ни в одном из исследуемых образцов. Измеренные силы составляли от 0,5 до 1 пН. Это значит, что при рассмотрении эритроцитов здоровых людей и эндотелия в физиологическом состоянии, L-аргинин не влияет на взаимодействие эритроцит-эндотелий.

Полученные результаты опубликованы в статье [239].

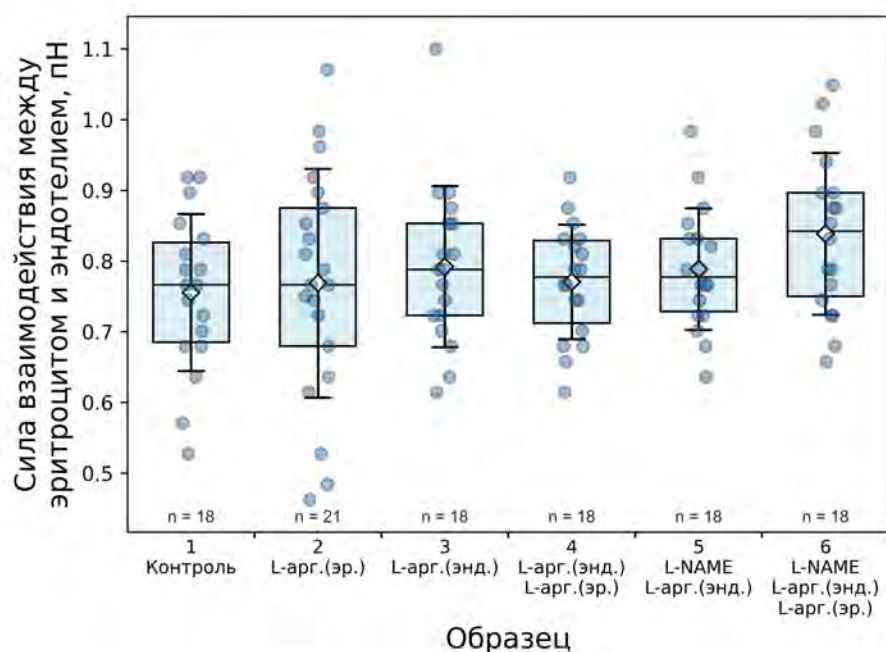


Рис. 36: Зависимость силы взаимодействия между эритроцитом и эндотелием от образца при добавлении L-аргинина/L-NAME (см. табл.7). Статистическая значимость рассчитана с помощью теста Манна-Уитни. Каждая точка представляет собой одно измерение с одним из образцов от четырех здоровых доноров.

4.4 Гидродинамическая прочность эритроцитарных агрегатов в микрофлюидном канале, выстланном эндотелиальными клетками

В данном разделе приведены результаты исследования влияния покрытия микрофлюидного канала кюветы RheoScan эндотелиальными клетками HUVEC на микрореологические параметры крови *in vitro*.

4.4.1 Подготовка образцов

Эндотелиальные клетки (HUVEC) для данных экспериментов были предоставлены Институтом биологии развития имени А.В. Кольцова РАН. Эндотелиальные клетки культивировались в культуральных колбах с коллагеновым покрытием в стандартных условиях (инкубация при 37 °C и 5%-CO₂) в среде M199, дополненной солями Эрла (PanEco), содержащей 10% FBS (HyClone), 1x Glutamax (Gibco), 1x ITS (Gibco), 10 нг/мл EGF (Invitrogen), 10 нг/мл FGF (PeproTech) и 8000 Ед/мл гепарина (Sigma). Использовались клетки из 2-6 пассажа.

Для экспериментов по лазерной агрегометрии суспензию эндотелиальных клеток вводили в микроканал кюветы RheoScan (тип RSD-K01, см. рис.18), предва-

рительно покрытого коллагеном I-го типа. Перед введением клеток кюветы стерилизовали ультрафиолетовым облучением. После инъекции чипы выдерживали в инкубаторе в течение 2 часов, чтобы все клетки в суспензии прикрепились к поверхности канала. В течение первых 30 мин. инкубационного периода кювета периодически поворачивалась для поддержания однородного покрытия поверхности микроканала.

В эксперименте использовались образцы цельной крови 6 здоровых доноров (возраст 22-29 лет) и 5 пациентов с АГ (возраст 54-73 лет). У всех рассматриваемых пациентов была диагностирована АГ, однако у 4 из 5 было также сопутствующее заболевание ИБС, и у 2 из 5 – ФП. Небольшая выборка не позволяет разделить пациентов на подгруппы.

4.4.2 Результаты и обсуждения

Полученные результаты представлены на рис.37. Значения CSS в крови пациентов с АГ статистически значимо выше, чем значения CSS , измеренные в образцах крови здоровых доноров как в кюветах с их покрытием эндотелиальными клетками, так и без: 209 ± 52 мПа в крови здоровых доноров и 306 ± 69 мПа в крови пациентов с АГ (без покрытия эндотелиальными клетками); 142 ± 44 мПа в крови здоровых доноров и 234 ± 47 мПа в крови пациентов с АГ (с покрытием эндотелиальными клетками). В случае присутствия эндотелия статистическая значимость различий между здоровыми донорами и пациентами в 2 раза выше, согласно U-тесту Манна-Уитни (см. рис.37). Это свидетельствует о том, что культивирование клеток эндотелия в канале кюветы позволило значительно повысить чувствительность лазерной агрегометрии к микрореологическим нарушениям кровотока при АГ. Также видно, что покрытие микроканала эндотелием привело к статистически значимому снижению CSS как в норме, так и при АГ. Статистическая значимость для зависимых выборок рассчитывалась с помощью критерия Уилкоксона, а также дополнительно делался расчет с помощью нового критерия, описанного автором в *Приложении 3. Расширение парного пермутационного теста*, который также показал наличие статистической значимости ($p < 0.05$).

Важно отметить, что приложение внешнего сдвигового напряжения при измерении агрегационных и дезагрегационных свойств эритроцитов в условиях потока не влияет на физиологическое состояние эндотелиальных клеток в микрофлюидном канале. Напряжения сдвига в приборе RheoScan при измерении CSS в среднем

составляют до 20 Па, что не должно приводить к изменениям в эндотелиальных клетках. Статистически значимое снижение CSS при наличии эндотелия в канале скорее всего связано с тем, что при наличии эндотелия создаются улучшенные гидродинамические условия для кровотока в микрочипе с щелевой прямоугольной геометрией.

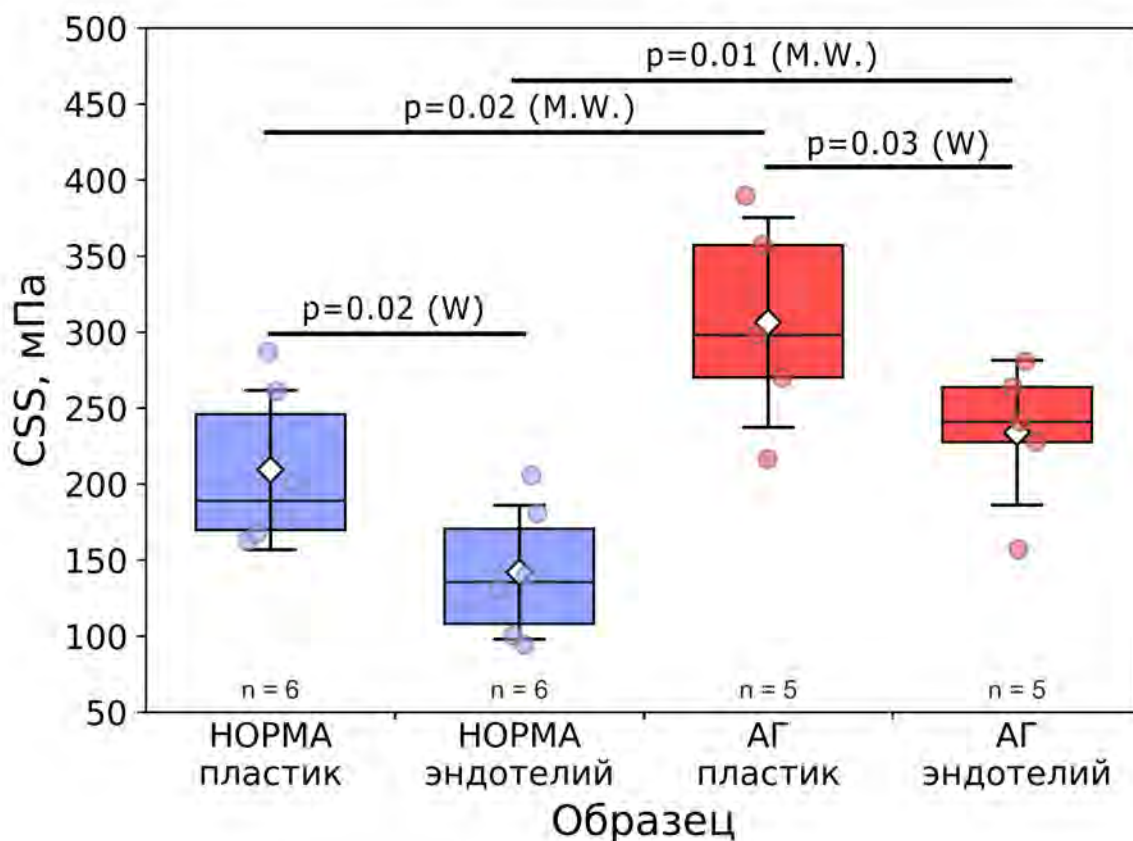


Рис. 37: Влияние покрытия пластикового микрофлюидного канала кюветы RheoScan эндотелиальными клетками на гидродинамическую прочность агрегатов (CSS) цельной крови здоровых доноров (НОРМА) и пациентов с артериальной гипертензией (АГ). Каждая точка представляет собой среднее значение CSS одного человека. M.W. — U-тест Манна-Уитни; W — критерий Уилкоксона.

Однако механизмы, приводящие к изменению потока и микрореологических параметров крови при покрытии искусственных каналов эндотелиальными клетками еще не до конца изучены. С одной стороны, считая толщину монослоя эндотелия равной 0,1-10 мкм [106], можно ожидать изменения в профиле скоростей потока в прямоугольном канале кюветы. Действительно, при уменьшении ширины и высоты прямоугольного плоского канала, согласно уравнению неразрывности для потока несжимаемой жидкости, скорость потока увеличивается, если объ-

емный расход Q остается постоянным. Последнее, в свою очередь, приводит к увеличению средней величины напряжения сдвига.

Согласно данной гипотезе сдвиговые напряжения в каналах с эндотелием выше, и эритроцитарные агрегаты разделяются легче, поскольку измеряемое значение CSS рассчитывается по заданной толщине канала и разности давлений между двумя резервуарами (см. рис.18). Однако стоит также учитывать влияние неровности поверхности монослоя эндотелия на пристеночные сдвиговые напряжения. Действительно, в статье [241] показано, что среднее напряжение сдвига в канале, покрытом эндотелиальными клетками, увеличивается с ростом величины вариаций толщины монослоя эндотелия.

Дополнительно нами было проведено численное моделирование влияния шероховатой поверхности, моделирующей поверхность монослоя эндотелия, по сравнению с гладкой поверхностью на пристеночные сдвиговые напряжения. Моделирование было проведено с помощью программного комплекса COMSOL Multiphysics 6.1¹³ с использованием модуля Laminar Flow, в основе которого лежат уравнения Навье-Стокса. Рассматривалась часть микроканала кюветы RheoScan с длиной 0,3 мм и со стандартным прямоугольным профилем (5x0,2 мм). На концах канала были выставлены граничные условия по давлению: $P_{\text{вход}} = 1$ Па и $P_{\text{выход}} = 0$ Па. Рассматривалось течение по данному каналу ньютоновской жидкости с вязкостью $\eta = 1$ мПа*сек. Рассматривались 2 случая: гладкая поверхность, моделирующая поверхность канала пластиковой кюветы, и шероховатая поверхность, моделирующая монослой эндотелия. После получения результатов моделирования рассчитывались максимальные и средние значения пристеночных сдвиговых напряжений, а также среднее значение сдвиговых напряжений в объеме. Результаты моделирования представлены в табл.8. Из полученных результатов видно, что средние значения сдвигового напряжения по объему почти не отличаются при сравнении шероховатой и гладкой поверхностей. Однако отличаются максимальные значения пристеночного сдвигового напряжения, что свидетельствует о том, что при наличии шероховатой поверхности (т.е. поверхности монослоя эндотелия) увеличивается вариативность пристеночных сдвиговых напряжений, в то время как средние значения изменяются не столь значимо. Возможно, именно этот факт может объяснить большие различия в CSS при рассмотрении кюветы, покрытой эндотелиальными клетками.

¹³<https://www.comsol.com/product-download/6.1>

Таблица 8: Влияние шероховатой поверхности на сдвиговые напряжения к кювете. Моделирование осуществлялось для ньютоновской жидкости для градиента давления $\Delta P = 3,33$ Па/мм.

Сдвиговое напряжение	Гладкая поверхность, моделирующая пластик	Шероховатая поверхность, моделирующая эндотелий
Максимальное пристеночное, мПа	1026	2373
Среднее пристеночное, мПа	326	322
Среднее по объему, мПа	168	167

Полученные результаты позволяют лишний раз подчеркнуть, что эндотелий существенным образом влияет на кровоток, что также оказывает влияние на перфузию тканей.

Полученные результаты опубликованы в статье [242].

4.5 Влияние температуры на агрегацию эритроцитов

В данном разделе приведены результаты исследования влияния температуры на агрегацию эритроцитов *in vitro* с помощью лазерного агрегометра эритроцитов RheoScan.

4.5.1 Подготовка образцов

Кровь для всех экспериментов брали из локтевой вены одного здорового донора мужского пола и стабилизировали ЭДТА К3 антикоагулянтом. Для экспериментов использовали цельную кровь, находящуюся перед помещением её в кювету, при комнатной температуре (22 °C). Поскольку прибор RheoScan устроен таким образом, что может только нагревать образец и поддерживать выставленную температуру, то все измерения шли от более низкой к более высокой температуре. Образец помещался в кювету RSA-C01 («маленькую») или RSD-K01 («большую»), и затем кювета помещалась в измерительную ячейку, где образец прогревался перед началом измерения в течение 2 мин. для кюветы RSA-C01 и в течение 5 мин. для кюветы RSD-K01. Были проведены тестовые эксперименты, которые показали, что за данный промежуток времени образец крови успевает прогреться до выставленной температуры.

4.5.2 Полученные результаты и их анализ

Зависимость агрегационных свойств эритроцитов от температуры цельной крови измерялась в диапазоне 34 – 45 °С. Важно заметить, что денатурация белков плазмы уже начинается при 43 °С, в связи с чем температуры 43 – 45 °С хоть и не являются физиологическими, однако важны для общего понимания влияния температуры на АЭ. Полученные зависимости параметров АЭ, измеренных на «маленькой» кювете приведены на рис.38. Из данных зависимостей видно, что температура влияет на время образования линейных агрегатов (рис.38в), но не 3D агрегатов (рис.38г). Это также хорошо видно для индексов агрегации при 2,5 и 10 сек., поскольку для 2,5 сек. коэффициент Пирсона больше 0,7, а для 10 сек. – чуть больше 0,5. По полученным данным можно сказать, что АЭ растет при увеличении температуры с 34 до 45 °С.

Также были проведены измерения для «большой» кювете для температур образца 25 – 43 °С. Полученные данные соответствуют результатам, полученным в статье [243], где диапазон температур был выбран от 4 до 37 °С. В приведенной статье показано, что гидродинамическая прочность агрегатов (CSS) сначала уменьшается с ростом температуры, а затем увеличивается. Точка перегиба соответствует примерно 25 °С.

Причина повышения АЭ в цельной крови с ростом температуры может быть объяснена в рамках изменения вязкости плазмы. При повышении температуры вязкость плазмы уменьшается, и эритроцитам становится легче перемещаться в объеме и взаимодействовать друг с другом. В статье [244] было показано, что влияние температуры на скорость образования эритроцитарных агрегатов можно устранить путем умножения индекса агрегации на вязкость плазмы, соответствующую выставленной температуре. Исходя из этого, можно сделать вывод, что поскольку линейные агрегаты более подвижны в связи со своими размерами, температура влияет на них больше, чем на 3D агрегаты.

Температура влияет и на деформируемость эритроцитов, что также сказывается на их агрегации [245].

Причина немонойной зависимости CSS от температуры не объяснена, и скорее всего кроется в том, что прочность агрегатов не всегда коррелирует с параметрами спонтанной АЭ. Требуются дальнейшие исследования влияния температуры на гидродинамическую прочность агрегатов.

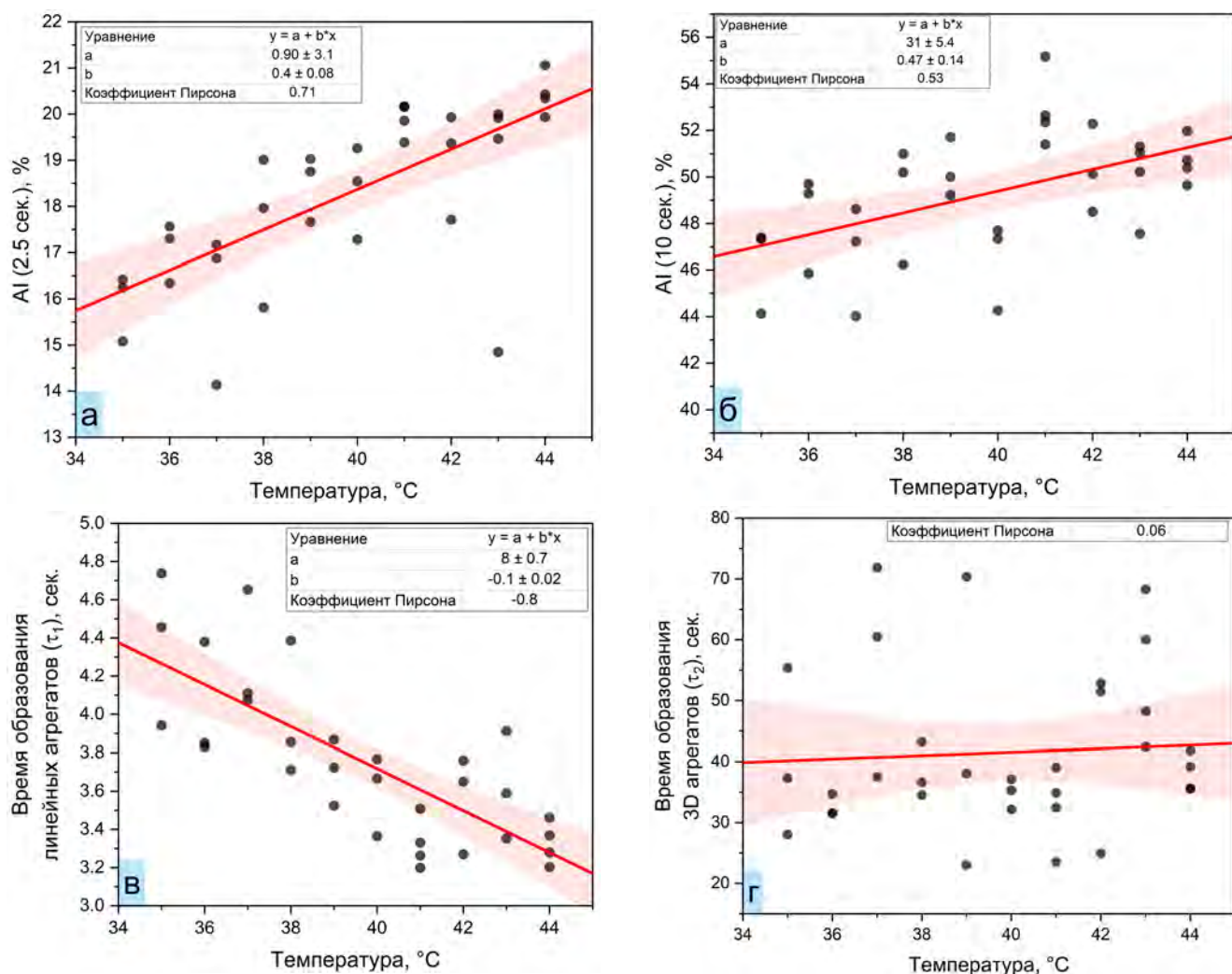


Рис. 38: Зависимость параметров индекса агрегации (AI) для (а) 2.5 сек. и (б) для 10 сек.; (в) времени образования линейных и (г) 3D агрегатов от температуры. Закрашенная область – 95% доверительный интервал. Каждая точка соответствует одному измерению на одном образце крови.

Часть полученных результатов опубликована в [246]. См. также зависимость АЭ от температуры в растворе декстрана в статье [58].

ГЛАВА 5. СОЗДАНИЕ ПОРТАТИВНОГО ЭРИТРОЦИТАРНОГО АГРЕГОМЕТРА

5.1 Лазерные агрегометры для исследования агрегационных свойств эритроцитов

Лазерные агрегометры для изучения АЭ могут быть построены на основе фотометрического метода (коллимированного пропускания света через слой крови) [4], светорассеяния в разные углы [4], анализа лазерных спеклов [247] и др.

В конструкции лазерного агрегометра должно быть предусмотрено, чтобы образец крови перед измерением мог подвергаться достаточно высокой и желательно контролируемой скорости сдвига $\dot{\gamma}$ или напряжения: эритроцитарные агрегаты в плазме крови для здорового человека почти полностью разрушаются при $\dot{\gamma} > 100 \text{ c}^{-1}$ [4]. В большинстве агрегометров максимальная сдвиговая скорость выбирается в районе $\dot{\gamma} = 500 \text{ c}^{-1}$. Существуют разные механизмы дезагрегации крови: ячейка Куэтта, система конус-плита, система плита-плита, с помощью микрофлюидики и наноса или с помощью механического перемешивания крови (см. §4.1.6.1 в [4]).

На данный момент существует несколько коммерчески доступных агрегометров, которые способны оценивать параметры агрегации эритроцитов по сигналу светорассеяния, среди которых можно перечислить следующие: Myrenne¹⁴ (Myrenne, Германия) [122], LORCA (Mechatronics, Нидерланды») [123] и RheoScan (RheoMeditech Inc., Южная Корея) [124—126]. В агрегометре RheoScan используются: лазер с длиной волны $\lambda = 635 \text{ нм}$, микрофлюидная система и перемешивание с помощью магнитной мешалки в качестве механизма дезагрегации крови, объем крови для измерения — 10 мкл или 500 мкл, есть контроль температуры. В агрегометре LORCA используются: лазер с длиной волны $\lambda = 670 \text{ нм}$, ячейка Куэтта для дезагрегации крови, объем крови для измерения — 1 мл, есть контроль температуры. В агрегометре Myrenne используются: светодиод с длиной волны порядка $\lambda \approx 700 \text{ нм}$, ячейка конус-плита для дезагрегации крови, объем крови для измерения — 30-50 мкл, нет контроля температуры. В статье [248] приведено сравнение трех перечисленных агрегометров.

Также важно упомянуть про эритроцитарный агрегометр и деформометр LADE

¹⁴По данным из интернета в настоящее время агрегометр Myrenne не выпускается. Однако, учитывая, что эта марка была одной из наиболее массовых по объему производства, ее можно приобрести на вторичном рынке в бывшем в употреблении состоянии.

