

**УДК 577.3**

## **ДЕГАЗАЦИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ МЕНЯЕТ СКОРОСТЬ ОСЕДАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ**

*Зинченко А.А., Шаталов В.М.*

*Донецкий национальный университет, Донецк, Украина  
E-mail: alinazina@gmail.com*

Получены нормировочные графики изменения парциального давления растворенных в плазме крови газов  $O_2$  и  $CO_2$  в зависимости от продолжительности центрифугирования образцов. Показано, что центрифугирование крови, приводит к немономонному изменению скорости оседания эритроцитов (СОЭ), сначала к снижению, а затем к росту СОЭ в несколько раз. Приводятся доказательства того, что этот эффект связан с дегазацией плазмы крови. Обсуждается модель, согласно которой изменение СОЭ связано с адсорбцией микропузырьков воздуха на мембране эритроцитов.

**Ключевые слова:** дегазация, центрифуга, микропузырьки, адсорбция, эритроциты, кровь, плазма.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) является важным неспецифическим лабораторным тестом, помогающим врачу-клиницисту в диагностике многих заболеваний. Более ста лет данный показатель применяется для количественного определения интенсивности разнообразных воспалительных процессов. Считается [1], что скорость, с которой происходит оседание эритроцитов определяется, в основном, степенью их агрегации. Из-за того, что при образовании агрегатов уменьшается отношение площади поверхности частиц к их объёму, сопротивление агрегатов эритроцитов трению оказывается меньше, чем суммарное сопротивление отдельных эритроцитов, поэтому скорость их оседания увеличивается. Агрегация эритроцитов главным образом зависит от их электрических свойств и белкового состава плазмы крови. В норме эритроциты несут отрицательный заряд, обусловленный сиаловыми кислотами, входящих в состав клеточных мембран и отталкиваются друг от друга. Величина заряда зависит от возраста эритроцита и белкового состава плазмы. Увеличение отрицательного заряда усиливает взаимное отталкивание эритроцитов и препятствует их оседанию.

Механизм влияния плазменных факторов на оседание эритроцитов окончательно не выяснен. Степень агрегации (а значит и СОЭ) повышается при увеличении концентрации в плазме так называемых белков острой фазы – маркеров воспалительного процесса, в первую очередь, фибриногена, С-реактивного белка, церулоплазмينا, иммуноглобулинов и других. Это явление объясняется диэлектрическим эффектом белковых молекул, проявляющимся в уменьшении отрицательного заряда эритроцитов. На заряд эритроцитов существенно влияет

изменение концентрации мелко- и грубодисперсных белков плазмы (альбуминов и глобулинов), поскольку изоэлектрическая точка глобулинов лежит ближе к нейтральной реакции, чем альбуминов. Способность грубодисперсных белков в т.ч. и фибриногена увеличивать скорость оседания эритроцитов связывают с их сродством к полипептидам. Сложные белково-полипептидные комплексы обладают значительной гидрофильностью, обеспечивающей их стабильность в плазме крови. В физиологических условиях существует постоянство взаимоотношений между полипептидами, свободно циркулирующими в крови и адсорбированными на поверхности эритроцитов. Напротив, СОЭ снижается при увеличении концентрации альбуминов. В плазме существуют и блокаторы оседания эритроцитов – физиологические ингибиторы лизоцима, жирные и желчные кислоты.

Хотя воспаление является наиболее частой причиной ускорения оседания эритроцитов, увеличение СОЭ также может обуславливаться и другими, в том числе и не всегда патологическими, состояниями. Отсутствие ясности в этом вопросе и по сей день стимулирует исследования, направленные на выяснение механизма формирования СОЭ и факторов, влияющих на этот показатель. Так в работе [2] показано, что заметное оседание эритроцитов начинается после длительного латентного периода. В ходе оседания наблюдаются периоды резкого ускорения и замедления скорости движения границы между клетками и чистой плазмой [3]. Обнаружены отличия в динамике оседания крови здоровых доноров и больных с острым инфарктом миокарда.

