



дарность группе разработчиков: В. В. Лычагову, Э. А. Гениной, А. Н. Башкатову и В. И. Кочубею.

Исследование проведено при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 09-02-01048-а, 224014), Седьмой рамочной программы Комиссии Европейского Союза в области технических и естественных наук (грант № 224014 PHOTONICS4LIFE of FP7-ICT-2007-2), Министерства образования и науки РФ (проекты № 1.4.09; 2.1.1/4989; 2.2.1.1/2950 и госконтракты № 02.740.11.0484; 02.740.11.0770; 02.740.11.0879).

Список литературы

1. *Hern S., Mortimer P. S.* Visualization of dermal blood vessels – capillaroscopy // *Clin. Exp. Dermatol.* 1999. Vol. 24. P. 473–478.
2. *Виленский М. А., Агафонов Д. Н., Зимняков Д. А., Тучин В. В., Здражевский Р. А.* Спекл-корреляционный анализ микрокапиллярного кровотока ногтевого ложа // *Квант. электроника.* 2011. Т. 41, № 4. С. 324–328.
3. *Bukhari M., Herrick A. L., Moore T., Manning J., Jayson M. I. V.* Increased nailfold capillary dimensions in primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis // *Br. J. Rheum.* 1996. Vol. 35. P. 1127–1131.
4. *Briers J. D., Webster S.* Laser speckle contrast analysis (LASCA) : a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow // *J. Biomed. Opt.* 1996. Vol. 1. P. 174–179.
5. *Luo Q., Qiu J., Li P.* Blood flow cytometry and cell aggregation study with laser speckle // *Advanced optical flow cytometry : methods and disease diagnoses* / ed. V. V. Tuchin. Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. 734 p.
6. *Briers J.D.* Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging // *Physiol. Meas.* 2001. Vol. 22. P. R35–R66.
7. *Boas D.A., Dunn A.K.* Laser speckle contrast imaging in biomedical optics // *J. Biomed. Opt.* 2010. Vol. 15(1). P. 011109.
8. *Duncan D.D., Kirkpatrick S.J.* Can laser speckle flowmetry be made a quantitative tool? // *J. Opt. Soc. Amer. A : Opt. Image Sci. Vis.* 2008. Vol. 25(8). P. 2088–2094.
9. *Tuchin V. V.* Optical Clearing of Tissues and Blood. Bellingham : SPIE Press, 2006. 254 p.
10. *Zhu D., Wang J., Zhi Z., Wen X., Luo Q.* Imaging dermal blood flow through the intact rat skin with an optical clearing method // *J. Biomed. Opt.* 2010. Vol. 15. P. 026008.

УДК 535.417: 616.379-008.64

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА «ЭРИТРОЦИТ – ПЛАЗМА» НАТИВНОГО МАЗКА КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПОЛНОПОЛЬНОЙ МИКРОИНТЕРФЕРОМЕТРИИ В БЕЛОМ СВЕТЕ



А. Л. Кальянов, Л. И. Малинова*, Е. В. Боголюбова,
И. В. Смирнов, В. В. Лычагов, В. П. Рябухо

Саратовский государственный университет
E-mail: kalyanoval@yandex.ru

*ФГУ «Саратовский научно-исследовательский институт кардиологии»
Министерства здравоохранения и социального развития РФ
E-mail: sarniik@yandex.ru

В работе представлены результаты исследования морфофункциональных свойств эритроцитов пациентов с ишемической болезнью сердца в нативном мазке крови методом полнополевой микроинтерферометрии в белом свете. Получены трехмерные изображения и профили поверхности комплекса «отдельно расположенный эритроцит – окружающая плазма крови». Сопоставлена динамика угла наклона плазмы крови вблизи отдельно расположенного эритроцита во времени в процессе внутривенной стандартизированной нагрузки глюкозой у больных ишемической болезнью сердца и ишемической болезнью сердца, ассоциированной с сахарным диабетом.

Ключевые слова: низкокогерентная интерферометрия, полнополевая интерферометрия, интерференционная микроскопия, морфофункциональные свойства эритроцитов, перфузия, ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет.