(Реомедлаб, Россия) [124, 249, 250], который, к сожалению, не присутствует на настоящий момент на рынке. Также на рынке присутствовал агрегометр Sefam Erythroaggregometer (Regulest, Франция) [251].

Также нельзя не упомянуть про развивающийся стартап Rheofast во Франции, предлагающий готовый прототип эритроцитарного агрегометра, в который необходимо всего лишь вставить пробирку с кровью после её взятия и отсутствует необходимость использовать какие-либо другие кюветы [252, 253]. Механизм дезагрегации эритроцитов заключается во вращении пробирки с частотой 1 Гц, что создает в образце крови сдвиговые скорости порядка 1000 c^{-1} .

Также есть ряд работ, в которых эритроцитарные агрегометры делались в единичном экземпляре или по несколько штук с целью демонстрации нового технологического подхода в изучении АЭ или для лабораторного изучения АЭ.

В 2003 году S.Shin и соавторы продемонстрировали эффект влияния вибраций на течение крови в искусственном капилляре [254]. В 2004 году они представили агрегометр, в котором эритроцитарные агрегаты разрушались с помощью вибродинамика (частота: 100 Гц; амплитуда: 0,5 мм) и детектировалось коллимированное светопропускание [255], а в 2005 году — агрегометр также с использованием вибрационного механизма дезагрегации (частота: 150 Гц; амплитуда: 0,5 мм), в котором детектировалось обратное диффузное рассеяние света кровью [256]. Полученные результаты с данных агрегометров нельзя сравнивать между собой, так как полученные агрегационные параметры отличаются при анализе света, рассеянного вперед и назад [257].

В статье [258] продемонстрирован агрегометр с вибрационным мотором и одноразовыми кюветами, изготовленными из полидиметилсилоксана (ПДМС). В данном агрегометре в качестве фотодетектора используется камера.

В магистерской диссертации A.Terregos был сконструирован портативный эритроцитарный агрегометр, кровь в котором помещалась в капиллярную трубку [259]. Дезагрегационный механизм представлял собой линейный мотор, который производил поступательное движение, необходимое для деформации кремниевой мембраны, прикрепленной к капиллярной трубке (диаметр 1 мм).

В статье [260] дезагрегационный механизм заключался в перемешивании образца крови, после которого с помощью дозатора образец помещается в измерительную ячейку и измеряется коллимированное пропускание света.

Также нельзя не упомянуть агрегометр, изобретенный Р.Т. Тухватулиным и

использованный им в докторской диссертации для изучения АЭ людей и 82 видов животных [261]. В данном агрегометре кровь дезагрегируется с помощью пьезоэлемента (частота: 1-20 кГц; амплитуда: 0,1-1 мкм) [262]. Важно отметить, что механическое воздействие в данном приборе перпендикулярно к поверхности пробы, в отличие от вибрационных агрегометров S.Shin и A.Terreros.

Цель данной части диссертационной работы заключалась в создании портативного эритроцитарного агрегометра, который способен оценивать агрегационные параметры эритроцитов и имеет ряд преимуществ по сравнению с аналогами. Механизм дезагрегации планировалось выполнить на основе вибродинамика, индуцирующего поперечные вибрации кюветы с кровью на малых частотах (<200 Гц). К преимуществам данного агрегометра над большинством перечисленных выше можно отнести малые габаритные размеры (не больше 20x15x15 мм (Дх-ШхВ)), простота измерений (создание полноценного ПО под агрегометр), новые параметры измерений, а также низкая себестоимость как прибора, так и расходных материалов. Прделанная работа выполнена в рамках проекта УМНИК по договору 18618ГУ/2023.

5.2 Воздействие вибраций на сдвиговые скорости в кювете: численное моделирование

Для дезагрегации эритроцитов с помощью механических вибраций крайне важно подобрать частоту и амплитуду колебаний в тех диапазонах, в которых эритроцитарные агрегаты разделялись бы на отдельные эритроциты, но ещё не происходило бы гемолиза крови, т.е. разрушения эритроцитов. Гемолиз, индуцированный сдвиговым потоком, зависит от времени воздействия и сдвиговой скорости. Соответственно, чем меньше время воздействия, тем при больших сдвиговых скоростях происходит гемолиз.

Сдвиговая скорость около стенки сосуда у здорового человека не превышает 2000 c^{-1} и максимальна в артериях и капиллярах (см. раздел 7,1 в [4]). Однако при стенозе артерии просвет сосуда уменьшается, и сдвиговая скорость может увеличиться до 40000 c^{-1} [263]. Существует ряд моделей, рассматривающих вызванный вибрациями гемолиз эритроцитов [264, 265]. При больших временах (порядка 100 сек.) частичный гемолиз наблюдается уже при напряжении сдвига 50 Па, что в свою очередь для плазмы крови соответствует сдвиговой скорости $\dot{\gamma} \sim 39000 \text{ c}^{-1}$ [266].

Именно поэтому необходимо было провести численное моделирование влияния вибраций на вызванные ими сдвиговые скорости в кювете с кровью.

5.2.1 Программный комплекс и начальные условия моделирования

Для гидродинамического моделирования (т.е. для расчета сдвиговых напряжений и скоростей в кювете при наличии вибраций) был использован программный комплекс COMSOL Multiphysics 6.1¹⁵ с использованием модуля Laminar Flow, в основе которого лежат уравнения Навье-Стокса. Моделировался участок кюветы в виде параллелепипеда с длиной и шириной равными 10 мм и высотой — 200 мкм. Все граничные участки кюветы принимались за стенки, кроме двух противоположных боковых граней по направлению вибраций, которые принимались за вход и выход потока с нулевыми скоростями на них в качестве граничных условий. В данном моделировании сделано предположение, что кювета вибрирует с той же частотой и амплитудой, что и вибрационное устройство. Поэтому вибрации моделировались движением стенок ($x(t)$) по одному направлению по гармоническому закону с амплитудой A и частотой f : $x(t) = A \times \sin(2\pi ft)$. Соответственно, скорость стенок $\dot{x}(t)$ задавалась: $\dot{x}(t) = 2\pi f A \times \cos(2\pi ft)$.

Вязкость крови η зависит от сдвиговых скоростей $\dot{\gamma}$. При моделировании использовалась модель Carreau, представленная уравнением 5.1 [267]:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_{\text{inf}} + (\eta_0 - \eta_{\text{inf}}) \left[1 + (\lambda \eta_{\text{inf}})^2 \right]^{\frac{n-1}{2}}, \quad (5.1)$$

где η_{inf} — это вязкость крови при стремлении сдвиговой скорости к бесконечности, η_0 — это вязкость крови при стремлении сдвиговой скорости к нулю, а λ , n — коэффициенты. Значения используемых параметров приведено в табл.9.

Таблица 9: Численные значения параметров η_{inf} , η_0 , λ , n в используемой модели вязкости крови Carreau. Параметры η_0 , λ , n взяты из [267], а η_{inf} оценена по верхней границе нормы [268].

η_{inf} , мПа*сек.	η_0 , мПа*сек.	λ , сек.	n
5,5	56	3,131	0,3568

Моделирование осуществлялось во временном промежутке в несколько перио-

¹⁵<https://www.comsol.com/product-download/6.1>

дов колебаний, а затем рассчитанные сдвиговые скорости усреднялись по объему.

5.2.2 Влияние амплитуды и частоты вибраций на сдвиговые скорости в кювете

Был проведен расчет средних сдвиговых скоростей, возникающих в объеме кюветы при её вибрации с амплитудами от 0,1 мм до 1 мм и частотами от 50 до 1000 Гц. Полученные данные представлены на рис.39. Как было сказано выше, для большинства агрегометров дезагрегационный механизм позволяет получать сдвиговые скорости $\dot{\gamma} > 500 - 600 \text{ с}^{-1}$, что достаточно для полной дезагрегации эритроцитов. На рис.39 видно, что при частотах выше 100 Гц и амплитудах больше 0,4 мм это условие выполняется. Также наблюдается, что при увеличении частоты сдвиговая скорость при одной и той же амплитуде увеличивается — верно и обратное. Важно заметить, что приведенная оценка сдвиговых скоростей на рис.39 является оценкой сверху, и в реальном эксперименте ряд допущений, сделанных при моделировании, будет сильно влиять на полученный результат. К данным допущениям в первую очередь относится полная передача скорости вибрации от вибрационного механизма кювете и ламинарный поток крови. Дополнительно, в общем случае, при сохранении одного энергетического порога, чем больше частота колебаний, тем меньше их амплитуда; поэтому колебания с частотой 1000 Гц и амплитудой 1 мм будут определено труднодостижимы.

Полученные данные, если абстрагироваться от геометрии кюветы, согласуются с данными из работ [255, 256], в которых использовались частоты 100/150 Гц с амплитудой колебаний 0,5 мм. При данных параметрах в приведенном моделировании средние сдвиговые скорости по объему $\dot{\gamma} > 800 \text{ с}^{-1}$. Также была проведена аппроксимация данных средних сдвиговых скоростей от амплитуды и частоты. Было обнаружено, что при фиксированной амплитуде колебаний сдвиговые скорости зависят от частоты сначала квадратично, а потом, когда значения $\dot{\gamma}$ больше порогового $\dot{\gamma}_{\text{порог}}$ — линейно. Т.е. зависимость представляется в виде: $\dot{\gamma}(f)|_{A=\text{const}} = \sqrt{1 + b \times (f)^2} -$, где b, c — коэффициенты, зависящие от A . При фиксированной частоте колебаний сдвиговые скорости зависят от амплитуды линейно, т.е. $\dot{\gamma}(A)|_{f=\text{const}} = d \times A$, где d — коэффициент, зависящий от f .

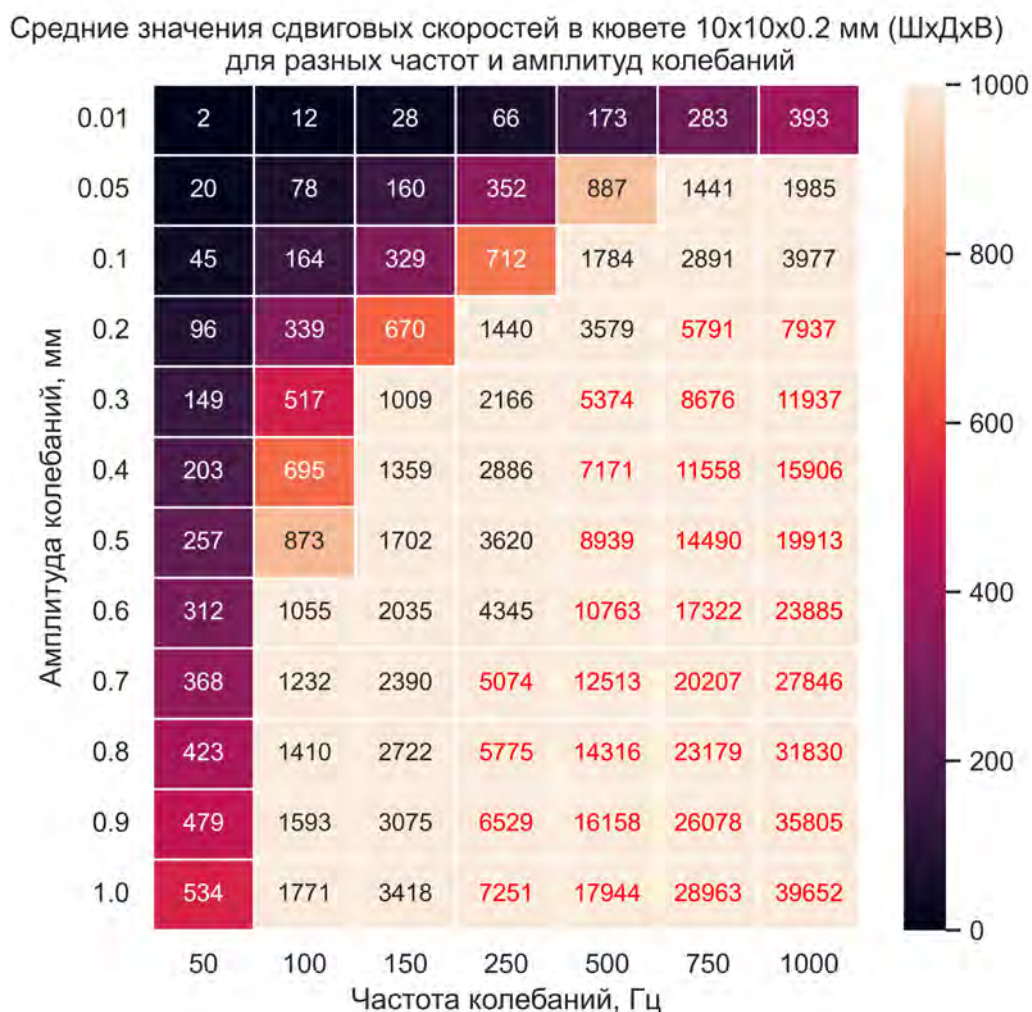


Рис. 39: Средние значения сдвиговых скоростей в объеме кюветы при разных частотах и амплитудах колебаний. Красным цветом выделены скорости $\dot{\gamma} > 5000 \text{ c}^{-1}$, которые вероятно, трудно достижимы в реальном эксперименте из-за допущений, сделанных при моделировании. Сдвиговые скорости в таблице приведены в единицах c^{-1} .

5.2.3 Зависимость сдвиговых скоростей от толщины кюветы

Было изучено влияние высоты канала на средние сдвиговые скорости в кювете и получены результаты для разных частот. В частности, для частоты 150 Гц и амплитуды 0,5 мм полученная зависимость приведена на рис.40, которая с хорошей точностью аппроксимируется логнормальным распределением. Видно, что при данной частоте и амплитуде колебаний канал толщиной 200 мкм является оптимальным. Было обнаружено, что оптимальная высота канала зависит от амплитуды и частоты колебаний, в частности, при увеличении последней значение оптимальной высоты уменьшается. Однако в районе низких частот порядка 100-200 Гц и амплитуд колебаний 0,4-0,7 мм, оптимальная высота кюветы составляет,

как было сказано выше, порядка 200 мкм.

Также было проведено моделирование каналов с разной длиной и шириной, но существенных отличий в получаемых результатах сдвиговых скоростей между ними не было обнаружено.

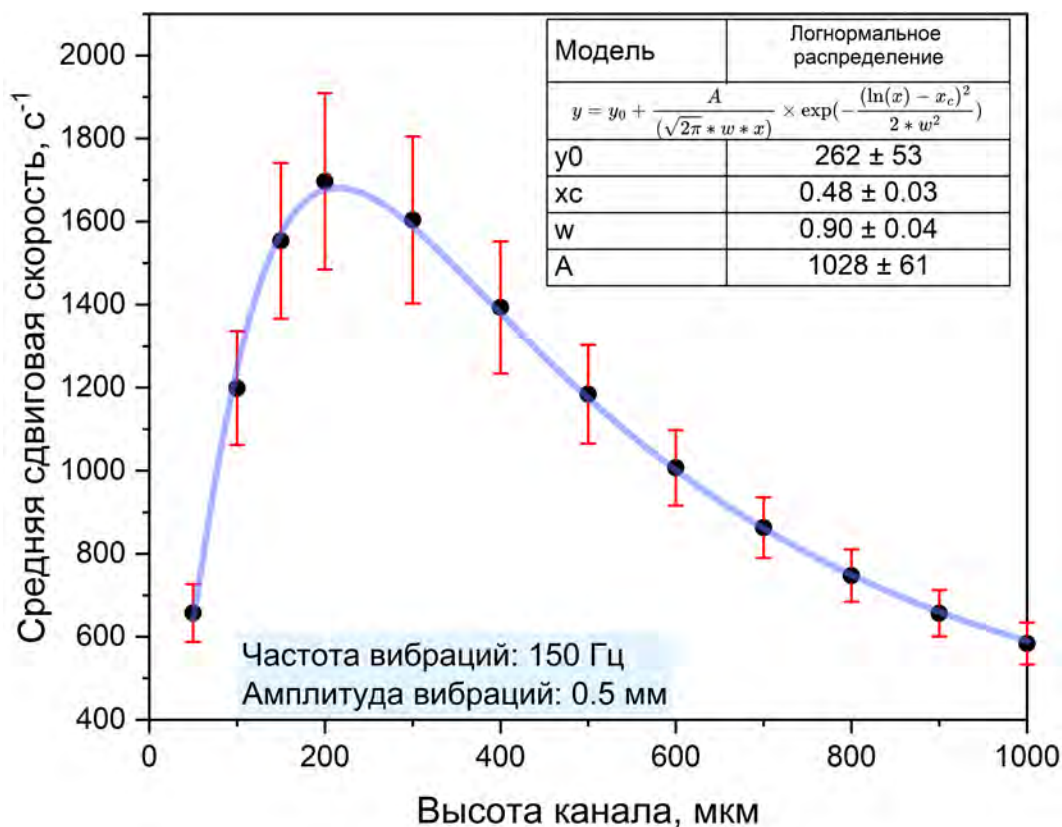


Рис. 40: Средние значения сдвиговых скоростей в объеме при разных высотах канала кюветы при фиксированной частоте и амплитуде колебаний ($f = 150$ Гц; $A = 0,5$ мм).

5.3 Портативный лазерный агрегометр крови

В данном разделе представлено описание портативного лазерного агрегометра модели «ПЛАК-1»¹⁶.

Также в рамках проделанных работ был создан агрегометр модели «ПЛАК-mini». У этого агрегометра нет встроенного механизма дезагрегации эритроцитов. Вместо этого дезагрегация образца крови осуществляется путем его перемешивания дозатором в пробирке в течении 1 минуты, по аналогии как в статье [260]. Агрегометр модели «ПЛАК-mini» не обсуждается в данной диссертации, однако его подробное описание доступно в инструкции к сборке агрегометров, которая

¹⁶ Аббревиатура ПЛАК образована от Портативный Лазерный Агрегометр Крови

находится на удаленном хранилище лаборатории Биомедицинской фотоники МГУ имени М.В. Ломоносова.

5.3.1 Принципиальная схема установки

Принципиальная схема установки портативного эритроцитарного агрегометра модели «ПЛАК 1» приведена на рис.41.

Кювета для измерений создается на основе предметного и покровного стекол, а также 1 слоя двухстороннего скотча (фирма: 3М, толщина: 200 мкм). В стык между предметным и покровным стеклом с помощью дозатора помещается необходимое количество крови (порядка 100-200 мкл), и далее кювета помещается на площадку, один край которой прикреплен к пружине, а другой — к вибродинамику.

Вибродинамик позволяет создавать вибрации, индуцирующие дезагрегацию



Рис. 41: Принципиальная схема портативного эритроцитарного агрегометра модели «ПЛАК 1». Лазерный пучок разделяется на два пучка: один пучок попадает на референсный фотодиод, а второй проходит через кювету с образцом крови и попадает на основной фотодиод. Вибродинамик позволяет создавать вибрации, индуцирующие дезагрегацию эритроцитов.

эритроцитов. С помощью разработанной программы (см. пункт *Программное обеспечение для агрегометра*) можно задавать различные частоты вибраций. В ходе экспериментов была подобрана частота для используемого вибродинамика порядка 120 Гц, как наилучшая для дезагрегации эритроцитов. Для каждого вибродинамика существует своя амплитудно-частотная характеристика, именно

поэтому при использовании другого вибродинамика необходимо провести ряд тестовых измерений при разных частотах колебаний, чтобы наилучшим образом подобрать значения частоты и амплитуды колебаний для дезагрегации эритроцитов. Дополнительно, пружины подобраны таким способом, чтобы «пружинный маятник» (пружины+подложка для кюветы+кювета) имел резонансную частоту порядка 120-150 Гц. Положение вибродинамика должно быть выставлено таким способом, чтобы пружина не сжималась слишком сильно, что может препятствовать передаче вибраций от вибродинамика.

После дезагрегации эритроцитов одновременно регистрируются показания с референсного и основного фотодиодов в течение заданного времени. На референсном фотодиоде регистрируется мощность пучка, отраженного от светоделительной пластины ($T = 96\%$, $R = 4\%$). На основном фотодиоде регистрируется мощность пучка коллимированного пропускания через образец крови. Данная мощность зависит от среднего размера рассеивающих агрегатов в кювете, и именно поэтому регистрируемое показание на основном фотодиоде будет соответствовать характерному размеру рассеивателей — чем больше будет значение коллимированного пропускания, тем больше характерный размер агрегатов.

Несмотря на то, что диодный лазер питается от источника постоянного тока, его мощность незначительно изменяется во времени. Для коррекции сигнала коллимированного пропускания используются показания с референсного фотодиода. К сожалению, из-за высокоуглового паразитного сигнала, разных мощностей пучков, прошедшего и отраженного от светоделительной пластины, а также ряда других причин, для коррекции сигнала недостаточно поделить сигнал с основного фотодиода $I_{\text{осн}}$ на сигнал референсного $I_{\text{реф}}$. Вместо этого после измерения референсный сигнал нормируется на максимальное значение референсного сигнала при всем времени измерения:

$$I_{\text{реф}}^{\text{норм}} = \frac{I_{\text{реф}}}{\text{MAX}(I_{\text{реф}})}, \quad (5.2)$$

где $I_{\text{реф}}^{\text{норм}} \times 100\%$ показывает изменение референсного сигнала в процентах во времени.

Далее основной сигнал $I_{\text{осн}}$ корректируется с помощью нормированного референсного сигнала $I_{\text{реф}}^{\text{норм}}$, а также весов n и m :

$$I_{\text{осн}}^{\text{корр}} = \frac{(n + m)I_{\text{осн}}}{n + mI_{\text{реф}}^{\text{норм}}}, \quad (5.3)$$

где веса n и m соответствуют весу основного и референсного сигнала соответственно. Данные веса подбираются эмпирически с помощью затемненной пластины или стабильной во времени рассеивающей структуры на месте кюветы. Программа для взаимодействия с агрегометром позволяет автоматически производить коррекцию сигнала по заданным весам (см. пункт *Программное обеспечение для агрегометра*).

Стоит обратить внимание, что сигнал с лазерного диода всё же изменяется слабо, и приведенная выше методика коррекции сигнала с основного фотодиода позволяет дополнительно в небольшой степени повысить точность измерения.

5.3.2 Электрическая схема агрегометра

Электрическая схема установки портативного эритроцитарного агрегометра модели «ПЛАК 1» приведена на рис.42. Все электронные компоненты подсоединены к входам/выходам микроконтроллера Ардуино Uno R3, который в свою очередь подсоединен к внешнему источнику питания 12 В и к персональному компьютеру через USB.

Компоненты электрической схемы агрегометра можно разделить на 4 модуля: модуль лазерного диода, модуль вибродинамика, модуль фотодиодов и модуль температуры. Модуль вибродинамика и фотодиодов следует разместить на одной плате, так как они имеют общее питание 5 В.

Лазерный диод питается от источника постоянного тока на основе NPN транзистора, стабилитрона и резисторов. Изменяя сопротивление подстроечного резистора можно изменять выходную мощность лазерного пучка. Модуль лазерного диода питается от 12В, поэтому внешнее питание 12В необходимо подключить к Ардуино Uno для штатной работы агрегометра. Также было показано, что использование микросхемы LM317T в качестве драйвера постоянного тока не приносит увеличение стабильности лазерного излучения для используемого недорогого лазерного диода. Лазерный диод питается током порядка 30 мА.