Авторы работы [4], исследовав поведение СОЭ при компрессии и декомпрессии приходят к выводу, что полученные результаты можно объяснить, если предположить существование связанных с эритроцитами газовых полостей. Согласно [4], эти полости, возможно, существуют в виде кластеров из мелких пустот и имеют свободную границу с жидкостью, подобно тому, как это устроено в клетках фитопланктона. Образование таких полостей изменяет балансировку и ориентацию тела эритроцита при оседании, что может привести к увеличению СОЭ в 1.5 раза. Однако в этих же опытах СОЭ увеличивается почти в 4 раза.

В работе [5] обнаружено немонотонное изменение СОЭ в зависимости от степени дегазации образцов крови. В течение первых 20 минут дегазации методом центрифугирования СОЭ уменьшается в четыре раза, в последующие 20 минут – возрастает в 2.5 раза относительно начального значения, и не меняется при дальнейшей обработке. Сделан вывод о том, что дегазация влияет на стабильность структуры и функционирование белков крови, поскольку дегазации сопутствует изменение гидрофобного взаимодействия – согласно [6], дегазация приводит к росту коэффициента поверхностного натяжения воды на несколько процентов. Однако причины немонотонного поведения СОЭ при дегазации крови оставались невыясненными.

Настоящая работа предпринята с целью выяснения причин и механизма изменения СОЭ при дегазации. С этой целью мы изменили методику, которая применялась в работе [5], сначала отделили эритроциты, центрифугировали образцы плазмы, а затем помещали эритроциты в плазму и измеряли СОЭ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Как известно, кровь в организме животного и человека выполняет кроме всего еще и дыхательную функцию, осуществляя транспорт кислорода воздуха от капилляров легочных альвеол к капиллярам тканей и обратный транспорт углекислого газа. При этом небольшая часть газов находится в растворенном состоянии в плазме, через которую газ диффундирует от капилляров к эритроцитам или наоборот, в зависимости от направления градиента парциального давления. Таким образом, количество газа в плазме определяет направление и скорость его переноса между клетками эритроцитов и капиллярами.

В работах [5, 7] для дегазации крови использовалось центрифугирование образцов. Дело в том, что в силу гидрофобности воздуха небольшая его часть собирается из раствора в стабильные микропузырьки, причем, центрами нуклеации таких пузырьков являются комплексы положительных ионов с молекулами растворенного газа [8]. Центрифугирование ускоряет рост и всплытие микропузырьков. Им на смену образуются новые пузырьки, которые собирают новую порцию газа, приводя тем самым к дегазации раствора.

В настоящей работе мы получили градуировочный график (рис. 1), связывающий продолжительность центрифугирования со степенью дегазации плазмы крови. Определение содержания газов, растворенных в плазме крови, проводили в отдельных пробах без доступа воздуха при атмосферном давлении 743 mmHg на модульном анализаторе OMNI C фирмы Roche (Швейцария). Для этого плазма предварительно отделялась от эритроцитарной массы после 15 минут центрифугирования при 3000 об/мин и температуре 4°C. Затем при комнатной температуре часть плазмы выдерживалась в центрифуге при 3000 об/мин, а другая часть оставалась в качестве контроля. Опыт выполнялся в двух повторностях.

Как видно из Рис. 1, с увеличением продолжительности центрифугирования содержание растворенного кислорода и углекислого газа в плазме существенно уменьшается относительно контрольных значений. Скорость дегазации при центрифугировании, очевидно, пропорциональна количеству растворенного газа, что приводит к экспоненциальному падению газосодержания со временем. Поэтому относительные парциальные давления кислорода и углекислого газа в плазме крови в зависимости от времени центрифугирования  $t_d$  (в минутах) вполне удовлетворительно описываются формулами  $\exp((15-t_d)/14)$  и  $\exp((15-t_d)/7.5)$  соответственно (сплошные линии на Рис. 1). Эти результаты можно использовать для полуколичественных оценок степени дегазации крови в зависимости от продолжительности центрифугирования.