Для модуля вибродинамика вначале планировалось использовать усилитель низких частот на микросхеме TDA2030A. Однако опытным путем было показано, что предложенная на рис.42 схема с использованием транзистора позволяет

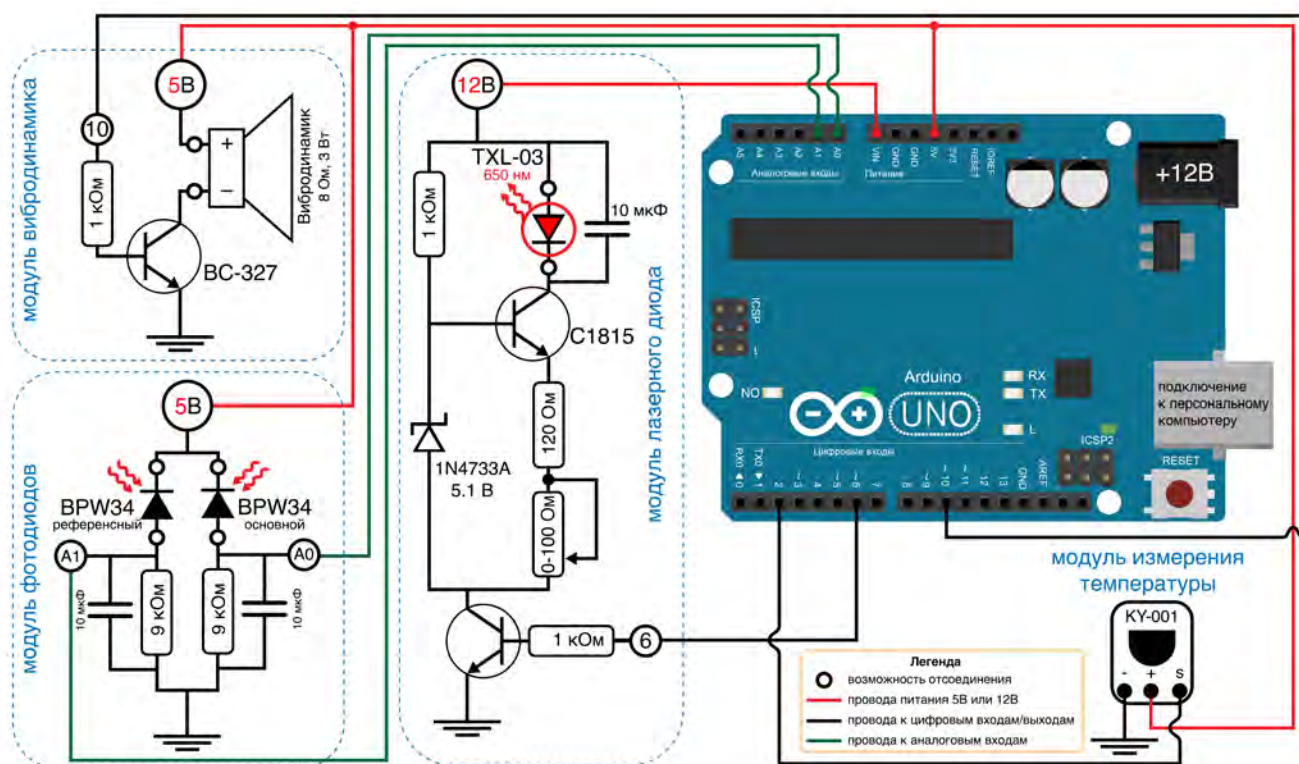


Рис. 42: Электрическая схема портативного эритроцитарного агрегометра модели «ПЛАК 1».

достичь значение среднего тока через динамик порядка 130 мА, тогда как с помощью микросхемы TDA2030A — около 40 мА. Возможно улучшение данной схемы путем добавления конденсаторов.

Каждый фотодиод работает в фотодиодном режиме и встроен в схему делителя напряжения. Важно отметить, что хоть обратный ток пропорционален падающему на него световому потоку, он слабо зависит от напряжения, приложенного к фотодиоду. К примеру, если фототок увеличивается, то напряжение через резистор также должно увеличиваться, и неизбежно напряжение на фотодиоде должно уменьшаться. Это создает небольшую нелинейность между фототоком и регистрируемым напряжением, однако данная нелинейность не вносит большого вклада в получаемые данные и ею можно пренебречь в первом приближении. Наличие конденсаторов на модуле фотодиодов обязательно, так как при их отсутствии регистрируемый сигнал основного/референсного фотодиода оказывается смешанным с сигналом референсного/основного фотодиода. Возможно улучшение данной схемы с использованием операционного усилителя вместо схемы делителя напряжения.

Данный агрегометр является лабораторным образцом, и поэтому лазерный диод, вибродинамик и фотодиоды возможно отсоединить и/или быстро заменить.

5.3.3 Конструкция агрегометра

Поскольку модель агрегометра «ПЛАК 1» подразумевает быструю замену компонентов, замену деталей и разбор корпуса, а также настройку положения вибродинамика, то данная модель агрегометра является установкой. Схематичный вид агрегометра «ПЛАК 1» приведен на рис.43, а фотография агрегометра на рис.44.

Все компоненты агрегометра были напечатаны на 3D принтере Flying Bear Ghost 6. Внешний корпус и часть внутреннего покрыта черной краской BLACK 3.0¹⁷ для минимизации паразитного сигнала.

Максимальные размеры агрегометра без вибродинамика: 120x50x96 мм (Дх-ШхВ), а с вибродинамиком и внешним корпусом — 190x140x140 мм (ДхШхВ). Вес агрегометра с внешним корпусом не превышает 1 кг.

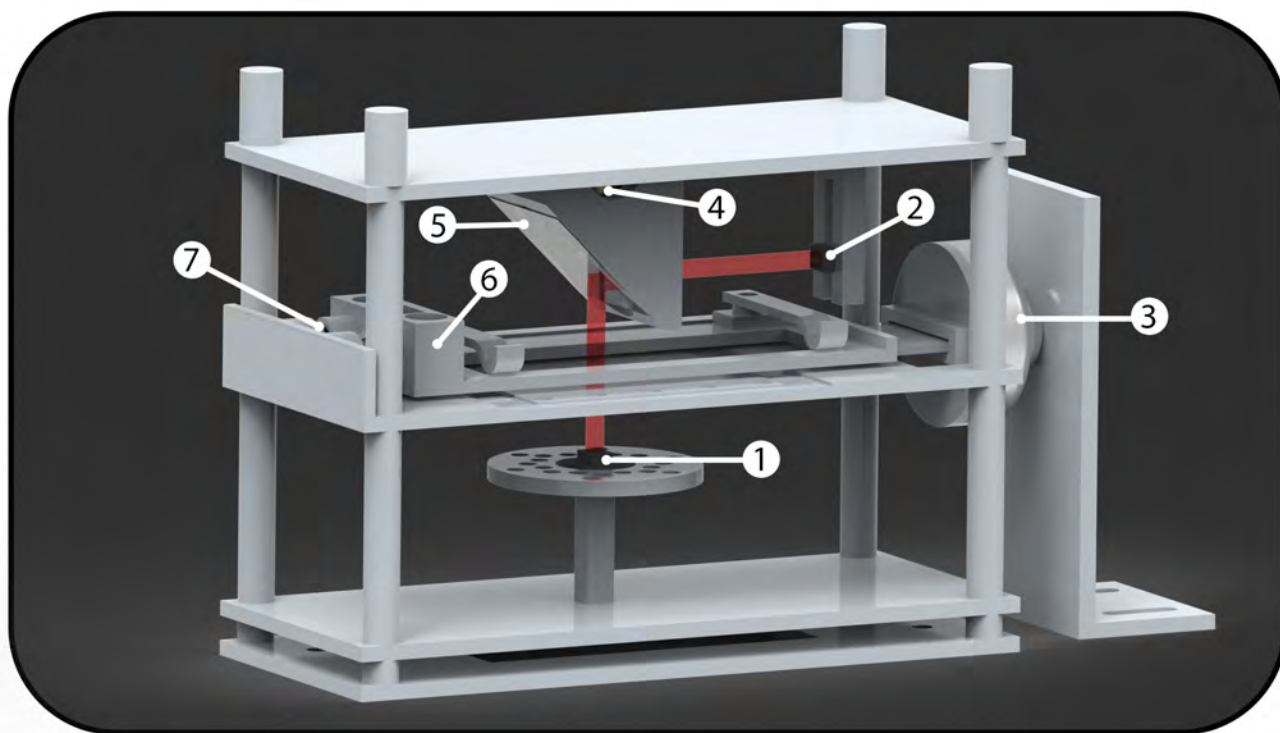


Рис. 43: Схематичный вид эритроцитарного агрегометра модели «ПЛАК 1». (1) – основной фотодиод, (2) – референсный фотодиод, (3) – вибродинамик, (4) – лазер, расположенный под (5) светоделительной платиной, (6) – подложка под кювету, которая крепится с одной стороны к (7) 2-ум пружинам, а с другой – к вибродинамику. Размеры без вибродинамика: 120x50x96 мм (Дх-ШхВ)

¹⁷см. <https://culturehustle.com/collections/paint>



Рис. 44: Агрегометр модели «ПЛАК 1»: (а) с внешним корпусом, на котором находится (1) открывающаяся дверка и (2) крышка; (б) с открытой дверкой, через которую видны (3) – основной фотодиод, (4) – референсный фотодиод, (5) – лазер, расположенный под светоделительной платиной, (6) – подложка под кювету, и (6) – вибродинамик; (в) задняя сторона агрегометра без внешнего корпуса, на которой виден (8) микроконтроллер Ардуино Uno R3, (9) плата с модулем для вибродинамика и модулем для фотодиодов и (10) плата с модулем для лазера.

5.3.4 Программное обеспечение для агрегометра

Для микроконтроллера агрегометра написана программа на Arduino C (C++ с фреймворком Wiring). Микроконтроллер взаимодействует с персональным компьютером через последовательный порт. С помощью персонального компьютера в микроконтроллер отправляются определенные команды, к примеру, для измерения температуры, проведении тестового или основного измерения и т.д. Для персонального компьютера написана программа с графическим интерфейсом на языке программирования Python. «Скомпилированная» программа для взаимодействия с агрегометром доступна в открытом репозитории GitHub [269] и на неё получено свидетельство о регистрации программы для ЭВМ №2024667094. Исходный код программы, как и инструкции по установке и использованию находятся в закрытом репозитории GitHub.

Программа состоит из основного окна, а также 3 дополнительных: окна настроек для измерений, окна лога и окна постобработки данных. Программа позволяет изменять ряд настроек измерения, автоматически обрабатывать и объединять полученные результаты.

5.3.5 Протокол измерения параметров агрегации эритроцитов

Спонтанная агрегация эритроцитов

Для измерения спонтанной агрегации эритроцитов необходимо запустить

программу, подключить агрегометр к USB порту компьютера. Далее необходимо создать кювету на основе предметного и покровного стекла, а также двухстороннего скотча (см. рис.41). В программе обязательно надо заполнить путь к сохранению файлов, а также название образца/пациента.

Далее образец крови помещается в кювету для измерений, и данная кювета помещается в агрегометр. Измерение запускается при нажатии кнопки «Выполнить команду» при настройке «Измерение агрегации». Дезагрегация эритроцитов происходит в течение 80 сек. Измерение происходит при комнатной температуре.

После окончания измерения с выставленными настройками сырые и обработанные данные поступают в указанную папку для сохранения. При вызове окна постобработки можно заново обработать данные, произвести перенормировку, а также объединить несколько измерений в одну таблицу.

На рис.45 приведена типичная агрегатограмма, получаемая в эксперименте, а также основные параметры, которые данная программа позволяет получать: параметры аппроксимации; индексы агрегации для времен 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 100 сек., и максимального времени измерения; характерное время агрегации $T_{1/2}$.

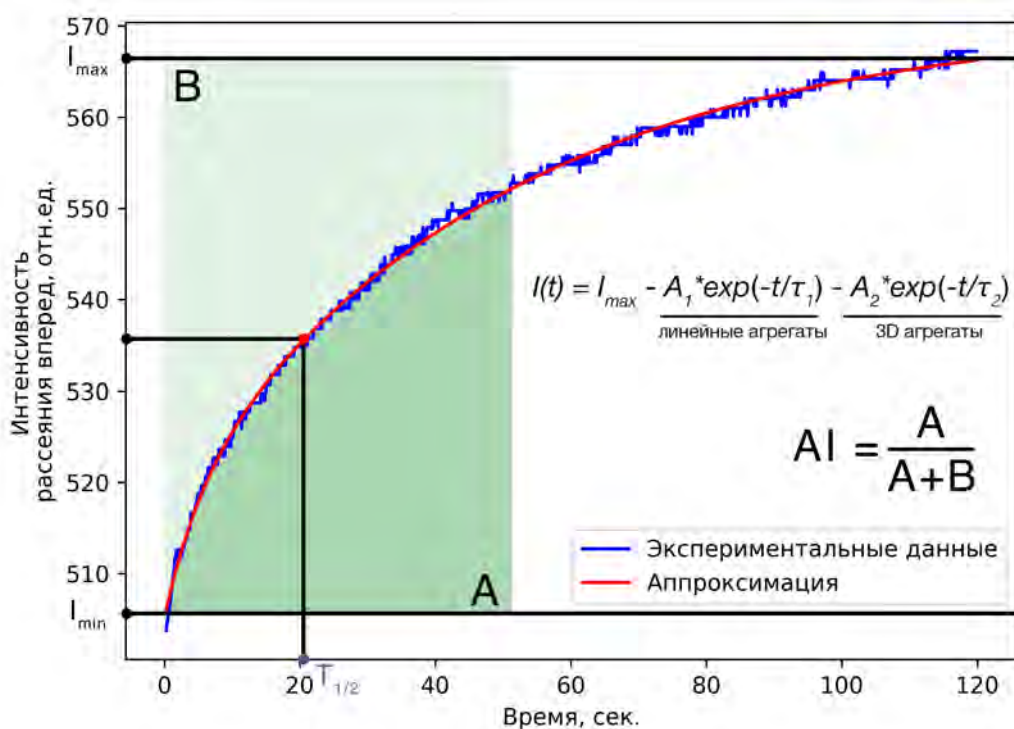


Рис. 45: Типичная агрегатограмма при измерении агрегации эритроцитов, получаемая с помощью агрегометра «ПЛАК 1».

Гистерезис агрегации эритроцитов

В 2010 году Фирсов Н.Н. и соавторы с помощью лазерного агрегометра LADE ввел новую характеристику, которая характеризует процесс АЭ: гистерезис АЭ [270]. Данная характеристика была введена по аналогии с исследованием тиксотропии неньютоновских жидкостей с помощью вискозиметров. Гистерезис агрегации можно наблюдать, если последовательно увеличивать скорости сдвига от нуля до определенного значения, а затем её уменьшать обратно до нуля. Две полученные кривые (светорассеяния или вязкости) будут отличаться, и по сумме разностей значений, характеризующих АЭ, на кривой увеличения и уменьшения сдвиговой скорости, можно оценить гистерезис АЭ. В статье [270] было показано, что гистерезис АЭ в большей степени отражает агрегационную способность, чем агрегацию эритроцитов. В этой статье исследовались пациенты с псориатическим артритом и системной красной волчанкой. Было показано, что в ряде случаев петля гистерезиса регистрируется в форме «восьмерки», т.е. кривая дезагрегации пересекает кривую агрегации. Как говорят авторы, образование «восьмерки» связано с наличием аномально прочных крупных, либо мелких агрегатов. Гистерезис АЭ у здоровых испытуемых изучался в статье [271].

Гистерезис АЭ (ГА) представляет очень интересную и перспективную характеристику, анализ которой может дать дополнительную информацию не только об общем агрегационном состоянии крови, но и обнаружить аномально прочные эритроцитарные агрегаты. Насколько известно автору диссертации, ГА с помощью лазерной агрегометрии изучался только в группе Фирсова Н.Н. и его коллегами.

В агрегометре «ПЛАК 1» предусмотрено измерение ГА, поскольку есть возможность изменять частоты колебаний, а значит сдвиговые напряжения внутри кюветы. Однако, к сожалению, напрямую сказать, какие сдвиговые напряжения образуются в кювете нельзя. Поэтому ГА измеряется следующим способом: вначале кровь находится в покое, далее прикладывается частота, при которой не происходит полной дезагрегации эритроцитов, и далее прикладывается частота, при которой происходит полная дезагрегация эритроцитов; потом измерения продолжают в обратном порядке. Количественно ГА характеризуется разностью значений светорассеяния на средней частоте. Обсудим методику измерения ГА, которое происходит при комнатной температуре.

Для измерения ГА необходимо запустить программу и заполнить путь к сохранению файлов, а также название образца/пациента. Далее необходимо создать

кювету на основе предметного и покровного стекла, а также двухстороннего скотча (см. рис.41).

Далее образец крови помещается в кювету для измерений, и данная кювета помещается в агрегометр. Измерение запускается при нажатии кнопки «Выполнить команду» при настройке «Гистерезис агрегации».

ГА эритроцитов измеряется при следующих частотах по порядку: 0, 110, 120, 110, 0 Гц (см. рис.46). Регистрация ГА проходит в течение 500 сек. с частотой 10 измерений в сек.

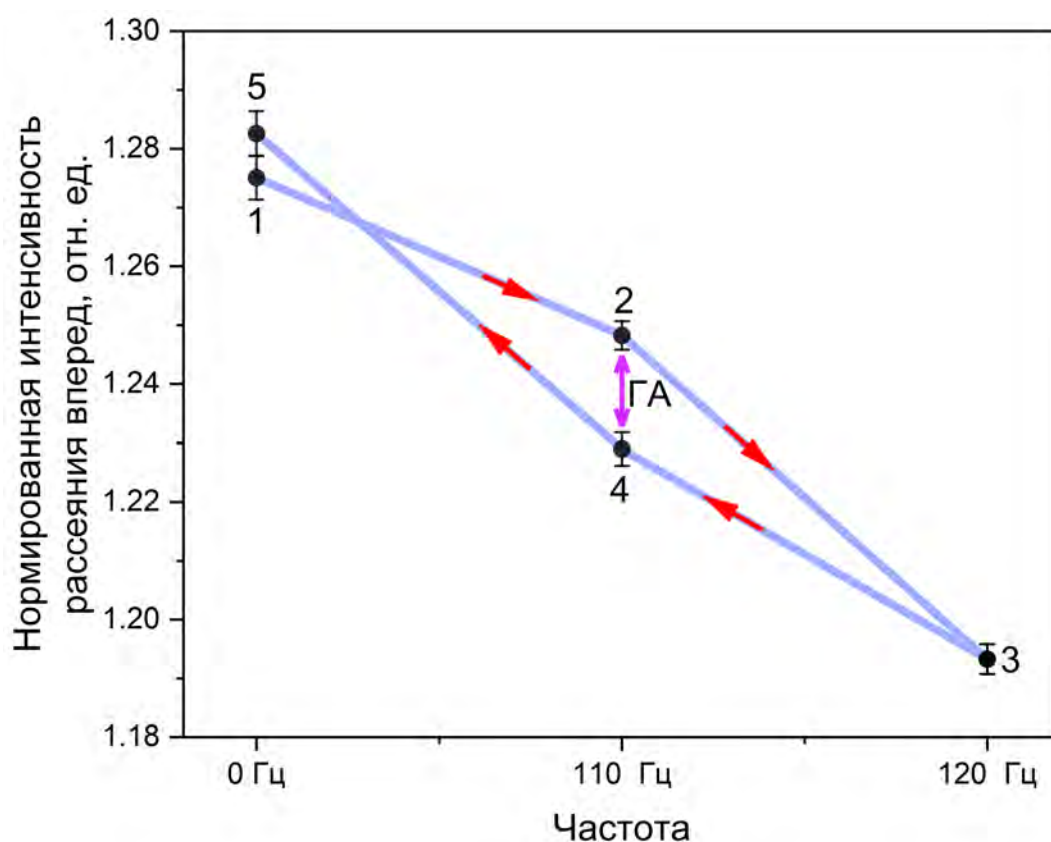


Рис. 46: Гистерезис агрегации эритроцитов при его регистрации с помощью агрегометра «ПЛАК 1». Измерения проходят по порядку от 1 до 5. См. сырые данные для обработки ГА на рис.49.

Количественно значение ГА представляет собой разность в светорассеянии в средней частоте (110 Гц). Данную разность можно также нормировать на среднее значение сигнала при отсутствии вибраций (0 Гц).

После окончания измерения сырые и обработанные данные передаются в указанную папку для сохранения. При вызове окна постобработки можно заново обработать данные, а также объединить несколько измерений в одну таблицу.

5.4 Полученные результаты на агрегометре

5.4.1 Зависимость измеряемых параметров от гематокрита

Был проведен ряд экспериментов на крови здоровых добровольцев с целью получения зависимостей кривых светорассеяния от времени после дезагрегированного состояния крови при разных значениях гематокрита (от 20 до 80%). Образцы с разным гематокритом получали путем смешивания аутологической плазмы крови и с эритроцитарной массой. Гематокрит измерялся с помощью гематокритной центрифуги АРМЕД SH120-1S. Полученные данные приведены на рис.47а, из которого видно, что с увеличением гематокрита сигнал светорассеяния (правильнее сказать колиммированного пропускания) падает, так как свет рассеивается всё большим количеством эритроцитов и агрегатов. Однако если нормировать кривые светорассеяния ($\text{Норм. сигнал} = \frac{\text{Сигнал} - \text{МИН}}{\text{МАКС} - \text{МИН}}$), то получится, что в диапазоне гематокрита 40-80% кривые светорассеяния, а следовательно, и параметры получаемые из них, идентичны (см. рис.47б). Следовательно, данная процедура нормировки позволяет избавиться от влияния гематокрита в диапазоне 40-80% на измеряемые агрегационные параметры. Полученные результаты соответствуют результатам, полученным в [126].

Также была произведена оценка того, как зависит максимальная величина светорассеяния от гематокрита, и было получено, что данную зависимость с хорошей точностью можно аппроксимировать затухающей экспонентой¹⁸. При этом для данных с рис.47 экспоненциальный коэффициент затухания соответствует 25% гематокрита. Есть основания полагать, что при использовании калибровочного объекта можно определять гематокрит только по сигналу светорассеяния. Однако данное исследование должно быть проведено с большим количеством образцов.

5.4.2 Зависимость измеряемых параметров от толщины кюветы

С помощью агрегометра «ПЛАК 1» было исследовано, как зависит сигнал светорассеяния от толщины кюветы. В ходе экспериментов было установлено, что при толщине кюветы 300 и 400 мкм дезагрегационных сил со стороны вибрационного моторчика оказывается недостаточно для того, чтобы полностью дезагрегировать кровь. Полученный результат соответствует результатам моделирования (см.

¹⁸Не путать с Законом Бугера-Ламберта-Бера, так как в данном эксперименте он не выполняется из-за наличия многократного рассеяния.

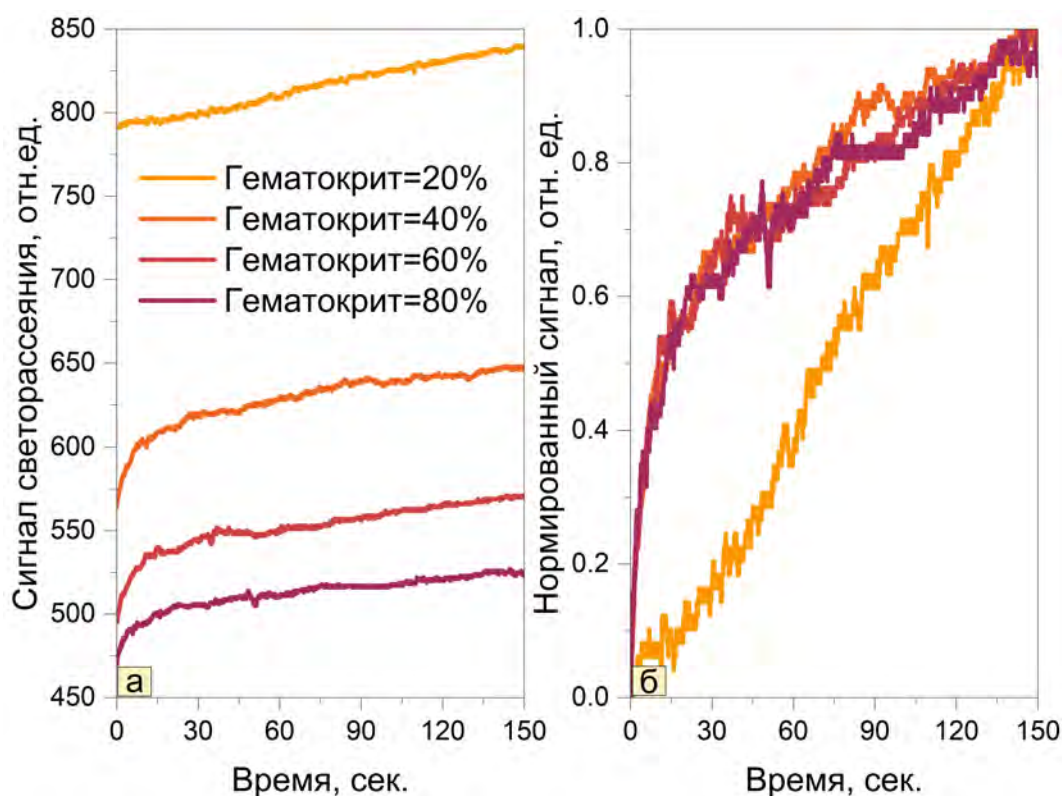


Рис. 47: Зависимости: (а) кривой светорассеяния и (б) нормированной кривой светорассеяния от времени при разных значениях гематокрита в образце крови одного здорового донора. В данном эксперименте использовалась кювета толщиной 200 мкм.

рис.40). Поэтому для того, чтобы получить агрегатограммы для разных толщин кювет, был использован другой механизм дезагрегации эритроцитов, который реализован в приборе «ПЛАК mini». Т.е. образец крови перемешивается дозатором в пробирке в течение 1 минуты и незамедлительно помещается в кювету [260]. Анализируется сигнал светорассеяния сразу после помещения образца в кювету.

Было получено, что кривые светорассеяния идентичны друг другу по форме и смещены относительно друг друга по оси y (см. рис.48). При нормализации полученных данных кривые и параметры, которые характеризуют их, равны друг другу при разных толщинах канала. Зависимость максимального сигнала светорассеяния от толщины канала может быть аппроксимирована экспоненциальной функцией. Для данных с рис.48а экспоненциальный коэффициент затухания равен порядка 150 мкм (рисунок не представлен). Полученные данные могут помочь в дальнейшей стандартизации измеряемых параметров.

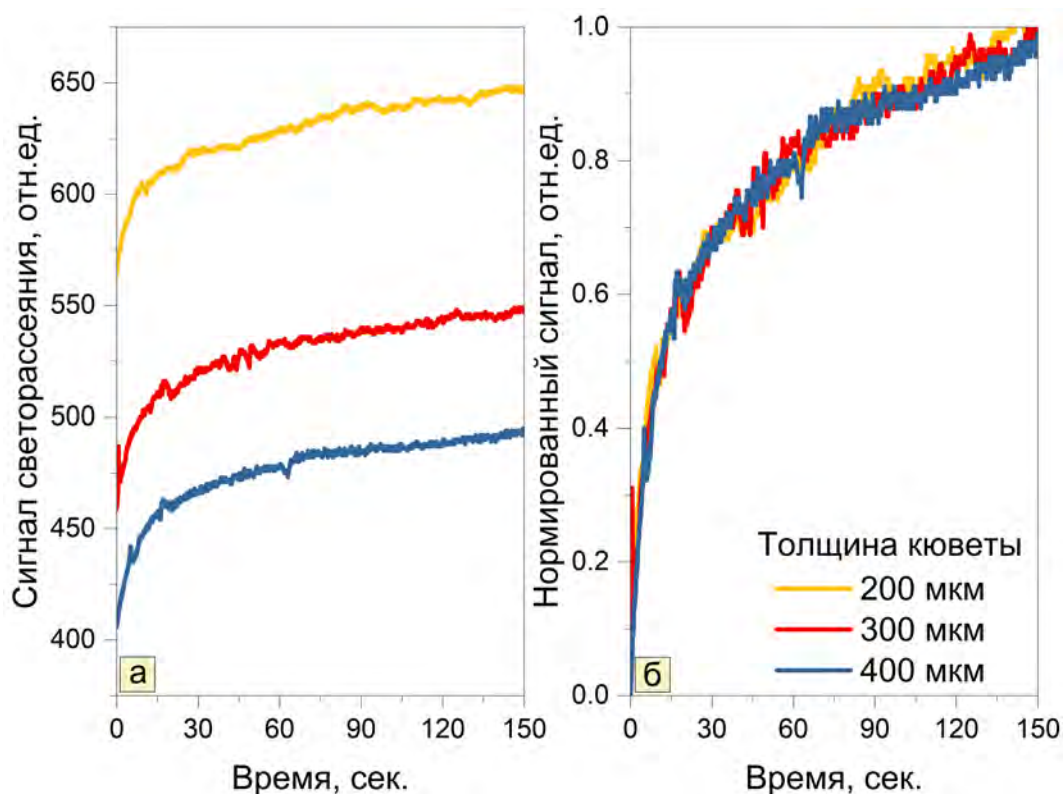


Рис. 48: Зависимость (а) функции светорассеяния и (б) нормированной функции светорассеяния от времени при разных значениях толщины кюветы в образце крови одного здорового донора.

5.4.3 Гистерезис агрегации эритроцитов

Была разработана методика количественного измерения ГА, выраженного в процентах от разности сигнала агрегированной и дезагрегированной крови для агрегометра «ПЛАК 1», которая приведена в разделе *Гистерезис агрегации эритроцитов*. Измерения проходят в течение порядка 8,5 мин. при последовательном приложении следующих частот колебаний вибродинамика: 0-110-120-110-0 Гц (см. рис.46). На рис.49 приведен нормированный сигнал светорассеяния в зависимости от времени при измерении ГА — данные для измерения ГА нормируются делением основного сигнала на референсный ($I_{\text{норм}} = \frac{I_{\text{осн}}}{I_{\text{реф}}}$). От 0 до 100 сек. образец крови находится в полностью агрегированном состоянии; от 100 до 200 сек. при включении вибродинамика на частоте 110 Гц сдвиговые напряжения частично разрушают агрегаты; от 200 до 300 сек. при включении вибродинамика на частоте 120 Гц сдвиговые напряжения полностью разрушают эритроцитарные агрегаты примерно за 70 сек.; от 300 до 400 сек. наблюдается частичная АЭ, которой препятствуют сдвиговые напряжения от вибраций вибродинамика на частоте 110 Гц; от 400 до 500 сек. наблюдается спонтанная АЭ. Данные светорассеяния на рис.46

рассчитаны усреднением сигнала за последние 5 сек. перед изменением частоты колебаний вибродинамика. На рис.46 видно, что сигнал светорассеяния отличается при одинаковой частоте колебаний вибродинамика (110 Гц) в зависимости от предыстории. Как представляется автору диссертации, наиболее информативным параметром, характеризующим ГА при данном измерении является следующий:
$$ГА = \frac{I_{110 \text{ Гц}}|_{100-200 \text{ сек.}} - I_{110 \text{ Гц}}|_{300-400 \text{ сек.}}}{\text{среднее значение } I_{0 \text{ Гц}}} \times 100\%.$$
 Рассчитанный таким способом ГА для крови одного здорового донора составил 22,5%. Требуются дальнейшие исследования данного параметра, характеризующего АЭ.

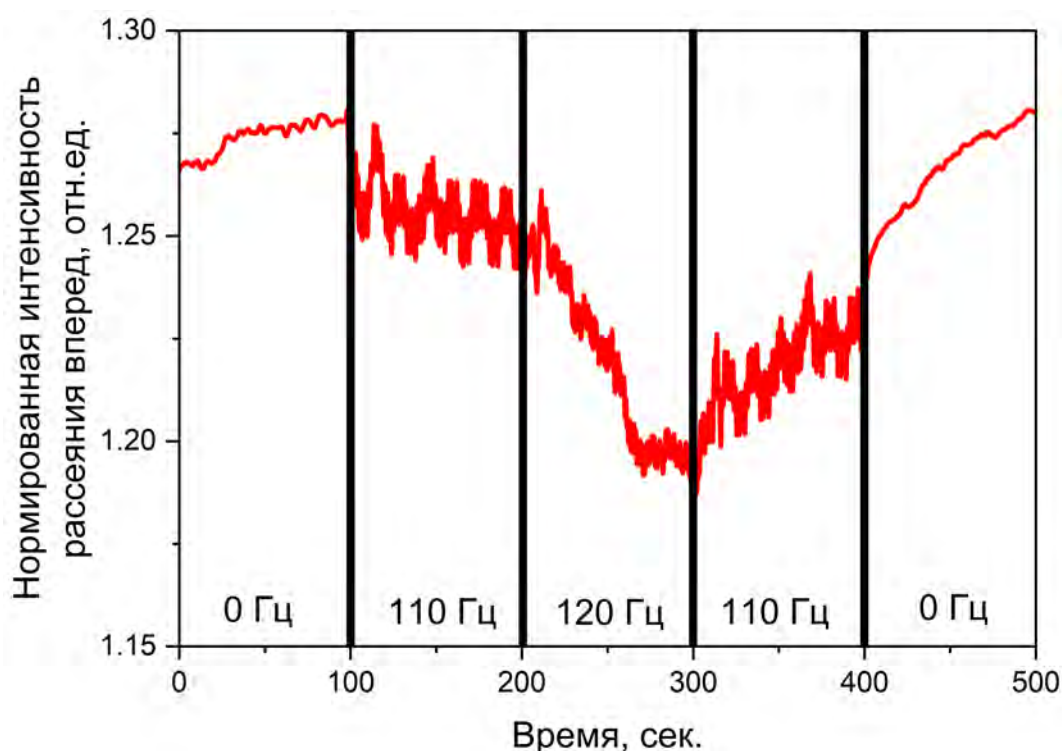


Рис. 49: Зависимость нормированной интенсивности светорассеяния от времени при измерении ГА. При обработке данной кривой получают данные, приведенные на рис.46.

Частоты 110 Гц и 120 Гц подбирались эмпирически. Можно заметить, что частоты вибродинамика 110 Гц недостаточно для того, чтобы разрушить эритроцитарные агрегаты, тогда как частоты 120 Гц — достаточно. На первый взгляд кажется, что не может быть такого, чтобы изменение частоты на 10 Гц имели такую большую роль. Однако надо учесть следующие 2 фактора:

- У вибродинамика есть своя амплитуда-частотная характеристика (АЧХ). При повышении частоты амплитуда будет сначала расти, а затем может значительно падать, так что будет наблюдаться характерный экстремум на АЧХ.

- Подложка под кювету соединена с корпусом через 2 пружины с жесткостью порядка 500 Н/м каждая и с вибродинамиком. Тем самым данную систему можно представить как пружинный осциллятор с внешней силой, движение которого в нулевом приближении описывается уравнением 5.4. Тем самым, максимальная амплитуда колебаний будет наблюдаться при резонансе. С помощью программного пакета Mathematica¹⁹ было рассчитано, что ширина на уровне половины высоты гистерезиса для типичных значений коэффициентов m , k , c , $\omega_{\text{вибр}}$, F как раз составляет порядка 10 Гц²⁰.

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} + c \frac{dx}{dt} + kx = F \sin(\omega_{\text{вибр}} t), \quad (5.4)$$

где m – сумма масс подложки для кюветы и самой кюветы, k – коэффициент жесткости пружины, c – коэффициент, характеризующий трение, F – амплитуда силы вибрации, $\omega_{\text{вибр}}$ – частота вибраций, t – время, x – амплитуда.

5.4.4 Повторяемость и точность получаемых результатов

Для проверки точности измеряемых параметров использовалась кровь 3-х здоровых доноров. На основе 10 последовательных измерений в течение 2 мин. оценивались средние значения параметров АЭ (см. рис.45) и их стандартные отклонения. Для каждого образца рассчитывалась относительная погрешность измерения, которая затем усреднялась. Полученные результаты приведены в табл.10 для разных параметров. Видно, что есть параметры, для которых относительная ошибка не больше 5% (к примеру, AI для времени больше 50 сек.), для некоторых в районе 10% ($T_{1/2}$, I_{max} , $AI10$), а для некоторых даже больше 20% (τ_1 , τ_2). На данный момент относительная ошибка при измерении параметров АЭ на агрегометре «ПЛАК 1» значительно больше, чем для агрегометра RheoScan. К примеру, относительная ошибка для последнего при измерении параметров AI и $T_{1/2}$ не превышает 5% [126].

Для иллюстрации повторяемости полученных результатов путем аппроксимации и обработки агрегатограм данные визуализировались на графике Бленда-

¹⁹<https://www.wolfram.com/mathematica/>

²⁰Однако не следует забывать, что уравнение 5.4 справедливо при ряде допущений. В первую очередь, это малая амплитуда колебаний и гармоничность вибраций. Из уравнения также хорошо видно, почему необходима юстировка положения вибродинамика: при его смещении в положение сильно сжатых пружин сила F будет гаситься за их счет.

Таблица 10: Относительная погрешность измерений различных параметров АЭ на агрегометре «ПЛАК 1» (см. рис.45), рассчитанная на основе данных, полученных от трех здоровых доноров. После параметров AI приведено время в сек., для которого AI рассчитано.

Параметр	I_{max}	A_1	A_2	τ_1	τ_2	$AI\ 2,5$	$AI\ 5$	$AI\ 10$	$AI\ 25$	$AI\ 50$	$AI\ 75$	$AI\ 100$	$AI\ max$	$T_{1/2}$
Относительная погрешность, %	7	19	12	21	27	17	13	11	7	5	4	4	2	11

Альтмана [272]. Обычно визуализация Бленда-Альтмана используется для анализа различий определенного параметра в измерениях между двумя разными приборами или двумя разными методами. Однако часто данный метод используется для определения согласованности результатов при 2 последовательных измерениях (см. раздел 3.2.4 в [259]), что и было проделано на 11 образцах крови для параметров AI (10 сек.) и $T_{1/2}$ (см. рис.50).

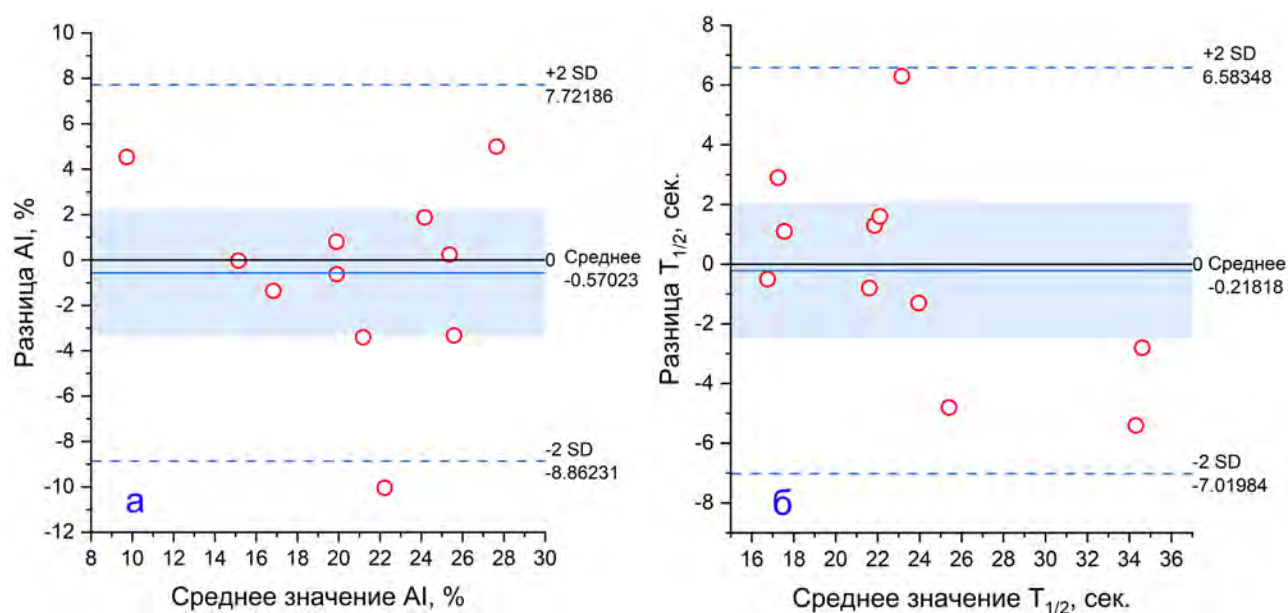


Рис. 50: График Бленда-Альтмана при анализе 2 последовательных измерений для параметра (а) AI (10 сек.) и (б) $T_{1/2}$. Закрашенная область – 95% доверительный интервал. SD – стандартное отклонение. Каждая точка соответствует паре последовательных измерений на одном образце крови.

Большие различия между средними значениями параметров связаны с использованием ресуспендированной и, в ряде случаев, с измененными агрегационными характеристиками. На графиках видно, что большинство измерений попадают в 95% доверительный интервал, и средняя разница значений параметров между 2 последовательными измерениями находится около нуля. Полученные данные говорят о повторяемости полученных результатов, однако наблюдается ряд выбросов. Поэтому при использовании агрегометра «ПЛАК 1» рекомендуется делать

порядка 7-10 измерений и выявлять выбросы данных.

5.5 Дальнейшие возможности усовершенствования агрегометра

Уменьшить относительную ошибку измерения на агрегометре «ПЛАК 1» можно с помощью следующих изменений (по приоритету):

- замена недорогого лазерного диода (см. рис.42) на более дорогой с меньшими флуктуациями мощности позволит снизить шумы измерения и уменьшить поперечный размер пучка, что повысит точность регистрации коллимированного пропускания;
- изменение схемы регистрации сигнала с фотодиодов путем добавления операционного усилителя²¹, что повысит чувствительность и точность измерений;
- усовершенствование крепления вибродинамика к подложке под кювету и замена вибродинамика на более мощный (мощность больше 5 Вт), что обеспечит более эффективную и воспроизводимую дезагрегацию эритроцитарных агрегатов за счет увеличенной амплитуды и стабильности вибрации.

Также усовершенствование агрегометра «ПЛАК 1» может быть путем использования микрофлюидного механизма дезагрегации эритроцитов. К примеру, в агрегометр вместо обычной кюветы можно поместить кювету RSD-K01 для RheoScan (см. рис.18), и сдвиговый поток создавать с помощью шприца и насоса. Данный метод позволит определить гистерезис АЭ в абсолютных единицах, так как можно рассчитать создаваемые сдвиговые напряжения в кювете. Также интересным усовершенствованием может выступать использование видеокамеры вместо фотодиода, которую можно использовать в качестве сенсора коллимированного пропускания, как сделано в [258], или же использовать её для анализа спеклов²², получаемых от образца. Также можно заменить лазер с длиной волны 650 нм на лазер с длиной волны 800 нм, что позволит минимизировать влияние оксигенации крови на параметры АЭ [273].

²¹к примеру, можно использовать операционный усилитель на микросхеме МСР6022-I/P

²²Насколько известно автору диссертации на момент её написания анализ спеклов для определения параметров АЭ в видимой области не был реализован, однако есть реализация в рентгеновском диапазоне [247].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена исследованию микрореологии крови *in vitro* и *in vivo* в норме и патологии с помощью комплекса оптических методов. В рамках работы были выявлены различные особенности взаимодействия клеток крови, как с фундаментальной точки зрения, так и с прикладной. Были проанализированы данные микрореологии крови более 500 пациентов, которые были включены в исследование с 2017 по 2024 год. Также был проведен ряд исследований, раскрывающий частные аспекты взаимодействия эритроцитов между собой, а также с сосудистым эндотелием *in vitro*. Были разработаны новые протоколы исследований, программные обеспечения для обработки результатов, а также разработаны новые методы измерения параметров микрореологии крови *in vitro*.

Проведено сравнение микрореологических параметров крови, измеренных с помощью оптических методов, для пациентов из групп с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями. Получено, что агрегация эритроцитов статистически значимо повышается относительно значений контрольной группы здоровых доноров для всех групп рассматриваемых патологий, т.е. при наличии у пациентов артериальной гипертензии и/или ишемической болезни сердца и/или фибрилляции предсердий и/или сахарного диабета 2-го типа. Гидродинамическая прочность агрегатов, как и деформируемость эритроцитов отличалась от значений здоровых доноров только для определенных групп пациентов. Получены характерные корреляции агрегационных параметров эритроцитов, измеренных *in vivo* и *in vitro*. Показано, что данные корреляции отличаются для разных групп пациентов несмотря на отсутствие статистически значимых отличий между микрореологическими параметрами. С помощью метода капилляроскопии показано, что скорость капиллярного кровотока статистически значимо ниже у пациентов с фибрилляцией предсердий и пациентов с ишемической болезнью сердца по сравнению со здоровыми добровольцами. Корреляции параметров, измеренных *in vivo* на капилляроскопе, статистически значимо отличаются между двумя группами пациентов.

Раскрыт ряд аспектов взаимодействия эритроцитов, а также сосудистого эндотелия в условиях *in vitro*. Показано, что оксид азота влияет на агрегацию эритроцитов, причем это влияние зависит от среды, в которой агрегируют клетки. Впервые с помощью лазерного пинцета измерены силы взаимодействия между одиночными эритроцитами здоровых доноров в плазме крови и монослоем эндотелия в физиологическом состоянии. Данные силы составляют порядка 1 пН, тогда как

силы взаимодействия двух эритроцитов составляют порядка 5 пН. Сила данного взаимодействия зависит от концентрации фибриногена в плазме крови.

Дополнительно продемонстрирована зависимость агрегации эритроцитов в аутологичной плазме крови от температуры. Доказано, что температура преимущественно влияет на начальную стадию агрегации эритроцитов. Именно поэтому важно контролировать температурные условия при измерениях.

Создан портативный лазерный эритроцитарный агрегометр — новый прибор и программное обеспечение, которые позволяют по-новому измерять агрегационные характеристики эритроцитов. Впервые было продемонстрировано применение вибрационного механизма дезагрегации эритроцитов для измерения гистерезиса агрегации, который для здорового донора составляет порядка 22,5%. Проведенные исследования на крови здоровых людей показали повторяемость результатов при последовательных измерениях. Относительная погрешность параметров AI (10 сек.), $T_{1/2}$ составила 11%. Данный агрегометр перспективен для исследования влияния эндотелия на агрегационные свойства эритроцитов, так как геометрия кюветы позволяет в нее помещать стеклышко с эндотелием.