Для определения скорости оседания эритроцитов в [5] использовался метод Вестергрена с тем отличием, что пробирки с образцами крови с ингибитором свертывания центрифугировались при 3000 об/мин в течение различных периодов времени  $t_d$ . После такой обработки в пробирку помещали металлический шарик, закрывали пробкой осторожно вращали пробу крови в двух плоскостях рукой для равномерного распределения красных кровяных телец и плазмы и затем измеряли СОЭ стандартным методом.

В данной работе мы обрабатывали на центрифуге только плазму, предварительно отделив эритроциты отстаиванием при комнатной температуре. В качестве образцов использовалась кровь здоровых доноров. Для удаления растворенного воздуха отстоявшуюся плазму отбирали в другую пробирку и центрифугировали при 3000 об./мин. После каждого цикла центрифугирования плазму набирали шприцем с металлическим диском, перемещение диска вверх и вниз внутри шприца способствовало перемешиванию плазмы. После добавления эритроцитов образцы перемешивали, чтобы клеточные элементы равномерно распределялись в плазме крови, набирали в узкие пробирки и оставляли в специальном штативе. Величина отстоявшегося столбика фиксировалась через один час. После чего новый образец плазмы подвергался более длительной обработке, затем плазму снова осторожно перемешивали с эритроцитами и снова измеряли СОЭ.

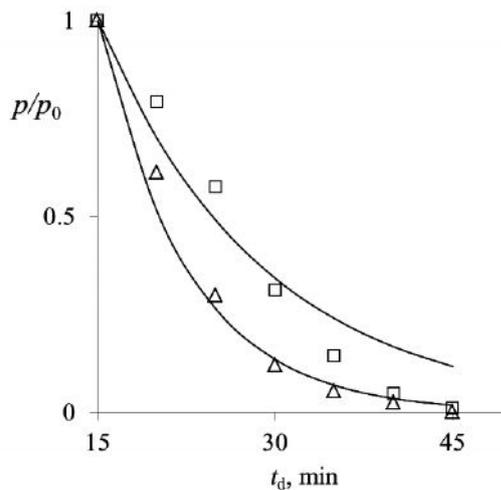


Рис. 1. Парциальное давление растворенного кислорода (квадраты) и углекислого газа (треугольники) в образцах плазмы крови в зависимости от продолжительности центрифугирования  $t_d$  при 3000 об/мин относительно контрольного давления  $p_0$ . Сплошные линии – интерполяционные формулы  $\exp(-t_d/14)$  и  $\exp(-t_d/7.5)$  соответственно.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На Рис. 2 показаны усредненные по разным образцам изменения СОЭ относительно начального значения в зависимости от времени центрифугирования при 3000 об/мин. Кривая с кружочками относится к СОЭ предварительно извлеченных эритроцитов, которые затем были инкубированы в плазме, обработанной в центрифуге. Эти результаты были усреднены по образцам, полученных от трех доноров с начальными значениями СОЭ 5, 8 и 12мм/час. Кривая с треугольниками – средние относительные значения, посчитанные по результатам [5] для образцов крови пяти пациентов с начальными значениями СОЭ 4, 7, 8, 9 и 17мм/час. Поскольку обе кривые совпадают в пределах границ

стандартного отклонения, можно сделать вывод, что изменения СОЭ при центрифугировании обусловлены только лишь изменением свойств плазмы при дегазации.