Полученные результаты дополняют имеющиеся знания касательно взаимодействия клеток крови, в особенности, при рассмотрении процесса агрегации эритроцитов. Данная работа является новым шагом к тому, чтобы познать тайны крови. Она не только отвечает на поставленные вопросы, но и задает новые. Оценка микрореологических параметров крови с годами становится всё более актуальной темой в медицинской науке, и можно выразить надежду, что полученные в данной работе результаты помогут в дальнейших исследованиях.

Ведь кровь — это важнейшая жидкая ткань нашего организма и изменение её свойств может относиться как к адаптационным процессам, так и к патологическим, которые влияют на весь организм в целом. Во многих случаях только одновременная борьба с реологическими нарушениями и другими расстройствами, в частности, внутрисосудистым свертыванием крови, может привести к желаемому терапевтическому успеху [21].

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что сопутствующие артериальной гипертензии заболевания усиливают агрегацию эритроцитов *in vitro* и *in vivo*. Для разных групп пациентов выявлены специфические корреляции между параметрами агрегации эритроцитов, в частности, между прочностью агрегатов (*CSS*) и индексом агрегации (*AI*). Статистически значимая положительная корреляция ($r = 0,5$) обнаружена при артериальной гипертензии и фибрилляции предсердий ($r = 0,3$), а также при сочетании ишемической болезни сердца с сахарным диабетом ($r = 0,5$). У других групп пациентов такой корреляции не наблюдается.
2. Методом лазерного пинцета впервые было показано, что эритроциты здоровых доноров взаимодействуют с сосудистым эндотелием в физиологических условиях *in vitro* в аутологичной плазме крови с силами порядка 1 пН, тогда как эритроциты взаимодействуют друг с другом с силами порядка 5 пН.
3. Силы взаимодействия между эритроцитами и сосудистым эндотелием зависят от концентрации фибриногена в плазме крови: они линейно увеличиваются с ростом концентрации фибриногена от 0 до 4 мг/мл, достигая значения насыщения порядка $2,8 \pm 0,1$ пН.
4. Методом лазерного пинцета показано, что оксид азота (NO) влияет на агрегацию и деформируемость эритроцитов: при инкубации L-аргинина (100 мкМ) с эндотелием в аутологичной плазме агрегация эритроцитов на монослое эндотелия снижается на $19 \pm 2\%$. Эффект обусловлен действием эндотелиальной NO-синтазы.
5. Показано, что влияние донора NO — нитропруссид натрия (НПН) — на агрегацию и деформируемость эритроцитов *in vitro* зависит от антикоагулянта. При концентрации НПН 200 мкМ гидродинамическая прочность агрегатов увеличивается на $8 \pm 1\%$ в крови с гепарином лития и не изменяется при использовании ЭДТА. Эффект обусловлен присутствием Ca^{2+} в гепаринизированной крови и его отсутствием при стабилизации крови ЭДТА.
6. Разработана установка портативного лазерного эритроцитарного агрегометра, позволяющая измерять параметры гистерезиса агрегации и спонтанной агрегации эритроцитов. Впервые продемонстрировано применение вибрационного механизма для оценки гистерезиса агрегации, составляющего около 22,5% у здорового донора.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю Александру Васильевичу Приезжеву за помощь и наставление на протяжении всего пути, начиная с бакалавриата. Также автор благодарит Андрея Егоровича Луговцова, Семенова Алексея Николаевича, Максимова Матвея Константиновича и весь коллектив лаборатории Биомедицинской фотоники кафедры *Общей физики и волновых процессов* Физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за обсуждение результатов, помощь в реализации экспериментов и многих других аспектов научной работы. Автор выражает благодарность кафедре *Общей физики и волновых процессов* и ее заведующему профессору Макарову Владимиру Анатольевичу. Автор благодарит доктора медицинских наук Щегловитову Ольгу Николаевну за плодотворное сотрудничество, обсуждение результатов и за представление возможности работать с выращенным эндотелием HUVEC. Автор благодарит доктора медицинских наук Гурфинкеля Юрия Ильича за сотрудничество и плодотворное обсуждение результатов. Автор благодарит доктора биологических наук Алексея Васильевича Муравьева за плодотворное сотрудничество, обсуждение результатов и возможность участия в организованных им конференциях «Микроциркуляция и гемореология» в 2018 и 2023 г. Также автор благодарит Куликову Надежду Романовну за неоценимую поддержку во время написания диссертации.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи, опубликованные в журналах, индексируемых в базах Web of Science, Scopus, RSCI:

1. Умеренков Д. А., **Ермолинский П. Б.**, Луговцов А. Е., Дячук Л. И., Приезжев А. В. Оптические измерения микрореологических параметров крови и анализ их связи с её вязкостью при сердечно-сосудистых заболеваниях // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. — 2024. — Т. 24, № 4. — С. 361-373. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ = 0.444 / 0.8 печ.л. / вклад автора 0.1.
2. **Ermolinskiy P. B.**, Lugovtsov A. E., Maksimov M. K., Umerenkov D. A., Moldon P. A., Sveshnikova A. N., Pshonkin A. V., Smetanina N. S., Priezzhev A. V. Interrelation of blood microrheological parameters measured by optical methods and whole blood viscosity in patients suffering from blood disorders: a pilot study // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2024. — Vol. 10, no. 2. — P. 020306. SJR (Scopus) = 0.210 (Q4) / 0.6 печ.л. / вклад автора 0.4.
3. **Ермолинский П. Б.**, Луговцов А. Е., Семенов А. Н., Приезжев А. В. Эритроцит в поле пучка лазерного пинцета // Квантовая электроника. — 2022. — Т. 52, № 1. — С. 22-27. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ = 1.060 / 0.4 печ.л. / вклад автора 0.4. Переводная версия: **Ermolinskiy P. B.**, Lugovtsov A. E., Semenov A. N., Priezzhev A. V. Red blood cell in the field of a beam of optical tweezers // Quantum Electronics. — 2022. — Vol. 52, no. 1. — P. 22-27. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ = 1.245 / 0.4 печ.л. / вклад автора 0.4.
4. Масляницына А., Каданова И., Незнанов А., **Ермолинский П.**, Гурфинкель Ю., Пигуренко А., Дячук Л., Луговцов А., Приезжев А. Микрореологические свойства крови и капиллярный кровоток при артериальной гипертензии и сахарном диабете второго типа: исследование оптическими методами in vitro и in vivo // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. — 2020. — Т. 9, № 2. — С. 53—63. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ = 0.724 / 0.6 печ.л. / вклад автора 0.2.
5. Maslianitsyna A. I., **Ermolinsky P. B.**, Lugovtsov A. E., Priezzhev A. V. Study by optical techniques of the dependence of aggregation parameters of human red blood cells on their deformability // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2020. — Vol. 6, no. 2. — P. 020305. SJR (Scopus) = 0.210 (Q4) / 0.4 печ.л. / вклад

автора 0.2.

6. **Ermolinskiy P. B.**, Maslyanitsina A. I., Lugovtsov A. E., Priezzhev A. V. Temperature dependencies of the aggregation properties of RBC in dextran solutions in vitro // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2020. — Vol. 6, no. 2. — P. 020501. SJR (Scopus) = 0.210 (Q4) / 0.3 печ.л. / вклад автора 0.3.
7. **Ermolinskiy P. B.**, Lugovtsov A. E., Maslyanitsina A. I., Semenov A. N., Diachuk L., Priezzhev A. V. Interaction of erythrocytes in the process of pair aggregation in blood samples from patients with arterial hypertension and healthy donors: measurements with laser tweezers // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2018. — Vol. 4, no. 3. — P. 030303-1–030303-8. SJR (Scopus) = 0.210 (Q4) / 0.5 печ.л. / вклад автора 0.3.
8. Semenov A. N., Lugovtsov A. E., **Ermolinskiy P. B.**, Priezzhev A. V. Laser aggregometry assessment of blood microrheology in a slit fluidic channel covered with endothelial cells // Journal of Biophotonics. — 2024. — Vol. 17, no. 12. — e202400379. Impact Factor (WoS) = 2.0 (Q3) / 0.8 печ.л. / вклад автора 0.25.
9. Maksimov M. K., **Ermolinskiy P. B.**, Scheglovitova O. N., Sklyankina N. N., Muravyov A. V., Lugovtsov A. E., Priezzhev A. V. RBC aggregation, deformation, and adhesion to endothelium: role of nitric oxide derived from L-arginine and sodium nitroprusside // Journal of Innovative Optical Health Sciences. — 2024. — Vol. 17, no. 05. — P. 2440001. Impact Factor (WoS) = 2.3 (Q2) / 0.8 печ.л. / вклад автора 0.3.
10. **Ermolinskiy P.**, Gurfinkel Y., Sovetnikov E., Lugovtsov A., Priezzhev A. Correlation between the capillary blood flow characteristics and endothelium function in healthy volunteers and patients suffering from coronary heart disease and atrial fibrillation: a pilot study // Life. — 2023. — Vol. 13, no. 10. — life13102043. Impact Factor (WoS) = 3.2 (Q1) / 1.1 печ.л. / вклад автора 0.1.
11. **Ermolinskiy P.**, Maksimov M., Lugovtsov A., Muravyov A., Tikhomirova I., Priezzhev A. Effect of sodium nitroprusside on the microrheological properties of red blood cells in different media // Journal of Innovative Optical Health Sciences. — 2023. — Vol. 17, no. 05. — P. 2342001. Impact Factor (WoS) = 2.3 (Q2) / 0.6 печ.л. / вклад автора 0.3.
12. **Ermolinskiy P. B.**, Maksimov M. K., Muravyov A. V., Lugovtsov A. E., Scheglovitova O. N., Priezzhev A. V. Forces of interaction of red blood cells and endothelial cells at different concentrations of fibrinogen: measurements with laser tweezers in vitro

- // Clinical Hemorheology and Microcirculation. — 2023. — Vol. 86, no. 3. — P. 303-312. Impact Factor (WoS) = 2.1 (Q3) / 0.6 печ.л. / вклад автора 0.3.
13. Semenov A. N., **Ermolinskiy P. B.**, Yakimov B. P., Lugovtsov A. E., Shirshin E. A., Muravyov A. V., Shin S., Wagner C., Priezzhev A. V. Changes in red blood cells biomechanical properties induced by albumin and fibrinogen membrane adsorption: a study using flow cytometry and optical tweezers // Series on Biomechanics. — 2022. — Vol. 36, no. 1. — P. 32-38. SJR (Scopus) = 0.202 (Q4) / 0.4 печ.л. / вклад автора 0.2.
 14. Semenov A., Lugovtsov A., **Ermolinskiy P.**, Lee K., Priezzhev A. Problems of red blood cell aggregation and deformation assessed by laser tweezers, diffuse light scattering and laser diffractometry // Photonics. — 2022. — Vol. 9, no. 4. — P. 9040238. Impact Factor (WoS) = 2.1 (Q2) / 1.1 печ.л. / вклад автора 0.1.
 15. Kapkov A. A., Semenov A. N., **Ermolinskiy P. B.**, Lugovtsov A. E., Priezzhev A. V. Forces of RBC interaction with single endothelial cells in stationary conditions: measurements with laser tweezers // Journal of Innovative Optical Health Sciences. — 2021. — Vol. 14. — P. 2142005. Impact Factor (WoS) = 2.3 (Q2) / 0.7 печ.л. / вклад автора 0.1.
 16. Maslianitsyna A., **Ermolinskiy P.**, Lugovtsov A., Pigurenko A., Sasonko M., Gurfinkel Y., Priezzhev A. Multimodal diagnostics of microrheologic alterations in blood of coronary heart disease and diabetic patients // Diagnostics. — 2021. — Vol. 11., no. 1. — P. 76. SJR (Scopus) = 0.773 (Q2) / 0.6 печ.л. / вклад автора 0.2.
 17. Semenov A. N., Lugovtsov A. E., Shirshin E. A., Yakimov B. P., **Ermolinskiy P. B.**, Bikmulina P. Y., Kudryavtsev D. S., Timashev P. S., Muravyov A. V., Wagner C., Shin S., Priezzhev A. V. Assessment of fibrinogen macromolecules interaction with red blood cells membrane by means of laser aggregometry, flow cytometry, and optical tweezers combined with microfluidics // Biomolecules. — 2020. — Vol. 10, no. 10. — P. 1448. SJR (Scopus) = 1.333 (Q1) / 1.2 печ.л. / вклад автора 0.1.
 18. **Ermolinskiy P.**, Lugovtsov A., Yaya F., Lee K., Kaestner L., Wagner C., Priezzhev A. Effect of red blood cell aging in vivo on their aggregation properties in vitro: measurements with laser tweezers // Applied Sciences. — 2020. — Vol. 10, no. 21. — P. 7581. SJR (Scopus) = 0.521 (Q2) / 0.6 печ.л. / вклад автора 0.5.
 19. Lugovtsov A. E., Gurfinkel Y. I., **Ermolinskiy P. B.**, Maslyanitsina A. I., Dyachuk L. I., Priezzhev A. V. Optical assessment of alterations of microrheologic and

microcirculation parameters in cardiovascular diseases // Biomedical Optics Express. — 2019. — Vol. 10, no. 8. — P. 3974-3986. SJR (Scopus) = 0.896 (Q1) / 0.8 печ.л. / вклад автора 0.1.

20. **Ermolinskiy P.**, Lugovtsov A., Maslyanitsina A., Semenov A., Dyachuk L., Priezzhev A. In vitro assessment of microrheological properties of erythrocytes in norm and pathology with optical methods // Series on Biomechanics. — 2018. — Vol. 32, no. 3. — P. 20-25. SJR (Scopus) = 0.202 (Q4) / 0.4 печ.л. / вклад автора 0.3.

Список конференций, на которых были доложены результаты исследования²³:

- 21st International Conference Laser Optics (ICLO) — 2024
- Невская фотоника — 2023
- Saratov Fall Meeting — 2017, 2018, 2019, 2021, 2022 и 2023
- The 3rd World Congress of The European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation — 2023
- 12th World Congress of Microcirculation — 2023
- XII и XIV Международная конференция «Микроциркуляция и гемореология» — 2019, 2023
- VII Съезд биофизиков России — 2023
- VIII Сеченовский международный биомедицинский саммит — 2023
- 2nd BRICS Workshop on Biophotonics — 2023
- 20st International Conference Laser Optics (ICLO) — 2022
- 11-я конференция по клинической гемостазиологии и гемореологии (РФТГ) — 2022
- 6th and 7th Eurosummer School on Biorheology & Symposium on Micro and Nano Mechanics and Mechanobiology of Cells, Tissues and Systems (BIORHEO) — 2018 и 2021
- Ломоносов — 2018 и 2019

²³Названия докладов см. по ссылке <https://istina.msu.ru/workers/79849412/>.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Муравьев А. В., Михайлов П. В., Тихомирова И. А. Микроциркуляция и гемореология: точки взаимодействия // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2017. — Т. 16, № 2. — С. 90—100.
2. Huisjes R. [et al.]. Squeezing for life – properties of red blood cell deformability // *Frontiers in Physiology*. — 2018. — Vol. 9. — P. 1–22.
3. Regal S. [et al.]. A microfluidic device with biomimetic submicron slits to apprehend red blood cell splenic filtration // *Biophysical Journal*. — 2024. — Vol. 123, no. 3. — 305a.
4. Baskurt O., Neu B., Meiselman H. *Red Blood Cell Aggregation*. — Boca Raton, USA : CRC Press, 2011.
5. Bächer C. *Blood platelets in the microcirculation - a theoretical and computational study : PhD thesis / Bächer Christian*. — Universität Bayreuth, Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften - BayNAT, 2021.
6. Lazari D. [et al.]. The relationship between aggregation and deformability of red blood cells in health and disease // *Frontiers in Physiology*. — 2020. — Vol. 11. — P. 1–6.
7. Maslianitsyna A. I. [et al.]. Study by optical techniques of the dependence of aggregation parameters of human red blood cells on their deformability // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. — 2020. — Vol. 6, no. 2. — P. 020305.
8. Czaja B. [et al.]. The influence of red blood cell deformability on hematocrit profiles and platelet margination // *PLOS Computational Biology*. — 2020. — Vol. 16, no. 3. — e1007716.
9. Wautier J.-L., Wautier M.-P. Cellular and molecular aspects of blood cell endothelium interactions in vascular disorders // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2020. — Vol. 21, no. 15. — P. 5315.
10. Vos T. [et al.]. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019 // *The Lancet*. — 2020. — Vol. 396, no. 10258. — P. 1204–1222.

11. Guven G., Hilty M. P., Ince C. Microcirculation: physiology, pathophysiology, and clinical application // *Blood Purification*. — 2019. — Vol. 49, no. 1/2. — P. 143–150.
12. McMahon T. J. Red blood cell deformability, vasoactive mediators, and adhesion // *Frontiers in Physiology*. — 2019. — Vol. 10. — P. 1–10.
13. Drożdż D., Drożdż M., Wójcik M. Endothelial dysfunction as a factor leading to arterial hypertension // *Pediatric Nephrology*. — 2022. — Vol. 38, no. 9. — P. 2973–2985.
14. Williams A. [et al.]. Pathophysiology of red blood cell dysfunction in diabetes and its complications // *Pathophysiology*. — 2023. — Vol. 30, no. 3. — P. 327–345.
15. Lugovtsov A. E. [et al.]. Peculiarities of red blood cells aggregation and deformability in patients with arterial hypertension: assesment with optical techniques // 2018 International Conference Laser Optics (ICLO). — IEEE, 2018.
16. Preibsch H. [et al.]. Comparison of the simple red blood cell adhesiveness/aggregation test with the laser-assisted optical rotational cell analyzer: red blood cell aggregation in patients with coronary artery disease and a healthy control group // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. — 2017. — Vol. 65, no. 4. — P. 363–371.
17. Александрова Н. П., Фирсов Н. Н. Особенности реологии крови у больных острым артериальным и венозным тромбозом // *Тромбоз, гемостаз и реология*. — 2014. — Т. 3, № 59. — С. 67—71.
18. Khodadi E. Platelet function in cardiovascular disease: activation of molecules and activation by molecules // *Cardiovascular Toxicology*. — 2019. — Vol. 20, no. 1. — P. 1–10.
19. Thiriet M. Physiology and pathophysiology of microcirculation // *PanVascular Medicine* / ed. by P. Lanzer. — Springer Berlin Heidelberg, 2015. — P. 591–637.
20. Jung F. History of the cutaneous microcirculation from antiquity to modern times // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. — 2024. — Vol. 86, no. 1/2. — P. 29–50.
21. Кузник Б. И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. — Чита: Экспресс-издательство, 2010.
22. Conley L. C., Schwartz R. S. Blood // *Encyclopedia britannica*. — 2024.

23. Bain B. J. Chapter 5: normal ranges // *Blood Cells: A Practical Guide*. — Sixth. — Oxford, United Kingdom : John Wiley & Sons Ltd, 2021. — P. 530–570.
24. Hinsbergh V. W. van. *Physiology of blood vessels*. — Oxford University Press, 2017.
25. Müller B. [et al.]. High-resolution tomographic imaging of microvessels // *Developments in X-Ray Tomography VI* / ed. by S. R. Stock. — SPIE, 2008.
26. Ng H. Y. [et al.]. Bioprinting of artificial blood vessels // *International Journal of Bioprinting*. — 2024. — Vol. 4, no. 2. — P. 140.
27. Tuchin V. V. *Handbook of optical biomedical diagnostics. Volume 1: Light–tissue interaction*. — SPIE Press, Washington, USA, 2016.
28. Kaufman R. Red blood cell life span, senescence, and destruction // *Anemia*. — Cambridge University Press, 2017. — P. 19–22.
29. Mock D. M. [et al.]. Red blood cell (RBC) survival determined in humans using rbcs labeled at multiple biotin densities // *Transfusion*. — 2010. — Vol. 51, no. 5. — P. 1047–1057.
30. Hajjawi O. Ionic and osmotic equilibria of human red blood cells // *American Journal of Scientific Research*. — 2013. — Vol. 86. — P. 177–187.
31. Burak M. Free radical metabolism in human erythrocytes // *Clinica Chimica Acta*. — 2008. — Vol. 390, no. 1/2. — P. 1–11.
32. Мухомедзянова С. [и др.]. Липиды биологических мембран в норме и патологии (обзор литературы) // *Acta Biomedica Scientifica*. — 2017. — Т. 2, № 5. — С. 43—49.
33. Боровская М. К. [и др.]. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза // *Acta Biomedica Scientifica*. — 2010. — № 3. — дата обращения: 20.08.2024.
34. Семенов А. Н. Роль молекулярных взаимодействий в изменении агрегационных и деформационных свойств эритроцитов : диссертация / Семенов Алексей Николаевич. — Москва, Россия : МГУ имени М.В.Ломоносова, 2021.
35. Oliveira S., Saldanha C. An overview about erythrocyte membrane // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. — 2010. — Vol. 44, no. 1. — P. 63–74.

36. Michelson A. D. Platelets. — Elsevier, 2007.
37. Липунова Е., Скоркина М. Физиология крови. — Белгород : Изд-во БелГУ, 2007.
38. Андрианова Е. Н., Рывкин А. И. Методология и клиническое значение исследования реологических свойств крови // Вестник Ивановской медицинской академии. — 2008. — Т. 13, № 1/2. — С. 80—85.
39. Пахрова О. А., Гринева М. Р., Иванов С. К. Методология и клиническое значение исследования реологических свойств крови // Вестник Ивановской медицинской академии. — 2008. — Т. 13, № 1/2. — С. 89—98.
40. Ажермачева М. Н. Нарушение реологических свойств крови при острых и хронических ишемических нарушениях мозгового кровообращения // Сибирские медицинские науки. — 2014. — Т. 5. — С. 1—12.
41. Калашникова А. А., Цветкова Т. Г., Полежанкина И. С. Холодовая агглютининовая болезнь: современные представления о заболевании и клиническое наблюдение // Вестник гематологии. — 2020. — Т. 16, № 3. — С. 26—33.
42. Соколова И. А. [и др.]. Агрегация эритроцитов: некоторые вопросы и гипотезы // Российский журнал биомеханики. — 2011. — Т. 15, № 1. — С. 7—22.
43. Kim S. [et al.]. The cell-free layer in microvascular blood flow // Biorheology. — 2009. — Vol. 46, no. 3. — P. 181–189.
44. Pivkin I., Richardson P., Karniadakis G. Effect of red blood cells on platelet aggregation // IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine. — 2009. — Vol. 28, no. 2. — P. 32–37.
45. Baskurt O. K. [et al.]. Hemorheological parameters as determinants of myocardial tissue hematocrit values // Clinical Hemorheology and Microcirculation. — 2006. — Vol. 35, no. 1/2. — P. 45–50.
46. Birchard G. F. Optimal hematocrit: theory, regulation and implications // American Zoologist. — 1997. — Vol. 37, no. 1. — P. 65–72.
47. Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. — 2007. — Vol. 292, no. 3. — H1209–H1224.

48. Муравьев А. В. [и др.]. Механизмы микрореологических ответов эритроцитов на действие газотрансмиттеров — оксида азота и сероводорода // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2020. — Т. 2, № 82.
49. Lominadze D., Dean W. L. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation // FEBS Letters. — 2002. — Vol. 517, no. 1–3. — P. 41–44.
50. Lee K. [et al.]. Optical tweezers study of red blood cell aggregation and disaggregation in plasma and protein solutions // Journal of Biomedical Optics. — 2016. — Vol. 21, no. 3. — P. 035001.
51. Semenov A. [et al.]. Optical trapping and diffuse light scattering techniques for in vitro assessing the effect of albumin and fibrinogen synergy on red cells aggregation in blood plasma //. — Conference: The 25th International Conference on Advanced Laser Technologies: Busan, Korea, 2017.
52. Ben-Ami R. [et al.]. A synergistic effect of albumin and fibrinogen on immunoglobulin-induced red blood cell aggregation // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. — 2003. — Vol. 285, no. 6. — H2663–H2669.
53. Armstrong J. [et al.]. The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation // Biophysical Journal. — 2004. — Vol. 87, no. 6. — P. 4259–4270.
54. Jan K.-M., Chien S. Role of surface electric charge in red blood cell interactions // The Journal of General Physiology. — 1973. — Vol. 61, no. 5. — P. 638–654.
55. Huang Y.-X. [et al.]. Human red blood cell aging: correlative changes in surface charge and cell properties // Journal of Cellular and Molecular Medicine. — 2011. — Vol. 15, no. 12. — P. 2634–2642.
56. Meiselman H. J. Red blood cell aggregation: 45 years being curious // Biorheology. — 2009. — Vol. 46, no. 1. — P. 1–19.
57. Ermolinskiy P. [et al.]. Effect of red blood cell aging in vivo on their aggregation properties in vitro: measurements with laser tweezers // Applied Sciences. — Basel, Switzerland, 2020. — Vol. 10, no. 21. — P. 7581.
58. Ermolinskiy P. B. [et al.]. Temperature dependencies of the aggregation properties of RBC in dextran solutions in vitro // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2020. — Vol. 6, no. 2. — P. 020501.

59. Asakura S., Oosawa F. On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules // *The Journal of Chemical Physics*. — 1954. — Vol. 22, no. 7. — P. 1255–1256.
60. Mravljak M. Depletion force // *Faculty of Mathematics and Physics of University of Ljubljana*. — 2008.
61. Vincent B. [et al.]. Depletion flocculation in dispersions of sterically-stabilised particles (“soft spheres”) // *Colloids and Surfaces*. — 1986. — Vol. 18, no. 2–4. — P. 261–281.
62. Neu B., Meiselman H. J. Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions // *Biophysical Journal*. — 2002. — Vol. 83, no. 5. — P. 2482–2490.
63. Liu Y., Liu W. K. Rheology of red blood cell aggregation by computer simulation // *Journal of Computational Physics*. — 2006. — Vol. 220, no. 1. — P. 139–154.
64. Soe Y. S. Numerical study of erythrocyte mechanics: deformation and aggregation : PhD thesis / Soe Ye Swe. — Singapore : Nanyang Technological University, 2016.
65. Ermolinskiy P. GitHub repository: 2D_RBC_aggregation_simulation [online]. — 2024. — Access mode: https://github.com/Petr-Ermolinskiy/2D_RBC_aggregation_simulation.
66. Lee K., Wagner C., Priezhev A. V. Assessment of the “cross-bridge”-induced interaction of red blood cells by optical trapping combined with microfluidics // *Journal of Biomedical Optics*. — 2017. — Vol. 22, no. 9. — P. 091516.
67. Chien S., Jan K.-M. Red cell aggregation by macromolecules: roles of surface adsorption and electrostatic repulsion // *Journal of Supramolecular Structure*. — 1973. — Vol. 1, no. 4/5. — P. 385–409.
68. Yaya F. Physical properties of red blood cells in aggregation : PhD thesis / Yaya Francois. — Saarbrücken, Germany : Universität des Saarlandes, 2021.
69. Lee K. [et al.]. Dextran adsorption onto red blood cells revisited: single cell quantification by laser tweezers combined with microfluidics // *Biomedical Optics Express*. — 2018. — Vol. 9, no. 6. — P. 2755.

70. Flormann D. A. D. Physical characterization of red blood cell aggregation : PhD thesis / Flormann Daniel Amadeus Dominic. — Saarbrücken, Germany : Universität des Saarlandes, 2016.
71. Di Cesare M. [et al.]. The heart of the world // *Global Heart*. — 2024. — Vol. 19, no. 1.
72. Dalen J. E. [et al.]. The epidemic of the 20th century: coronary heart disease // *The American Journal of Medicine*. — 2014. — Vol. 127, no. 9. — P. 807–812.
73. Oladiran O., Nwosu I. Stroke risk stratification in atrial fibrillation: a review of common risk factors // *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*. — 2019. — Vol. 9, no. 2. — P. 113–120.
74. Lamassa M. [et al.]. Characteristics, outcome, and care of stroke associated with atrial fibrillation in europe: data from a multicenter multinational hospital-based registry (the european community stroke project) // *Stroke*. — 2001. — Vol. 32, no. 2. — P. 392–398.
75. Gotsadze M. [et al.]. Erythrocyte aggregability, and fibrinogen during atrial fibrillation // *Cardiovascular Research*. — 2024. — Vol. 120, s1.
76. Han K. [et al.]. In silico modeling of patient-specific blood rheology in type 2 diabetes mellitus // *Biophysical Journal*. — 2023. — Vol. 122, no. 8. — P. 1445–1458.
77. Miyamoto K. [et al.]. Role of leukocytes in diabetic microcirculatory disturbances // *Microvascular Research*. — 1997. — Vol. 54, no. 1. — P. 43–48.
78. Moreno-Cortés J. [et al.]. Intersociety consensus for the diagnosis and treatment of people with arterial hypertension // *Revista Colombiana de Cardiología (English Edition)*. — 2023. — Vol. 30, no. 3.
79. Муравьев А. В. [и др.]. Взаимосвязь параметров артериального давления и микрореологии эритроцитов у лиц с артериальной гипертонией // *Тромбоз, гемостаз и реология*. — 2023. — № 2.
80. Каюмов Ф. А., Нартайлаков М. А. Сердечно-сосудистая система. ее значение для хирургической практики: уч. пос. для студентов. — Уфа, Россия : Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, 2013. — С. 69.

81. Фирсов Н. Н. [и др.]. Общие закономерности деформации эритроцитов в сдвиговом потоке // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2016. — Т. 1, № 65. — С. 27—31.
82. Barshtein G. [et al.]. Red blood cell deformability is expressed by a set of interrelated membrane proteins // International Journal of Molecular Sciences. — 2023. — Vol. 24, no. 16. — P. 12755.
83. Radosinska J., Vrbjar N. The role of red blood cell deformability and Na, K-ATPase function in selected risk factors of cardiovascular diseases in humans: focus on hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia // Physiological Research. — 2016. — S43–S54.
84. Porro B. [et al.]. Red blood cell morphodynamics: a new potential marker in high-risk patients // Frontiers in Physiology. — 2021. — Vol. 11.
85. Ali D. S. [et al.]. Omef biochip for evaluating red blood cell deformability using dielectrophoresis as a diagnostic tool for type 2 diabetes mellitus // Lab on a Chip. — 2024. — Vol. 24, no. 11. — P. 2906–2919.
86. Cho Y. I., Mooney M. P., Cho D. J. Hemorheological disorders in diabetes mellitus // Journal of Diabetes Science and Technology. — 2008. — Vol. 2, no. 6. — P. 1130–1138.
87. Symeonidis A. [et al.]. Impairment of erythrocyte viscoelasticity is correlated with levels of glycosylated haemoglobin in diabetic patients: filterability of diabetic RBC is correlated with HbA1c levels // Clinical & Laboratory Haematology. — 2001. — Vol. 23, no. 2. — P. 103–109.
88. Turpin C. [et al.]. Enhanced oxidative stress and damage in glycated erythrocytes // PLOS One / ed. by P. Song. — 2020. — Vol. 15, no. 7. — e0235335.
89. James S. H., Meyers A. M. Microangiopathic hemolytic anemia as a complication of diabetes mellitus // The American Journal of the Medical Sciences. — 1998. — Vol. 315, no. 3. — P. 211–215.
90. Ройтман Е. В. [и др.]. Эндотелиальная дисфункция, агрегация тромбоцитов и реологические свойства крови у курильщиков // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2022. — Т. 2. — С. 13—22.

91. Rumbaut R. E., Thiagarajan P. Platelet aggregation // *Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis*. — San Rafael, CA : Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. — Chap. 4.
92. Lebas H. [et al.]. Platelets are at the nexus of vascular diseases // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. — 2019. — Vol. 6.
93. Pluta K. [et al.]. Platelet–leucocyte aggregates as novel biomarkers in cardiovascular diseases // *Biology*. — 2022. — Vol. 11, no. 2. — P. 224.
94. Filkova A. A., Panteleev M. A., Sveshnikova A. N. Reversible platelet aggregation in the presence of calcium ions: mechanisms and potential value // *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology*. — 2019. — Vol. 18, no. 3. — P. 120–129.
95. Кузник Б. И. [и др.]. Агрегационная активность форменных элементов крови у больных сахарным диабетом 1 и 2 типа // *Сахарный диабет*. — 2012. — Т. 2. — С. 49—53.
96. Танашян М. М. [и др.]. Гемореология и гемостаз у больных с ишемическим инсультом на фоне сахарного диабета 2 типа и метаболического синдрома // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. — 2014. — Т. 8, № 3. — С. 14—20.
97. Танашян М. М., Кузнецова П. И., Раскуражев А. А. Рациональная фармакотерапия цереброваскулярной патологии при миелопролиферативных заболеваниях // *Нервные болезни*. — 2016. — Т. 3. — С. 3—6.
98. Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management // *American Journal of Hematology*. — 2012. — Vol. 87, no. 3. — P. 284–293.
99. Parashar Y. Haemostatic profile in patients of myeloproliferative neoplasms-a tertiary care centre experience // *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. — 2016.
100. Ройтман Е. В. [и др.]. Особенности реологических свойств крови у пациентов с истинной полицитемией // *Тромбоз, гемостаз и реология*. — 2015. — Т. 3, № 63. — С. 8—19.

101. Moliterno A. R., Ginzburg Y. Z., Hoffman R. Clinical insights into the origins of thrombosis in myeloproliferative neoplasms // *Blood*. — 2021. — Vol. 137, no. 9. — P. 1145–1153.
102. Repsold L., Joubert A. M. Platelet function, role in thrombosis, inflammation, and consequences in chronic myeloproliferative disorders // *Cells*. — 2021. — Vol. 10, no. 11. — P. 3034.
103. Saif M. W., Khan U., Greenberg B. R. Cardiac complications of myeloproliferative disorders // *Resid Staff Physician*. — 2001. — Vol. 47, no. 8. — P. 32–38.
104. Félétou M. The endothelium, part i: multiple functions of the endothelial cells – focus on endothelium-derived vasoactive mediators // *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*. — 2011. — Vol. 3, no. 4. — P. 1–306.
105. Pizov A. V. [et al.]. Endothelial function in normal and pathological conditions // *Medical Council*. — 2019. — No. 6. — P. 154–159.
106. Krüger-Genge A. [et al.]. Vascular endothelial cell biology: an update // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — Vol. 20, no. 18. — P. 4411.
107. Neubauer K., Zieger B. Endothelial cells and coagulation // *Cell and Tissue Research*. — 2021. — Vol. 387, no. 3. — P. 391–398.
108. Pretini V. [et al.]. Red blood cells: chasing interactions // *Frontiers in Physiology*. — 2019. — Vol. 10.
109. Simmonds M. J., Detterich J. A., Connes P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell // *Biorheology*. — 2014. — Vol. 51, no. 2/3. — P. 121–134.
110. Mozar A. [et al.]. Red blood cell nitric oxide synthase modulates red blood cell deformability in sickle cell anemia // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. — 2016. — Vol. 64, no. 1. — P. 47–53.
111. Space S. L. [et al.]. Nitric oxide attenuates normal and sickle red blood cell adherence to pulmonary endothelium // *American Journal of Hematology*. — 2000. — Vol. 63, no. 4. — P. 200–204.
112. Mohandas N., Evans E. Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial cells: requirement for both cell membrane changes and plasma factors // *Blood*. — 1984. — Vol. 64, no. 1. — P. 282–287.

113. Liu S. [et al.]. Measurement of the refractive index of whole blood and its components for a continuous spectral region // *Journal of Biomedical Optics*. — 2019. — Vol. 24, no. 03. — P. 1.
114. Лопатин В. Н. [и др.]. Методы светорассеяния в анализе дисперсных сред. — Москва, Россия : Физматлит, 2004.
115. Yadav M. K., Sharma S. K. On the validity of Rayleigh–Gans–Debye type approximations in red blood cell size determination // *Journal of Modern Optics*. — 2008. — Vol. 55, no. 6. — P. 921–929.
116. Lugovtsov A. E., Priezzhev A. V., Nikitin S. Y. Light scattering by arbitrarily oriented optically soft spheroidal particles: calculation in geometric optics approximation // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. — 2007. — Vol. 106, no. 1–3. — P. 285–296.
117. Луговцов А. Е., Никитин С. Ю., Приезжев А. В. Лучеволновое приближение для расчета рассеяния лазерного излучения прозрачной диэлектрической сфероидальной частицей // *Квантовая электроника*. — 2008. — Т. 38, № 6. — С. 606—611.
118. Yurkin M. A., Hoekstra A. G. The discrete-dipole-approximation code ADDA: capabilities and known limitations // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. — 2011. — Vol. 112, no. 13. — P. 2234–2247.
119. Lu J., Hu X.-H., Yang P. Accurate simulation of light scattering by a red blood cell using the FDTD method // *Summaries of Papers Presented at the Lasers and Electro-Optics. CLEO '02. Technical Diges.* — Opt. Soc. America, 2002. — (CLEO-02).
120. Zijlstra W. G. Syllectometry, a new method for studying rouleaux formation of red blood cells // *Netherlands Society for Physiology and Pharmacology*. — 1957. — Vol. 8. — P. 153–154.
121. Dobbe J. [et al.]. Syllectometry: the effect of aggregometer geometry in the assessment of red blood cell shape recovery and aggregation // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. — 2003. — Vol. 50, no. 1. — P. 97–106.

122. Schmid-Schönbein H. [et al.]. A counter-rotating “rheoscope chamber” for the study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry // *Microvascular Research*. — 1973. — Vol. 6, no. 3. — P. 366–376.
123. Hardeman M., Dobbe J., Ince C. The laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. — 2001. — Vol. 25. — P. 1–11.
124. Priezzhev A. V. [et al.]. Optical study of RBC aggregation in whole blood samples and single cells // *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics, Second Edition, Volume 2: Methods*. — SPIE PRESS, 2016. — P. 5–37.
125. Shin S., Hou J., Suh J. Measurement of cell aggregation characteristics by analysis of laser-backscattering in a microfluidic rheometry // *Korea Australia Rheology Journal*. — 2007. — Vol. 19. — P. 61–66.
126. Shin S., Yang Y., Suh J.-S. Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip stirring system by light transmission // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. — 2009. — Vol. 41, no. 3. — P. 197–207.
127. Mishchenko M. I., Travis L. D., Lacis A. A. *Scattering, Absorption, and Emission of Light by Small Particles*. — Cambridge, England : Cambridge University Press, 2002.
128. Yurkin M., Hoekstra A. User Manual for the Discrete Dipole Approximation Code ADDA 1.4.0. — 2020.
129. Yurkin M. GitHub repository: adda [online]. — 2020. — Access mode: <https://github.com/team/adda>.
130. Kaushansky K. [et al.]. *Williams Hematology*. — 10th ed. — McGraw-Hill Education, 2021.
131. Яминский И. В., Ахметова А. И., Сенотрусова С. А. Кинетика превращения эритроцитов в эхиноциты по данным микролинзовой микроскопии // *Медицина и высокие технологии*. — 2022. — Т. 3. — С. 58—61.
132. Yurkin M. A. [et al.]. Experimental and theoretical study of light scattering by individual mature red blood cells by use of scanning flow cytometry and a discrete dipole approximation // *Applied Optics*. — 2005. — Vol. 44, no. 25. — P. 5249.

133. Tsinopoulos S. V., Polyzos D. Scattering of He–Ne laser light by an average-sized red blood cell // *Applied Optics*. — 1999. — Vol. 38, no. 25. — P. 5499.
134. Tsinopoulos S. V., Sellountos E. J., Polyzos D. Light scattering by aggregated red blood cells // *Applied Optics*. — 2002. — Vol. 41, no. 7. — P. 1408.
135. He J. [et al.]. Light scattering by multiple red blood cells // *Journal of the Optical Society of America*. — 2004. — Vol. 21, no. 10. — P. 1953.
136. Kirillin M. Y. [et al.]. Effect of red blood cell aggregation and sedimentation on optical coherence tomography signals from blood samples // *Journal of Physics D: Applied Physics*. — 2005. — Vol. 38, no. 15. — P. 2582–2589.
137. Perekatova V. [et al.]. Comparative analysis of accuracy of analytical models and monte-carlo-based empirical approximation for diffuse reflectance spectroscopy // *Optics Communications*. — 2025. — Vol. 579. — P. 131440.
138. Baskurt O. K. [et al.]. Comparison of three commercially available ektacytometers with different shearing geometries // *Biorheology*. — 2009. — Vol. 46, no. 3. — P. 251–264.
139. Bessis M. C., Mohandas N. Red cell deformability, importance of its measurement in clinical medicine // *Swiss Medical Weekly*. — 1975. — Vol. 105 47. — P. 1568–70.
140. Born G. V. R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // *Nature*. — 1962. — Vol. 194, no. 4832. — P. 927–929.
141. Born G. V. R., Cross M. J. The aggregation of blood platelets // *The Journal of Physiology*. — 1963. — Vol. 168, no. 1. — P. 178–195.
142. O'Brien J. Platelet aggregation // *Journal of Clinical Pathology*. — 1962. — Vol. 15, no. 5. — P. 452–455.
143. Nakano T., Di Paola J. Platelet aggregometry // *Trauma Induced Coagulopathy* / ed. by E. Gonzalez, H. B. Moore, E. E. Moore. — Cham : Springer International Publishing, 2016. — P. 237–245.
144. Jarvis G. E. Platelet aggregation: turbidimetric measurements // *Platelets and Megakaryocytes*. — Humana Press, 2004. — P. 065–076.
145. Ashkin A. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure // *Physical Review Letters*. — 1970. — Vol. 24, no. 4. — P. 156–159.

146. Ashkin A., Dziedzic J. M. Optical levitation of liquid drops by radiation pressure // *Science*. — 1975. — Vol. 187, no. 4181. — P. 1073–1075.
147. Ashkin A. Trapping of atoms by resonance radiation pressure // *Physical Review Letters*. — 1978. — Vol. 40, no. 12. — P. 729–732.
148. Ashkin A. [et al.]. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles // *Optics Letters*. — 1986. — Vol. 11, no. 5. — P. 288.
149. Ashkin A., Dziedzic J. M., Yamane T. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams // *Nature*. — 1987. — Vol. 330, no. 6150. — P. 769–771.
150. Nascimento J. M. [et al.]. Analysis of sperm motility using optical tweezers // *Journal of Biomedical Optics*. — 2006. — Vol. 11, no. 4. — P. 044001.
151. Block S. M., Blair D. F., Berg H. C. Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers // *Nature*. — 1989. — Vol. 338, no. 6215. — P. 514–518.
152. Ashkin A., Dziedzic J. M. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria // *Science*. — 1987. — Vol. 235, no. 4795. — P. 1517–1520.
153. Zhu R. [et al.]. Optical tweezers in studies of red blood cells // *Cells*. — 2020. — Vol. 9, no. 3. — P. 545.
154. Lee K. [et al.]. Optical tweezers study of red blood cell aggregation and disaggregation in plasma and protein solutions // *Journal of Biomedical Optics*. — 2016. — Vol. 21, no. 3. — P. 035001.
155. Ashkin A. *Optical Trapping and Manipulation of Neutral Particles Using Lasers: A Reprint Volume with Commentaries*. — World Scientific, 2006.
156. Min C. [et al.]. Focused plasmonic trapping of metallic particles // *Nature Communications*. — 2013. — Vol. 4, no. 1.
157. Arlt J. [et al.]. Optical micromanipulation using a bessel light beam // *Optics Communications*. — 2001. — Vol. 197, no. 4–6. — P. 239–245.
158. Gennerich A. *Optical Tweezers: Methods and Protocols*. — Springer New York, 2017.
159. Ashkin A. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime // *Biophysical Journal*. — 1992. — Vol. 61, no. 2. — P. 569–582.

160. Ermolinskiy P. GitHub repository: Optical trapping of a spherically symmetric sphere in the ray-optics regime [online]. — 2025. — Access mode: https://github.com/Ermolinskiy/Sphere_Geom_Optics_Trap.
161. König K. [et al.]. Cell damage in near-infrared multimode optical traps as a result of multiphoton absorption // *Optics Letters*. — 1996. — Vol. 21, no. 14. — P. 1090.
162. Prahl S. Optical absorption of hemoglobin [online]. — 2024. — Access mode: <https://omlc.org/spectra/hemoglobin>.
163. Маклыгин А. [и др.]. Измерение силы взаимодействия между эритроцитами в агрегате с помощью лазерного пинцета // *Квантовая электроника*. — 2012. — Т. 42(6). — С. 500—504.
164. Krasnikov I., Seteikin A., Bernhardt I. Thermal processes in red blood cells exposed to infrared laser tweezers // *Journal of Biophotonics*. — 2011. — Vol. 4, no. 3. — P. 206–212.
165. Gong J., Li F., Xing Q. Femtosecond optical trapping of cells: efficiency and viability // *Transactions of Tianjin University*. — 2009. — Vol. 15, no. 5. — P. 315–318.
166. Xie C., Dinno M. A., Li Y.-q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells // *Optics Letters*. — 2002. — Vol. 27, no. 4. — P. 249.
167. Dasgupta R. [et al.]. Hemoglobin degradation in human erythrocytes with long-duration near-infrared laser exposure in Raman optical tweezers // *Journal of Biomedical Optics*. — 2010. — Vol. 15, no. 5. — P. 055009.
168. Grover S., Gauthier R., Skirtach A. Analysis of the behaviour of erythrocytes in an optical trapping system // *Optics Express*. — 2000. — Vol. 7, no. 13. — P. 533.
169. Dharmadhikari J., Mathur D. Using an optical trap to fold and align single red blood cells // *Current Science*. — 2004. — Vol. 86. — P. 1432–1437.
170. Rancourt-Grenier S. [et al.]. Dynamic deformation of red blood cell in dual-trap optical tweezers // *Optics Express*. — 2010. — Vol. 18, no. 10. — P. 10462.
171. Ермолинский П. Б. [и др.]. Эритроцит в поле пучка лазерного пинцета // *Квантовая электроника*. — Москва, 2022. — Т. 52, № 1. — С. 17670.