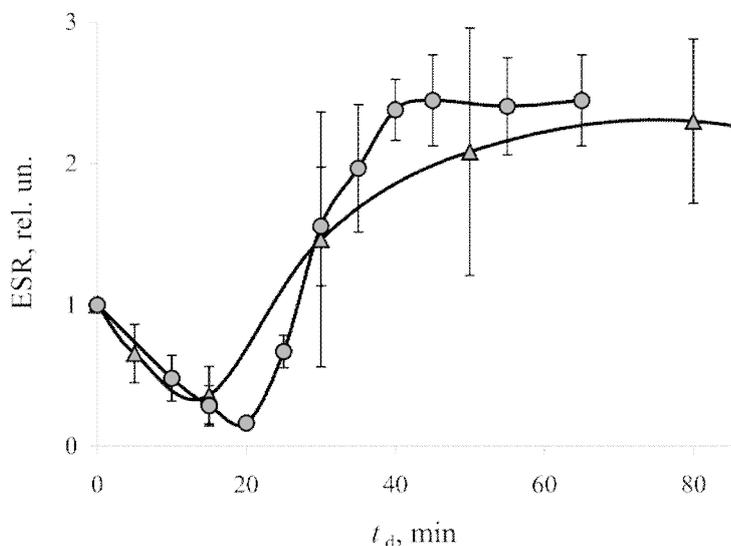


Рис. 2. Скорость оседания эритроцитов после обработки в центрифуге при 3000 об/мин в течение  $t_d$  минут образцов крови (треугольники) и плазмы (кружки) с границами погрешностей и сплайн-интерполяцией (сплошные линии).

Как видно из Рис. 2, продолжительность центрифугирования немонотонно влияет на скорость оседания эритроцитов, что можно объяснить уменьшением содержания растворенного в плазме воздуха. Как было сказано выше, часть растворенных газов воздуха образует микропузырьки. Можно ожидать, что эти микропузырьки будут активно адсорбироваться на мембранах эритроцитов, содержащих поверхностные заряды. Идея эта не нова (см., например, [4]), однако совсем недавно существование пузырьков либо их кластеров на поверхности эритроцита было подтверждено методом лазерной интерференционной микроскопии [9]. По сути, отрицательный заряд мембраны эритроцитов (см. выше) притягивает пузырьки, стабилизированные положительными ионами [8]. Этот факт позволяет нам объяснить наблюдаемый на Рис. 2 ход зависимости СОЭ от времени центрифугирования.

Хорошо известно, что акустические волны, в частности, ультразвук, приводят к дегазации жидкости за счет ускорения роста и всплытия пузырьков. Центрифугирование образцов неизбежно сопровождается вибрацией. Предположим, что в начальной стадии дегазации центрифугированием в результате акустического воздействия происходит рост микропузырьков по механизму односторонней или выпрямленной диффузии [10]. Такая диффузия газа внутрь пузырька возникает даже при равенстве парциальных давлений в растворе и в газовой фазе. При сжатии пузырька концентрация газа в нем увеличивается, и газ

диффундирует из пузырька в жидкость, а при расширении – таким же образом возникает диффузионный поток в обратном направлении. Явление выпрямленной диффузии объясняется тем, что при расширении пузырька его поверхность больше, чем при сжатии, поэтому поток при расширении превышает поток при сжатии. Кроме того, диффузия газа в пузырек идет с большей скоростью вследствие большего градиента концентраций при расширении [10].

Пузырьки воздуха, находящиеся в плазме, адсорбируются на мембранах эритроцитов, что приводит к увеличению выталкивающей силы Архимеда и, следовательно, к уменьшению СОЭ. По мере дегазации плазмы размеры адсорбирующихся пузырьков растут, растет сила Архимеда и СОЭ уменьшается (начальное падение кривой на рис. 2). С ростом размеров пузырьков растет скорость их всплытия, с некоторого момента они не успевают адсорбироваться на эритроцитах или отрываются от них возросшей силой Архимеда. В результате наблюдается рост СОЭ (рост кривой после 20 минут центрифугирования на рис. 2). Так продолжается до полной дегазации, после чего рост СОЭ останавливается.

Остается оценить, достаточно ли в плазме воздуха, чтобы в такой степени менять плотность эритроцитов, точнее, разность плотностей плазмы и эритроцитов. Эта разность достаточно мала и, возможно, небольшие колебания плотности эритроцитов, происходящие из-за адсорбции микропузырьков, изменяют ее в несколько раз. Очевидно, что в такой модели СОЭ будет зависеть от концентрации эритроцитов в плазме, что наблюдается экспериментально.