172. Fagrell B., Intaglietta M. Microcirculation: its significance in clinical and molecular medicine // *Journal of Internal Medicine*. — 1997. — Vol. 241, no. 5. — P. 349–362.
173. Баранов В. Б. [и др.]. Идентификация форменных элементов крови в капиллярном русле на основе анализа видеоизображений высокого разрешения // *Клиническая физиология кровообращения*. — 2006. — № 2. — С. 69—74.
174. Bernardino V. [et al.]. The impact of nailfold capillaroscopy in the approach of microcirculation // *Vascular Biology* / ed. by Marcelo. — Rijeka : IntechOpen, 2019. — Chap. 11.
175. Gurfinkel Y. [et al.]. Importance of image processing in digital optical capillaroscopy for early diagnostics of arterial hypertension // *Proceedings of the 2015 International Conference on BioPhotonics (BioPhotonics)*. — IEEE, 2015. — P. 1–4.
176. Chojnowski M. M., Felis-Giemza A., Olesińska M. Capillaroscopy – a role in modern rheumatology // *Rheumatology*. — 2016. — Vol. 54, no. 2. — P. 67–72.
177. Nagy Z., Czirják L. Nailfold digital capillaroscopy in 447 patients with connective tissue disease and Raynaud’s disease // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. — 2003. — Vol. 18, no. 1. — P. 62–68.
178. Chanprapaph K. [et al.]. Nailfold capillaroscopy with usb digital microscopy in connective tissue diseases: a comparative study of 245 patients and healthy controls // *Frontiers in Medicine*. — 2021. — Vol. 8.
179. Boulon C. [et al.]. Correlation between capillaroscopic classifications and severity in systemic sclerosis: results from SCLEROCAP study at inclusion // *Clinical and Experimental Rheumatology*. — 2019. — Vol. 37, 119(4). — P. 63–68.
180. Lim M. W. [et al.]. Nailfold video-capillaroscopy in the study of cardiovascular disease: a systematic review // *Blood Pressure Monitoring*. — 2022. — Vol. 28, no. 1. — P. 24–32.
181. Dybas J. [et al.]. Trends in biomedical analysis of red blood cells – Raman spectroscopy against other spectroscopic, microscopic and classical techniques // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. — 2022. — Vol. 146. — P. 116481.

182. Lazareva E. [et al.]. Optical properties of glycated and non-glycated hemoglobin – raman/fluorescence spectroscopy and refractometry // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. — 2022. — Vol. 8, no. 2.
183. Sydor M. J. [et al.]. Fluorescence lifetime imaging microscopy and time-resolved anisotropy of nanomaterial-induced changes to red blood cell membranes // *Methods and Applications in Fluorescence*. — 2021. — Vol. 9, no. 3. — P. 035002.
184. Муравьев А. В. [и др.]. Влияние газотрансммиттеров на мембранную эластичность и микрореологию эритроцитов // *Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии*. — 2019. — Т. 36, № 4. — С. 281—289.
185. Rico L. G. [et al.]. Flow-cytometry-based protocols for human blood/marrow immunophenotyping with minimal sample perturbation // *STAR Protocols*. — 2021. — Vol. 2, no. 4. — P. 100883.
186. Uyuklu M. [et al.]. Effects of storage duration and temperature of human blood on red cell deformability and aggregation // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. — 2009. — Vol. 41, no. 4. — P. 269–278.
187. Denessen E. [et al.]. Determining the optimal storage time and temperature for performing platelet function assays and global hemostasis assays // *Platelets*. — 2021. — Vol. 33, no. 3. — P. 416–424.
188. Jaffe E. A. [et al.]. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. identification by morphologic and immunologic criteria // *Journal of Clinical Investigation*. — 1973. — Vol. 52, no. 11. — P. 2745–2756.
189. Scheglovitova O. N. [et al.]. Herpes simplex type i virus infection of cultured human vascular endothelial cells: expression of cell adhesion molecules and induction of interferon and cytokine production by blood mononuclear cells // *Russian Journal of Immunology*. — 2001. — Vol. 6, no. 4. — P. 367–376.
190. Hoepken S. [et al.]. Shear resistance of human umbilical endothelial cells on different materials covered with or without extracellular matrix: controlled in-vitro study // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. — 2009. — Vol. 43, no. 1/2. — P. 157–166.
191. Krüger A. [et al.]. Influence of the coating with extracellular matrix and the number of cell passages on the endothelialization of a polystyrene surface // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. — 2015. — Vol. 60, no. 1. — P. 153–161.

192. Bala K., Ambwani K., Gohil N. K. Effect of different mitogens and serum concentration on huvec morphology and characteristics: implication on use of higher passage cells // *Tissue and Cell*. — 2011. — Vol. 43, no. 4. — P. 216–222.
193. Firsov N. N. [et al.]. Fundamental laws of the deformational behavior of erythrocytes in shear flow // *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*. — 2006. — Vol. 79, no. 1. — P. 118–124.
194. Filkova A. A. [et al.]. Quantitative dynamics of reversible platelet aggregation: mathematical modelling and experiments // *Scientific Reports*. — 2019. — Vol. 9, no. 1.
195. Gabbasov Z. [et al.]. Platelet aggregation: the use of optical density fluctuations to study microaggregate formation in platelet suspension // *Thrombosis Research*. — 1989. — Vol. 54, no. 3. — P. 215–223.
196. Bandyopadhyay S. K. [et al.]. Probing ADP induced aggregation kinetics during platelet-nanoparticle interactions: functional dynamics analysis to rationalize safety and benefits // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. — 2019. — Vol. 7. — P. 1–11.
197. Gieseler J. [et al.]. Optical tweezers — from calibration to applications: a tutorial // *Advances in Optics and Photonics*. — 2021. — Vol. 13, no. 1. — P. 74.
198. Ermolinskiy P. B. [et al.]. Interaction of erythrocytes in the process of pair aggregation in blood samples from patients with arterial hypertension and healthy donors: measurements with laser tweezers // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. — 2018. — Vol. 4, no. 3. — P. 030303-1–030303-8.
199. Kapkov A. A. [et al.]. Forces of RBC interaction with single endothelial cells in stationary conditions: measurements with laser tweezers // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2021. — Vol. 14. — P. 2142005.
200. Sarshar M., Wong W. T., Anvari B. Comparative study of methods to calibrate the stiffness of a single-beam gradient-force optical tweezers over various laser trapping powers // *Journal of Biomedical Optics*. — 2014. — Vol. 19, no. 11. — P. 115001.
201. Tognato R. [et al.]. Modelling red blood cell optical trapping by machine learning improved geometrical optics calculations // *Biomedical Optics Express*. — 2023. — Vol. 14, no. 7. — P. 3748.

202. Lenton I. C. D. [et al.]. Optical Tweezers Toolbox [Online]. — 2020. — Access mode: <https://github.com/ilent2/ott>.
203. Svoboda K., Block S. M. Biological applications of optical forces // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. — 1994. — Vol. 23, no. 1. — P. 247–285.
204. Ahmadi G. *Hydrodynamic Forces*. — New York, USA : Clarkson University, 2002.
205. Ермолинский П. Лазерно-оптические методы исследования взаимодействия эритроцитов разных возрастов : дипломная работа (Магистр) / Ермолинский Петр. — Москва, Россия : МГУ имени М.В.Ломоносова, 2021.
206. Ермолинский П. Лазерные методы в исследовании процесса агрегации эритроцитов : дипломная работа (Бакалавр) / Ермолинский Петр. — Москва, Россия : МГУ имени М.В.Ломоносова, 2019.
207. Кисун Л. Взаимодействие эритроцитов в средах, индуцирующих их агрегацию: исследование с помощью лазерных пинцетов : диссертация / Кисун Ли. — Москва, Россия : МГУ имени М.В.Ломоносова, 2016.
208. Moldon P. A. [et al.]. Influence of optical clearing agents on the scattering properties of human nail bed and blood microrheological properties: in vivo and in vitro study // *Journal of Biophotonics*. — Germany, 2024. — e202300524.
209. Lugovtsov A. E. [et al.]. Optical assessment of alterations of microrheologic and microcirculation parameters in cardiovascular diseases // *Biomedical Optics Express*. — United States, 2019. — Vol. 10, no. 8. — P. 3974–3986.
210. Ermolinskiy P. GitHub repository: Laboratory-Data-Processing-App [online]. — 2024. — Access mode: <https://github.com/Petr-Ermolinskiy/Laboratory-Data-Processing-App>.
211. Faizi N., Alvi Y. Correlation // *Biostatistics Manual for Health Research*. — Elsevier, 2023. — P. 109–126.
212. Akoglu H. User's guide to correlation coefficients // *Turkish Journal of Emergency Medicine*. — 2018. — Vol. 18, no. 3. — P. 91–93.

213. Ermolinskiy P. B. [et al.]. Interrelation of blood microrheological parameters measured by optical methods and whole blood viscosity in patients suffering from blood disorders: a pilot study // *Journal of Biomedical Photonics Engineering*. — 2024. — Vol. 10, no. 2. — P. 020306.
214. Maslianitsyna A. [et al.]. Multimodal diagnostics of microrheologic alterations in blood of coronary heart disease and diabetic patients // *Diagnostics*. — 2021. — Vol. 11. — P. 76.
215. Ermolinskiy P. [et al.]. In vitro assessment of microrheological properties of erythrocytes in norm and pathology with optical methods // *Series on Biomechanics*. — Bulgaria, 2018. — Vol. 32, no. 3. — P. 20–25.
216. Фирсов Н. Н. [и др.]. Плазмаферез как универсальный метод восстановления реологических свойств крови и периферического кровотока // *Тромбоз, гемостаз и реология*. — 2016. — Т. 2, № 66. — С. 19—24.
217. Масляницына А. [и др.]. Микрореологические свойства крови и капиллярный кровоток при артериальной гипертензии и сахарном диабете второго типа: исследование оптическими методами *in vitro* и *in vivo* // *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. — Кемерово, 2020. — Т. 9, № 2. — С. 53—63.
218. Ermolinskiy P. [et al.]. Correlation between the capillary blood flow characteristics and endothelium function in healthy volunteers and patients suffering from coronary heart disease and atrial fibrillation: a pilot study // *Life*. — Basel, Switzerland, 2023. — Vol. 13, no. 10. — life13102043.
219. Муравьев А. В. Роль газовых медиаторов (CO, NO и H₂S) в регуляции кровообращения: анализ участия микрореологии клеток крови // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. — 2021. — Т. 20, № 1. — С. 91—99.
220. Tran N. [et al.]. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and the cardiovascular system: in physiology and in disease states // *American Journal of Biomedical Science and Research*. — 2022. — Vol. 15. — P. 153–177.
221. Ignarro L. J., Napoli C., Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview // *Circulation Research*. — 2002. — Vol. 90, no. 1. — P. 21–28.

222. Cortese-Krott M., Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? // *Redox Biology*. — 2013. — Vol. 2. — P. 251–258.
223. Bor-Kucukatay M. [et al.]. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2003. — Vol. 284, no. 5. — H1577–H1584.
224. Ulker P. [et al.]. Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased NO levels in human red blood cells // *Nature Precedings*. — 2010. — Vol. 5. — P. 1–13.
225. Pribush A., Zilberman-Kravits D., Meyerstein N. The mechanism of the dextran-induced red blood cell aggregation // *European Biophysics Journal*. — 2006. — Vol. 36, no. 2. — P. 85–94.
226. Semenov A. [et al.]. Problems of red blood cell aggregation and deformation assessed by laser tweezers, diffuse light scattering and laser diffractometry // *Photonics*. — 2022. — Vol. 9, no. 4. — P. 9040238.
227. Муравьев А. В. [и др.]. Исследование деформируемости эритроцитов в экспериментальной практике // *Тромбоз, гемостаз и реология*. — 2008. — Т. 4, № 36. — С. 22—27.
228. Nader E. [et al.]. Association between nitric oxide, oxidative stress, eryptosis, red blood cell microparticles, and vascular function in sickle cell anemia // *Frontiers in Immunology*. — 2020. — Vol. 11.
229. Kuck L., Peart J. N., Simmonds M. J. Calcium dynamically alters erythrocyte mechanical response to shear // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. — 2020. — Vol. 1867, no. 11. — P. 118802.
230. Barodka V. [et al.]. Nitroprusside inhibits calcium-induced impairment of red blood cell deformability // *Transfusion*. — 2013. — Vol. 54, no. 2. — P. 434–444.
231. Cilek N. [et al.]. Signaling mechanisms in red blood cells: a view through the protein phosphorylation and deformability // *Journal of Cellular Physiology*. — 2023. — Vol. 239, no. 3.

232. Ermolinskiy P. [et al.]. Effect of sodium nitroprusside on the microrheological properties of red blood cells in different media // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — Singapore, Singapore, 2023. — P. 2342001.
233. Thiagarajan P., Rippon A. J., Farrell D. H. Alternative adhesion sites in human fibrinogen for vascular endothelial cells // *Biochemistry*. — 1996. — Vol. 35, no. 13. — P. 4169–4175.
234. Guven B., Can M., Tekin A. Comparison of fibrinogen concentrations determined by the clauss method with prothrombin-derived measurements on an automated coagulometer // *The Journal of Applied Laboratory Medicine*. — 2022. — Vol. 7, no. 6. — P. 1337–1345.
235. Li X. H. [et al.]. Fibrinogen: a marker in predicting diabetic foot ulcer severity // *Journal of Diabetes Research*. — 2016. — Vol. 2016. — P. 1–5.
236. Синицына О. В., Ахметова А. И., Яминский И. В. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов: новые диагностические возможности // *Медицина и высокие технологии*. — 2022. — Т. 1. — С. 9–12.
237. Barns S. [et al.]. Investigation of red blood cell mechanical properties using AFM indentation and coarse-grained particle method // *BioMedical Engineering On-Line*. — 2017. — Vol. 16, no. 1.
238. Ermolinskiy P. B. [et al.]. Forces of interaction of red blood cells and endothelial cells at different concentrations of fibrinogen: measurements with laser tweezers in vitro // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. — Netherlands, 2023. — P. 1–10.
239. Maksimov M. K. [et al.]. RBC aggregation, deformation, and adhesion to endothelium: role of nitric oxide derived from L-arginine and sodium nitroprusside // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — Singapore, Singapore, 2024. — Vol. 17, no. 05. — P. 2440001.
240. Schwartz D. [et al.]. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. // *Journal of Clinical Investigation*. — 1997. — Vol. 100, no. 2. — P. 439–448.

241. Park S. W., Intaglietta M., Tartakovsky D. M. Impact of endothelium roughness on blood flow // *Journal of Theoretical Biology*. — 2012. — Vol. 300. — P. 152–160.
242. Semenov A. N. [et al.]. Laser aggregometry assessment of blood microrheology in a slit fluidic channel covered with endothelial cells // *Journal of Biophotonics*. — 2024. — Vol. 17, no. 12.
243. Lim H.-J. [et al.]. Measurement of the temperature-dependent threshold shear-stress of red blood cell aggregation // *Review of Scientific Instruments*. — 2009. — Vol. 80, no. 9.
244. Neumann F. .-, Schmid-Schonbein H., Ohlenbusch H. Temperature-dependence of red cell aggregation // *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. — 1987. — Vol. 408, no. 5. — P. 524–530.
245. Singh M., Stoltz J. F. Influence of temperature variation from 5 degrees C to 37 degrees C on aggregation and deformability of erythrocytes // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. — 2002. — Vol. 26, no. 1. — P. 1–7.
246. Ermolinskiy P. B. [et al.]. Effect of different macromolecules on viscous and microrheologic properties of blood at various temperatures // *Proceedings of SPIE*. Vol. 11065. — Bellingham, WA, United States : SPIE, 2019. — P. 1106507-1–1106507-5. — (Saratov Fall Meeting 2018: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine).
247. Lee S. J., Ha H., Nam K.-H. Measurement of red blood cell aggregation using X-ray phase contrast imaging // *Optics Express*. — 2010. — Vol. 18, no. 25. — P. 26052.
248. Baskurt O. K. [et al.]. Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. — 2009. — Vol. 43, no. 4. — P. 283–298.
249. Lademann J. [et al.]. Investigation of the aggregation and disaggregation properties of erythrocytes by light-scattering measurements // *Optical Diagnostics of Biological Fluids V* / ed. by A. V. Priezzhev, T. Asakura. — SPIE, 2000.
250. Priezzhev A. V. [et al.]. Aggregation and disaggregation of erythrocytes in whole blood: study by backscattering technique // *Journal of Biomedical Optics*. — 1999. — Vol. 4, no. 1. — P. 76.

251. Donner M., Siadat M., Stoltz J. Erythrocyte aggregation: approach by light scattering determination // *Biorheology* / ed. by E. Fukada, T. Azuma. — 1988. — Vol. 25, no. 1/2. — P. 367–376.
252. Charansonney O. L. [et al.]. Description and validation of a new, simple, easy-to handle, point-of-care technique for measuring erythrocyte aggregation kinetics // *Scientific Reports*. — 2022. — Vol. 12, no. 1. — P. 1–8.
253. Charansonney O. L. [et al.]. Evaluation of a new point-of-care diagnostic test measuring inflammation in emergency settings // *Scientific Reports*. — 2023. — Vol. 13, no. 1. — P. 1–7.
254. Shin S. [et al.]. Characteristics of blood flow resistance under transverse vibration: red blood cell suspension in dextran-40 // *Annals of Biomedical Engineering*. — 2003. — Vol. 31, no. 9. — P. 1077–1083.
255. Shin S. [et al.]. Light-transmission aggregometer using a vibration-induced disaggregation mechanism // *Review of Scientific Instruments*. — 2004. — Vol. 76, no. 1. — P. 016107.
256. Shin S. [et al.]. A noble RBC aggregometer with vibration-induced disaggregation mechanism // *Korea-Australia Rheology Journal*. — 2005. — Vol. 17, no. 1. — P. 9–13.
257. Baskurt O. K. [et al.]. Photometric measurements of red blood cell aggregation: light transmission versus light reflectance // *Journal of Biomedical Optics*. — 2009. — Vol. 14, no. 5. — P. 054044.
258. Namgung B. [et al.]. Vibration motor-integrated low-cost, miniaturized system for rapid quantification of red blood cell aggregation // *Lab on a Chip*. — 2020. — Vol. 20, no. 21. — P. 3930–3937.
259. Arrieta Terreros J. M. The development of a low-powered and portable erythrocyte aggregometer for point-of-care use : master thesis / Arrieta Terreros Juan Manuel. — Griffith University, Australia, 2017.
260. Toderi M. A., Castellini H. V., Riquelme B. D. Descriptive parameters of the erythrocyte aggregation phenomenon using a laser transmission optical chip // *Journal of Biomedical Optics*. — 2017. — Vol. 22, no. 1. — P. 017003.

261. Тухватулин Р. Т. Адаптивные изменения обратимой агрегации эритроцитов : докторская диссертация / Тухватулин Р. Т. — Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия, 1996.
262. Способ определения полупериода агрегации эритроцитов : Авторское свидетельство 1262376 А1 / Р. Т. Тухватулин. — Заявл. 1986. — МПК G01N 33/48.
263. Sakariassen K. S., Orning L., Turitto V. T. The impact of blood shear rate on arterial thrombus formation // *Future Science OA*. — 2015. — Vol. 1, no. 4.
264. Sohrabi S., Liu Y. A cellular model of shear-induced hemolysis: a cellular model of shear-induced hemolysis // *Artificial Organs*. — 2017. — Vol. 41, no. 9. — P. 80–91.
265. Chen Y., Sharp M. K. A strain-based flow-induced hemolysis prediction model calibrated by in vitro erythrocyte deformation measurements // *Artificial Organs*. — 2010. — Vol. 35, no. 2. — P. 145–156.
266. Arwatz G., Smits A. A viscoelastic model of shear-induced hemolysis in laminar flow // *Biorheology*. — 2013. — Vol. 50, no. 1/2. — P. 45–55.
267. Mendieta J. B. [et al.]. The importance of blood rheology in patient-specific computational fluid dynamics simulation of stenotic carotid arteries // *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. — 2020. — Vol. 19, no. 5. — P. 1477–1490.
268. Nader E. [et al.]. Blood rheology: key parameters, impact on blood flow, role in sickle cell disease and effects of exercise // *Frontiers in Physiology*. — 2019. — Vol. 10.
269. Ермолинский П. Б. Портативный лазерный агрегометр крови [Online]. — 2024. — Режим доступа: <https://github.com/Petr-Ermolinskiy/PLAC.git>.
270. Фирсов Н. Н. [и др.]. Новый параметр микрореологии крови: петля гистерезиса агрегационных свойств эритроцитов // *Тромбоз, гемостаз и реология*. — 2010. — Т. 2. — С. 34—9.
271. Кошелев В. Б. [и др.]. Обратимая агрегация эритроцитов при течении крови с возрастающей и с уменьшающейся скоростью // *Тромбоз, гемостаз и реология*. — 2018. — Т. 2, № 2.
272. Giavarina D. Understanding bland altman analysis // *Biochemia Medica*. — 2015. — Vol. 25, no. 2. — P. 141–151.

273. Uyuklu M. [et al.]. Wavelength selection in measuring red blood cell aggregation based on light transmittance // *Journal of Biomedical Optics*. — 2011. — Vol. 16, no. 11. — P. 117006.
274. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теоретическая физика: Учебное пособие. В 10 т. Т. VI. Гидродинамика / под ред. Г. ред. физ-мат. лит. — 3-е изд. — Москва : Наука, 1986. — С. 736. — Переработанное издание.
275. Bi L., Yang P. Modeling of light scattering by biconcave and deformed red blood cells with the invariant imbedding T-matrix method // *Journal of Biomedical Optics*. — 2013. — Vol. 18, no. 5. — P. 055001.
276. Yurkin M. Discrete dipole simulations of light scattering by blood cells : PhD thesis / Yurkin Maxim. — Universiteit van Amsterdam, 2007.
277. Holt C. A., Sullivan S. P. Permutation tests for experimental data // *Experimental Economics*. — 2023. — Vol. 26, no. 4. — P. 775–812.
278. Noguchi K. [et al.]. Permutation tests are robust and powerful at 0.5% and 5% significance levels // *Behavior Research Methods*. — 2021. — Vol. 53, no. 6. — P. 2712–2724.
279. Good P. Parametric and Bootstrap Tests of Hypotheses. — Springer Series in Statistics, Springer-Verlag, 2005.
280. Welch W. J. Construction of permutation tests // *Journal of the American Statistical Association*. — 1990. — Vol. 85, no. 411. — P. 693–698.
281. Charlier F. Permutation-based statistical tests in python [online]. — 2022. — Access mode: <https://pypi.org/project/permutations-stats>.
282. Huang Y. [et al.]. To permute or not to permute // *Bioinformatics*. — 2006. — Vol. 22, no. 18. — P. 2244–2248.
283. Zelený D. Monte Carlo permutation test in constrained ordination [online]. — 2022. — Access mode: https://www.davidzeleny.net/anadat-r/doku.php/en:monte_carlo.
284. Nickels L., Fischer-Baum S., Best W. Single case studies are a powerful tool for developing, testing and extending theories // *Nature Reviews Psychology*. — 2022. — Vol. 1, no. 12. — P. 733–747.

285. Solmi F. [et al.]. Extensions of permutation solutions to test for treatment effects in replicated single-case alternation experiments with multivariate response // Communications in Statistics - Simulation and Computation. — 2013. — Vol. 43, no. 5. — P. 1036–1051.
286. Vroegindeweij A. [et al.]. The permutation distancing test for dependent single-case observational AB-phase design data: a Monte Carlo simulation study // Behavior Research Methods. — 2023. — Vol. 56, no. 3. — P. 2569–2580.
287. Ermolinskiy P. GitHub repository: Paired-Permutation-Test-With-SD [online]. — 2024. — Access mode: <https://github.com/Petr-Ermolinskiy/Paired-Permutation-Test-With-SD>.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Валидация 2D модели агрегации жестких клеток

Аннотация: В данном приложении представлен результат, полученный с помощью модели 2D АЭ: измерение скорости АЭ в первые 2 секунды их взаимодействия в зависимости от молекулярной массы макромолекул. Был получен ожидаемый результат колоколообразной зависимости скорости АЭ при изменении параметра молекулярной массы. Требуется дальнейшая разработка и усовершенствование модели.