В обзорах [11, 12] сообщается о достоверном увеличении СОЭ *in vitro* под действием низкоинтенсивных электромагнитных полей (ЭМП) миллиметрового диапазона. Так в работе [13] показано, что обработка крови ЭМП с частотой порядка 60 ГГц и потоком излучения порядка 10 мкВт/см<sup>2</sup> в течение 30 минут приводит к увеличению СОЭ с 6 до 13 мм/час, что приписывается увеличению степени агрегации эритроцитов. Однако, рост агрегации неизбежно связан с увеличением вязкости крови [14], а этот фактор действует в противоположную сторону, в сторону уменьшения СОЭ.

Этот парадокс можно разрешить, если принять гипотезу В.М. Шаталова о дегазирующем действии ЭМП на воду и биожидкости [15]. В этой модели первичными мишенями воздействия ЭМП являются микро- или нанопузырьки растворенного воздуха – поляризация и переменное давление, возникающие при этом на границе скачка плотности, приводят к их росту. Накопление воздействия ЭМП происходит путем дегазации жидкости через рост, слияние и выход микропузырьков, что занимает часы или даже дни. Биологическое действие обусловлено известными изменениями физико-химических свойств жидкости после дегазации. Преимущества этой модели по сравнению с другими теориями состоят в следующем. Во-первых, не нужны предположения о специфических устройствах и условиях для приема излучения, микропузырьки всегда имеются в жидкости, контактирующей с воздухом. Далее, нет «проблемы *kT*», поскольку поле взаимодействует с макрообъектом. И наконец, поскольку биоэффекты от ЭМП сводятся к эффектам дегазации биожидкости, они могут изучаться независимо от воздействия ЭМП, что и делается в настоящей работе. Если принять эту модель, то

с учетом полученных здесь результатов механизм изменения СОЭ под действием ЭМП становится очевидным. ЭМП дегазирует плазму и тем самым меняет объем микропузырьков воздуха, адсорбирующихся на эритроцитах, что в конечном итоге приводит к их десорбции. При этом меняется удельный вес и СОЭ.

### ВЫВОД

Несмотря на свою неспецифичность определение СОЭ всё ещё является одним из наиболее популярных лабораторных тестов для установления факта и интенсивности воспалительного процесса. В настоящей работе показано, что этот показатель существенно зависит от концентрации растворенных в плазме крови газов и, таким образом, может отражать дефекты газообмена в организме человека и животных, а также действие факторов, влияющих на содержание газов в плазме крови таких, как давление, ультразвук, ЭМП и др.

Авторы выражают глубокую благодарность И.Е. Стась за критические замечания и полезные обсуждения.

### Список литературы

1. Чижевский А.Л. Биофизические механизмы реакции оседания эритроцитов / А.Л. Чижевский. – М.: Наука, 1980. – 178 с.
2. Воейков В.Л. О биофизических механизмах реакции оседания эритроцитов / В.Л. Воейков, А.Ю. Дмитриев // Биофизика. – 1998. – Т. 43. – С. 575–579.
3. Немонотонные изменения скорости оседания эритроцитов в цельной крови / В.Л. Воейков, Ю.И. Гуфинкель, А.Ю. Дмитриев [и др.] // Доклады академии наук. – 1998. – Т.359, №5. – С.686–690.
4. Оседание эритроцитов при компрессии и декомпрессии / О.В. Костина, В.Н. Крылов, Г.Я. Левин [и др.] // Доклады академии наук. – 1999. – Т.368, №2. – С.278–279.
5. Зинченко А.А. Влияние дегазации при центрифугировании на некоторые показатели крови / А.А. Зинченко, И.В. Нога, В.М. Шаталов // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – 2009. – №9. – С. 250–255.
6. Ковеза Ю.В. Изменение кислотности и дегазация среды как факторы, влияющие на гидрофобное взаимодействие и активность растительной каталазы / Ю.В. Ковеза, И.В. Нога, В.М. Шаталов // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – 2008. – №8. – С.290–292.
7. Зинченко А.А. Влияние растворенного в крови воздуха на динамику свертывания *in vitro* / А.А. Зинченко, В.М. Шаталов // Физика живого. – 2010. – Т.18, №1. – С. 37–43.
8. Кластерная структура стабильных нанопузырей растворенного газа в глубоко очищенной воде / Н.Ф. Бункин, Н.В. Суязов, А.В. Шкирин [и др.] // ЖЭТФ. – 2009. – Т.135, вып. 5. – С.917–937.
9. Long-living nanobubbles of dissolved gas in aqueous solutions of salts and erythrocyte suspensions / N.F. Bunkin, B.W. Ninham, P.S. Ignatiev [et al.] // J. Biophotonics. – 2010. – Vol. 93. – P.1–15.
10. Капустина О.А. Дегазация жидкостей / О.А. Капустина // Физика и техника мощного ультразвука, том 3. Физические основы ультразвуковой технологии [Под ред. Л.Д.Розенберга]. – М.: Наука, 1970. – 689 с.
11. Логинов В.В. Влияние электромагнитного излучения КВЧ на эритроциты человека (*in vitro*) / В.В. Логинов, В.Ф. Русаев, Е.Н. Туманянц // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 1999. – № 1(13). – С.1721–1725.
12. Физиологические механизмы биологических эффектов низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ / [Чуян Е.Н., Темуриянц Н.А., Московчук О.Б. и др.] – Симферополь: ЧП «Эльиньо», 2003. – 448 с.
13. Низкоинтенсивное ЭМИ КВЧ диапазона ускоряет СОЭ и изменяет агрегацию эритроцитов человека / С.Ю. Рыбалко, А.И. Кацев, Ю.А. Бисюк [и др.] // Таврический медикобиологический вестник. – 2002. – Т. 5, № 4. – С. 124–127.

14. Гемореология и электромагнитное излучение КВЧ диапазона / [Киричук В.Ф., Малинова Л.И., Креницкий А.П. и др.] – Саратов: Изд-во Саратовского мед. ун-та, 2003. – 188 с.
15. Шаталов В.М. Дегазация биожидкостей как механизм биологического действия слабых электромагнитных полей / В.М. Шаталов // Біофізичний вісник. – 2009. – Вип. 23 (2). – С. 92–99.

**Зинченко А.О. Дегазация плазмы крови змінює швидкість осідання еритроцитів / А.О. Зинченко, В.М. Шаталов // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62), № 4. – С. 95-102.**

Отримано нормувальні графіки зміни парціального тиску розчинених у плазмі крові газів O<sub>2</sub> і CO<sub>2</sub> в залежності від тривалості центрифугування зразків. Показано, що центрифугування крові, призводить до немонотонному зміни швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ), спочатку до зниження, а потім до зростання ШОЕ в кілька разів. Наводяться докази того, що цей ефект пов'язаний з дегазацією плазми крові. Обговорюється модель, згідно з якою зміна ШОЕ пов'язано з адсорбцією мікробульбашок повітря на мембрані еритроцитів.

**Ключові слова:** дегазація, центрифуга, мікробульбашок, адсорбція, еритроцити, кров, плазма.

**Zinchenko A.A. Degassing of blood plasma alter erythrocyte sedimentation rate / A.A. Zinchenko, V.M. Shatalov // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – Vol. 23 (62), No 4. – P. 95-102.**

Obtained by normalizing the variation of the partial pressure of dissolved gases in the blood plasma of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>, depending on the duration of centrifugation of the samples. Shown that centrifugation of blood leads to a nonmonotonic change in erythrocyte sedimentation rate (ESR), initially to reduce and then to an increase in sedimentation rate a few times. Provides evidence that this effect is associated with degassing of blood plasma. A model according to which the change in ESR due to the adsorption of micro-bubbles of air on the membrane of red blood cells.

**Keywords:** decontamination, centrifuge, microbubbles, adsorption, red blood cells, blood, plasma.

*Поступила в редакцію 13.12.2010 г.*