Программный код модели 2D АЭ, а также пример использования доступны в открытом репозитории GitHub [65]. Там же в комментариях к программному коду описаны основные положения моделирования. Кратко:

- Эритроциты в 2D модели моделируются жесткими прямоугольниками, стороны которых можно изменять. Эритроциты могут двигаться только по одной оси.
- В модели не учитывается электростатическое отталкивание.
- Макромолекулы моделируются сферами (кругами в 2D).
- Макромолекулы движутся по броуновскому закону и сталкиваются с эритроцитами. Тем самым учитывается только вклад осмотических сил со стороны макромолекул.

Программа позволяет задавать различные настройки моделирования, сохранять полученные данные в разных форматах.

Была проведена симуляция АЭ при изменении параметра молекулярной массы макромолекул при настройках, приведенных в табл.11.

Таблица 11: Настройки моделирования для валидации 2D модели АЭ.

Параметр	Значение
Длина эритроцита	7 мкм
Ширина эритроцита	2 мкм
Изначальное перекрытие	5%
Время моделирования	2 сек.
Шаг моделирования	0,01 сек.
Температура	300 К
Вязкость	0,0013 Па*сек.
Концентрация макромолекул	20 мг/мл

В результате моделирования были получены траектории движения центров эритроцитов. Расстояние между центрами клеток в зависимости от времени дифференцировалось, чтобы получить скорость АЭ в промежуток 2 сек. после начала агрегации. Далее вычислялась средняя скорость АЭ и её стандартное отклонение для каждой заданной молекулярной массы от 30 до 1000 кДа. Результаты моделирования представлены на рис.51.

Обсуждение и заключение

На рис.51 видна колоколообразная зависимость скорости АЭ в зависимости от молекулярной массы макромолекул при одинаковой их концентрации 20 мг/мл. Полученные данные согласуются с литературными, в которых на примере декстрана показана такая же тенденция [4]. Более того видно, что в данной модели АЭ не идет при молекулярной массе меньше 60 кДа, что согласуется с литературными данными [53].

Преимущество и недостаток данной модели АЭ над существующими заключается в том, что обедненный слой явным образом не представлен в модели — вместо этого он получается при моделировании движения макромолекул и эритроцитов. Вместе с этим в модель можно добавить различные уточнения: деформируемость клеток, возможность добавления нескольких типов макромолекул, электростатическое отталкивание клеток и др. Данная модель вместе с тем требовательна к вычислительным ресурсам.

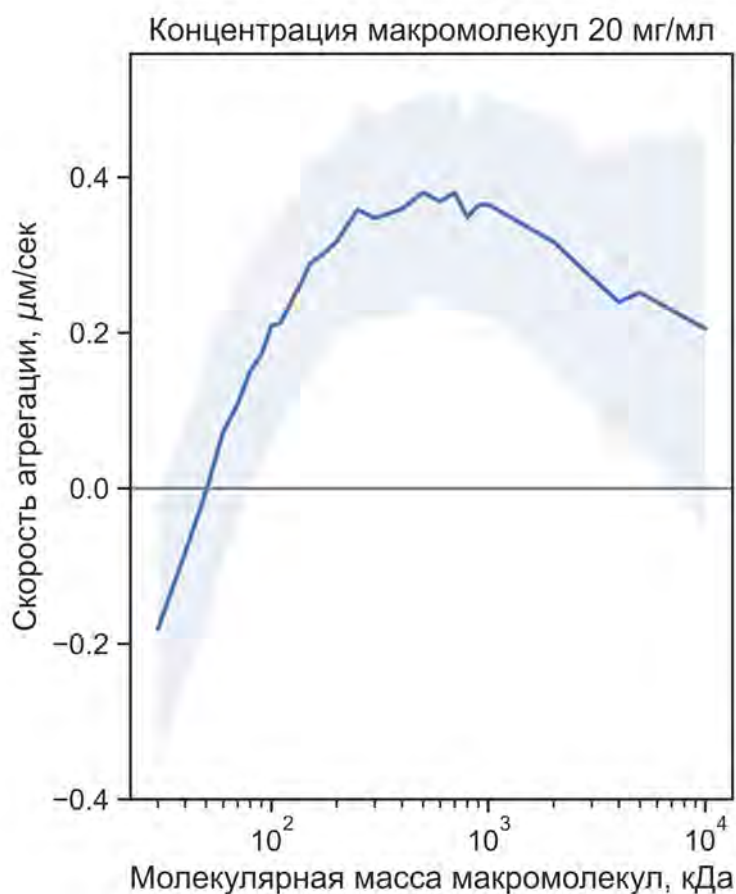


Рис. 51: Усредненная скорость АЭ за 2 секунды при начальном контакте клеток 5% в зависимости от молекулярной массы макромолекул. Полупрозрачная область над и под кривой — стандартное отклонение.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Численный расчет силы Стокса для эритроцита

Аннотация: В данном приложении приведены результаты моделирования сил вязкого трения, действующих на эритроцит в потоке. Численно рассчитан коэффициент K для формулы 2.3. Получено, что данная формула применима для скоростей от 1 до 250 мкм/сек. Аналитический результат из формулы 2.4 близок в численному.

Формула Стокса 2.3 для вычисления силы трения, действующую на сфероид/сферу со стороны потока жидкости, была получена в предположении ламинарного потока. Иначе говоря, данная формула применима при малом числе Рейнольдса, которое выступает критерием ламинарного потока:

$$Re = \frac{\rho v D_r}{\eta}, \quad (P.1)$$

где ρ – плотность жидкости, v – скорость потока жидкости относительно сферы, D_r – гидравлический диаметр, являющийся мерой пропускания потока жидкости, η – динамическая вязкость среды.

От формы объекта зависит, при каких числах Рейнольдса происходит переход от ламинарного течения к турбулентному [274].

Основной целью моделирования эритроцита в потоке жидкости являлось сравнить коэффициент фактора формы K , вычисленного по формуле 2.4 при аппроксимации эритроцита эллипсоидом, с коэффициентом фактора формы, рассчитанным численно для эритроцита, форма которого представляет из себя двояковогнутый диск, при разных скоростях потока.

Программный комплекс и начальные условия моделирования

Для гидродинамического моделирования был использован программный комплекс COMSOL Multiphysics 6.1²⁴ с использованием модуля Laminar Flow и модуля Turbulent Flow, $k - \epsilon$. Уравнения, решаемые интерфейсом Turbulent Flow, $k - \epsilon$, — это уравнения Навье-Стокса. Эффекты турбулентности моделируются с помощью стандартной модели $k - \epsilon$. Валидация подхода вначале была продемонстрирована на сферах, для которых коэффициент K равняется 1 (см. уравнение 2.4).

Форма эритроцита — двояковогнутый диск — может моделироваться разными поверхностями: это модель Юркина, Фанга, Скалака, овал Кассини и др. [275]. В данной работе использовалась модель Юркина; форма эритроцита аппроксимиро-

²⁴<https://www.comsol.com/product-download/6.1>

валась следующим уравнением [276]:

$$\rho^4 + 2R_4\rho^2z^2 + z^4 + R_1\rho^2 + R_2z^2 + R_3 = 0, \quad (\text{P.2})$$

где R_1, R_2, R_3 и R_4 :

$$\begin{aligned} R_1 &= -\frac{D^2}{4} - \frac{b^2h^2}{4D^2} + \frac{b^2c^4}{4D^2(h^2 - b^2)}, R_2 = \frac{D^4 + 4D^2R_1 - b^4}{4b^2} \\ R_3 &= -\frac{d^2}{16}(D^2 + 4R_1), R_4 = -\frac{c^2 + 2R_1}{h^2} \end{aligned} \quad (\text{P.3})$$

где c – это диаметр кольца, соответствующий максимальной толщине эритроцита, D – это максимальный размер эритроцита, h – максимальная толщина, а b – минимальная толщина. Для моделирования использовались следующие значения параметров [276]: $R_1 = -14,3 \text{ мкм}^2$, $R_2 = 38,9 \text{ мкм}^2$, $R_3 = -4,57 \text{ мкм}^4$, $R_4 = -0,193$, что соответствует эритроциту с максимальным размером $7,65 \text{ мкм}$ и максимальной толщиной $2,44 \text{ мкм}$.

3D модель в формате *stl* создавалась в Mathematica²⁵, далее модель экспортировалась в SolidWorks²⁶, где преобразовалась из фасетного тела в твердое. И уже после этого 3D модель экспортировалась в COMSOL Multiphysics 6.1.

Скорость потока задавалась от 10 мкм/сек. до 250 мкм/сек. с шагом 10 мкм/сек. Вязкость среды задавалась $1,3 \times 10^{-3} \text{ мПа*сек.}$, а температура – 20°C .

Результаты моделирования

По результатам численного моделирования было получено, что коэффициент K почти никак не изменяется в пределах от 10 до 250 мкм/сек. : его относительное изменение меньше 1% . Это и не удивительно, так как число Рейнольдса для данных скоростей $Re \ll 1$. Результаты сравнения аналитического решения с численным приведена в табл.12.

Видно, что коэффициенты K между численным решением и аналитическим по формуле 2.4 с $\arctan$ отличаются почти на 20% ; тогда как разница между численным решением и аналитическим по формуле 2.4 с $\log$ отличается меньше чем на 10% . Причем для численного моделирования (формула 2.4 с $\arctan$) коэффициент K больше. Это скорее всего обусловлено тем, что геометрия двояковогнутого

²⁵<https://www.wolfram.com/mathematica/>

²⁶<https://www.solidworks.com/>

диска имеет большую площадь поверхности, чем эквивалентный эллипсоид. На рис.52 представлен разрез эритроцита и сплюснутого эллипсоида, которые имеют одинаковые размеры по большей оси и одинаковые коэффициенты K , рассчитанные с помощью численного моделирования. Видно, что эллипсоид, который имеет такой же коэффициент K , как и у двояковогнутого диска, имеет большие поперечные размеры.

Таблица 12: Результаты численного моделирования. Для аналитического расчета использована формула 2.4. * – коэффициент для формулы с $\log$ умножен на 2 (см. [206]).

	Численное моделирование эритроцит	Численное моделирование сфероид (a=3,825 мкм, b=1,22 мкм)	Численное моделирование сфероид (a=3,825 мкм, b=1,8 мкм)
K	0,86	0,77	0,86

	Аналитическое решение Формула 2.4 с $\arctan$	Аналитическое решение Формула 2.4 с $\log^*$
K	0,72	0,94

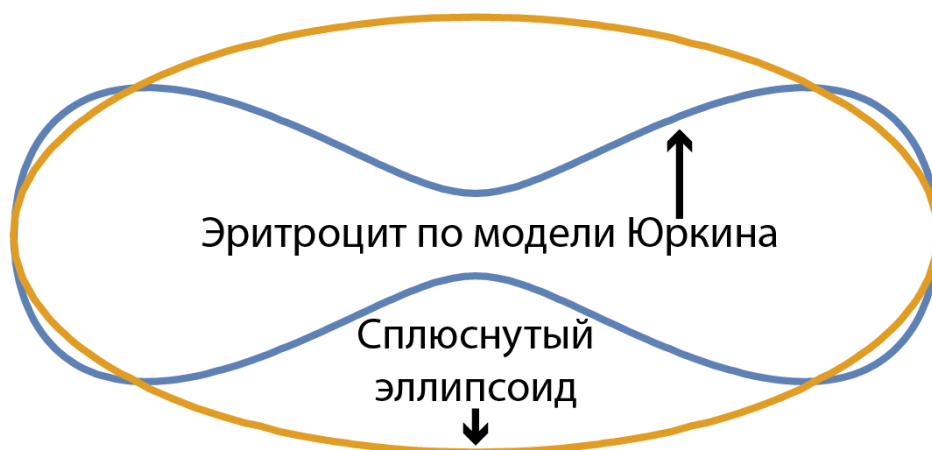


Рис. 52: 2D разрез эритроцита, моделируемого моделью Юркина (см. уравнение P.2) со сторонами 7,65 мкм и 2,44 мкм и эллипсоида со сторонами 7,65 мкм и 3,2 мкм. Два данных объекта имеют одинаковый коэффициент K (см. формулу 2.3).

Заключение

Проведенное численное моделирование показывает применимость модифицированного закона Стокса для калибровки оптической ловушки, а также дает дополнительную степень свободы для улучшения вычисляемых численных результатов силы захвата эритроцита в эксперименте.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Расширение парного пермутационного теста

Аннотация: В данном приложении представлено дополнение к пермутационному тесту для зависимых выборок, в котором помимо средних значений параметров используется ошибка измерения. Этот статистический тест, относящийся к непараметрическим тестам, особенно применим, когда размер выборки меньше 5-7 образцов/испытуемых, и позволяет проверять гипотезы о статистической значимости без строгих предположений о распределении измеряемой величины. Для оценки эффективности и обоснованности этого подхода необходимы дополнительные исследования.

Пермутационные тесты²⁷ — это непараметрические статистические методы, используемые для оценки значимости наблюдаемых различий в зависимых или независимых выборках [277]. Обычно они применяются, когда нарушаются предположения параметрических и/или непараметрических тестов, в основном при работе с небольшими выборками ($N < 10$). Пермутационные тесты дают точные p -значения и устойчивы к выбросам, присутствующим в данных [278].

Нулевая гипотеза в пермутационных тестах заключается в том, что в случае, если сравниваемые выборки происходят из одной и той же генеральной совокупности, тогда обмен элементами между выборками не должен существенно поменять тестовую статистику (среднее, медиану, или др.). Тем самым, статистическая значимость проверяется путем нахождения положения значения тестовой статистики изначальных данных на распределении тестовой статистики для «перемешанных». Данные случайным образом перетасовываются или переставляются, чтобы создать всевозможные выборки данных. Тестовая статистика рассчитывается для каждой перестановки, и распределение этих тестовых статистик образует нулевое распределение, или же нулевую гипотезу [279]. Поэтому пермутационные тесты доступны для любой тестовой статистики, независимо от того, известно ее распределение или нет [280]. Например, можно выполнить пермутационную версию теста Бруннера-Мюнзеля или Манна-Уитни на языке программирования `python` [281].

Основные шаги пермутационного теста включают:

1. Вычисление наблюдаемой тестовой статистики (среднее, медиану или т.д.) на исходных выборках.
2. Случайная перестановка (отличается для зависимых/независимых данных) в выборках для создания всех возможных новых выборок.

²⁷Иногда их называют «перестановочными».

3. Вычисление тестовой статистики для каждой из новых выборок.
4. Сравнение исходной тестовой статистики с распределением статистик, полученных на новых выборках. Определение р-значения по положению исходной тестовой статистики на распределении.
5. Вывод о статистической значимости на основании р-значения.

Очень важно отметить, что «перестановка» предполагает взаимозаменяемость данных между выборками. В большинстве случаев это означает, что дисперсии разных выборок должны быть равны. Использование пермутационного теста для данных с неравными дисперсиями может привести к увеличению количества ошибок первого рода (ложноположительное заключение) даже при равных средних значениях [282]. В этом случае можно принять более общую альтернативную гипотезу или контролировать частоту ошибок первого рода с помощью модифицированных тестов или алгоритмов тестирования [277].

При большом объеме выборки можно сформировать асимптотически эквивалентный пермутационный тест. Для этого необходимо создать эталонное распределение с помощью метода Монте-Карло, который случайным образом отбирает небольшую выборку возможных перестановочных выборок по сравнению с общим числом перестановок [283].

В основном пермутационные тесты используются в исследованиях, где размер выборки невелик, в том числе в «*single case study*» (единичное исследование). «*Single case studies*» широко используются в клинической практике из-за непрактичности или невозможности проведения крупномасштабных испытаний. В настоящее время они являются ценным инструментом для проверки различных медицинских, психологических и других гипотез [284]. Было показано, что пермутационный тест для проверки эффекта лечения пациентов показывает устойчивость при нулевой гипотезе и эффективность при альтернативной [285, 286].

В данной работе представлено дополнение пермутационного теста для зависимых данных с небольшим числом образцов/пациентов. Основная идея дополнения заключается в том, что в основном все тесты используют только средние значения, в то время как в медицинском или другом эксперименте при оценке параметров существует ошибка измерения и/или усреднения. Используя стандартное отклонение или другую ошибку для каждого измерения обработки, можно ожидать более точной вывод о статистической значимости между выборками.

Алгоритм предлагаемого теста со стандартным отклонением

Парный пермутационный тест, как и другие статистические тесты для зависимых данных, направлен на выявление различий между двумя группами: до (первая) и после лечения/воздействия (вторая). Далее для простоты две группы будем называть «до лечения» и «после лечения». Обычно рассматриваемый параметр в статистике имеет некоторую погрешность измерения (к примеру, стандартное отклонение (SD), инструментальная ошибка и т.д.), которую обычно опускают при использовании статистических тестов, например, теста Уилкоксона²⁸. Далее в тексте SD будет рассматриваться как ошибка измерения.

Дополнение парного пермутационного теста направлено на использование SD в алгоритме. Дополненный тест включает следующие шаги:

1. Вычисление тестовой статистики на изначальных данных, т.е. среднюю разницу параметров пациентов в процентах до и после лечения.
2. Создание 2 больших выборок всевозможных данных для первой и второй группы. Каждое значение до и после лечения может быть представлено тремя способами, т.е. (1) среднее, (2) среднее + SD и (3) среднее - SD. Например, из 2 значений с SD можно получить 9 комбинаций (см. рис.53). Тем самым количество перестановок для одной группы будет равно 3^N , где N – это количество данных в выборке.
3. Из созданных выборок получаются всевозможные комбинации 2 групп до и после лечения. Тем самым создается весь ряд наборов данных первой и второй групп.
4. Вычисляется средняя разница параметров по пациентам в процентах между всеми возможными наборами данных.
5. Изначальная тестовая статистика сравнивается с распределением полученной тестовой статистики. По её положению определяется р-значение.
6. На основании р-значения принимается нулевая или альтернативная гипотеза.

²⁸Wilcoxon signed-rank

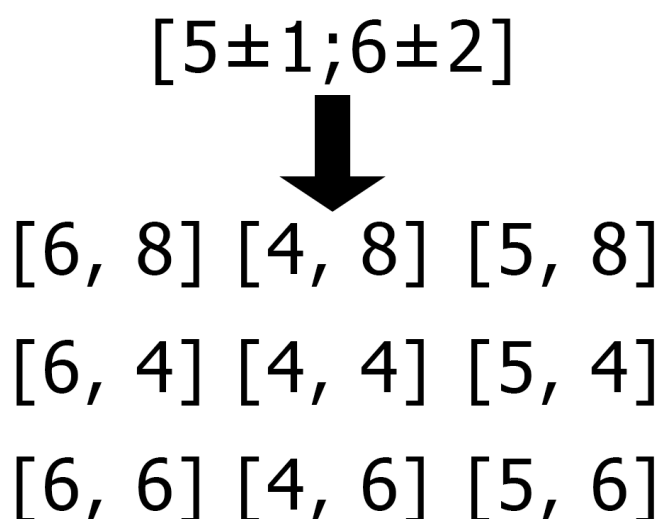


Рис. 53: Демонстрация создания новых наборов данных одной группы из двух значений с SD.

Предложенный алгоритм позволяет на выходе получить $(2 \times 3)^N * 2^N = 18^N$ значений средних отклонений между группами до и после лечения в процентах, где N – это количество образцов/пациентов. Алгоритм тем самым имеет сложность $\mathcal{O}(18^N)$. Поэтому данный тест разумно использовать на небольшой выборке размером меньше 5-7 образцов/испытуемых. Для выборок больше указанных размеров преимущество данного теста над другими непараметрическими тестами практически теряется. Все описанные выше шаги реализованы на языке `python`, и код доступен в репозитории GitHub [287].

Примеры использования

В табл.13–15 приведены три примера использования парного пермутационного теста с SD. При сравнении табл.13 и табл.14 видно, что увеличение значений SD существенно влияет на получаемое р-значение. Поэтому в выборках с небольшим числом данных/испытуемых крайне важно оценить ошибку каждого значения.

Чтобы проиллюстрировать значимость SD, рассмотрим набор данных, содержащий по 6 испытуемых до и после лечения (табл.15), причем относительная ошибка каждого значения составляет менее 5%. Рассчитанное с помощью теста Тест Уилкоксона, р-значение составляет менее 0,02, тогда как, рассчитанное с помощью предложенной парной перестановки с SD, превышает 0,05. Это может быть предварительным свидетельством того, что в небольших выборках Тест Уилкоксона (или парный тест без учета SD) может давать ложную положительную статистическую значимость, когда ошибка значений не является пренебрежимо малой.

Таблица 13: Рассчитанные р-значения для примера, в котором относительные ошибки порядка 10%, с помощью Теста Уилкоксона и предложенного парного пермутационного теста с SD.

Статистический тест	Пример 1	
	До лечения	После лечения
Среднее	[20; 33; 20; 24]	[21; 34; 22; 25]
SD	[2; 2; 2; 2]	[2; 2; 2; 2]
Тест Уилкоксона	0,063	
Парный пермутационный тест с SD	0,1874	

Таблица 14: Рассчитанные р-значения для примера, в котором относительные ошибки меньше 5%, с помощью Теста Уилкоксона и предложенного парного пермутационного теста с SD.

Статистический тест	Пример 2	
	До лечения	После лечения
Среднее	[20; 33; 20; 24]	[21; 34; 22; 25]
SD	[0,5; 0,5; 0,5; 0,5]	[0,5; 0,5; 0,5; 0,5]
Тест Уилкоксона	0,063	
Парный пермутационный тест с SD	0,045	

Таблица 15: Рассчитанное р-значение для примера, когда ошибки измерения высоки как в группе "До лечения так и в "После лечения". Был использован тест Уилкоксона и предложенный парный пермутационный тест с SD.

Статистический тест	Пример 3	
	До лечения	После лечения
Среднее	[40; 45; 51; 60; 38; 44]	[41; 48; 51,1; 62; 38,5; 46]
SD	[1; 2; 0,5; 1; 0,6; 0,3]	[0,5; 2; 0,9; 0,5; 0,7; 0,1]
Тест Уилкоксона	0,016	
Парный пермутационный тест с SD	0,052	

Заключение

Пермутационные тесты дают гибкий и мощный подход к проверке гипотез в статистике и позволят исследователям делать надежные выводы без строгих предположений о распределении. Пермутационные тесты обеспечивают надежный метод оценки значимости наблюдаемых эффектов и/или различий в широком спектре областей исследований.

В данной работе предлагается и обсуждается дополнение пермутационного теста для зависимых данных в выборках с небольшим числом испытуемых. Основное дополнение данного теста состоит в использовании ошибки измерений каждого значения, что дает дополнительную степень свободы при расчете. Была написана программа, позволяющая рассчитывать p -значение между двумя зависимыми выборками. Были проведены сравнения с тестом Уилкоксона. Показано, что при большой ошибке измерения тест Уилкоксона может давать ложноположительный результат.

Предполагается, что предложенный тест будет полезен в исследованиях с малых количеством данных, в которых нельзя игнорировать ошибку измерения. Требуется дальнейшее изучение и валидация данного теста.