Investigation of «Erythrocyte – Plasma» Complex in Native Human Blood Slide Using White-Light Full-Field Microinterferometry

А. Л. Кальянов, Л. И. Малинова, Е. В. Боголюбова,
И. В. Смирнов, В. В. Лычагов, В. П. Рябухо

Morphofunctional properties of erythrocytes in native blood slide of coronary heart disease patients are investigated using white light full-field microinterferometry. Three dimensional images and surface profiles of complex «single RBC – surrounding blood plasma» are shown. Dynamic of slope angle of the plasma near the RBC during standardized intravenous glucose load is explored. The dynamic of patients with coronary heart disease is compared with one of patients with coronary heart disease and diabetes mellitus.



Key words: low-coherence interferometry, full-field interferometry, interference microscopy, morphofunctional properties of erythrocyte, perfusion, coronary heart disease, diabetes mellitus.

Введение

Расшифровка патогенетических механизмов нарушения коронарного кровообращения к настоящему времени остается нерешенной мультидисциплинарной проблемой, одним из аспектов которой является модификация миокардиальной перфузии в условиях нарушений углеводного обмена. Влияние повышения уровня глюкозы в крови на увеличение риска развития ИБС обнаружено во многих проспективных исследованиях. В работах [1,2] было показано, что у лиц с высоким уровнем тощаковой и посленагрузочной глюкозы отмечается достоверно более высокая смертность от сердечно-сосудистых заболеваний. Еще с середины 80-х гг. в работе [3] было отмечено увеличение смертности от ИБС при увеличении выраженности нарушений углеводного обмена. К настоящему времени нарушения толерантности к глюкозе рассматриваются как самостоятельный фактор риска сердечно-сосудистой патологии [4], а сахарный диабет — как сердечно-сосудистое заболевание.

Хроническая гипергликемия, вызывая увеличение концентрации конечных гликозилированных продуктов обмена, приводит к накоплению их в плазме и сосудистой стенке (доказано на модели гипергликемии у больных сахарным диабетом 2-го типа [5,6]). Гликозиляты увеличивают аттрактивность человеческих лимфоцитов Т-типа к эндотелиальным клеткам [7], тем самым способствуя повышению содержания Т-лимфоцитов в атеросклеротической бляшке. Таким образом, гипергликемия провоцирует возникновение первичных очагов атероматозного поражения сосудистой стенки и создает условия для формирования специфического клеточного компонента атером.

Поддержание стабильного коронарного кровотока является результирующей многих компонент. В настоящей работе мы остановились на влиянии морфофункционального состояния эритроцитов.

К настоящему времени показано изменение морфофункционального состояния эритроцитов у больных с хронической гипергликемией, которое выражается в комплексе нарушений, связанных с повышенным гликированием белков крови и гемоглобина, а также с патохимическими особенностями мембран эритроцитов (состояние катионтранспортных систем, структурно-функциональная перестройка мембраны, изменение интенсивности мембранстабилизирующих процессов) [8]. Кроме

того, метаболические процессы, индуцируемые глюкозой, проявляются активизацией процессов перекисного окисления липидов мембран эритроцитов, вызывающих их дестабилизацию и изменение чувствительности красных кровяных клеток к различным раздражителям [9].

При сахарном диабете 2-го типа изменяется форма эритроцитов. Уже на этапе скрытых нарушений углеводного обмена отмечается увеличение доли макроцитов [9]. При исследовании морфологических особенностей у больных с диабетическими ангиопатиями выявлен полиморфизм их размеров, сферичность формы, клетки-«тени», значительное количество деформированных и гемолизированных эритроцитов [10].

Известно достаточно большое количество методик, позволяющих оценить морфофункциональные свойства эритроцитов: оптическая микроскопия, проточная цитометрия, нефелометрия, разнообразные методы изучения седиментации эритроцитов в различных средах, моделирование кровотока, как *in vitro*, так и в моделях на животных, вискозиметрия цельной крови и ее компонентов и т. д.

«Поведение» эритроцитов в потоке определяется в том числе и способностью белков цитоскелета образовывать нековалентные связи с макромолекулами плазмы. Оценка выраженности такой «сорбционной» способности эритроцитов при помощи вышеперечисленных методов либо косвенна, либо невозможна, что и обусловило выполнение настоящего исследования. Представлены результаты использования метода сканирующей полнопольной интерференционной микроскопии [11–14] для получения изображений эритроцитов в нативном мазке и визуализации их формы с оценкой приклеточного слоя плазмы.

Сканирующий полнопольный микроинтерферометр

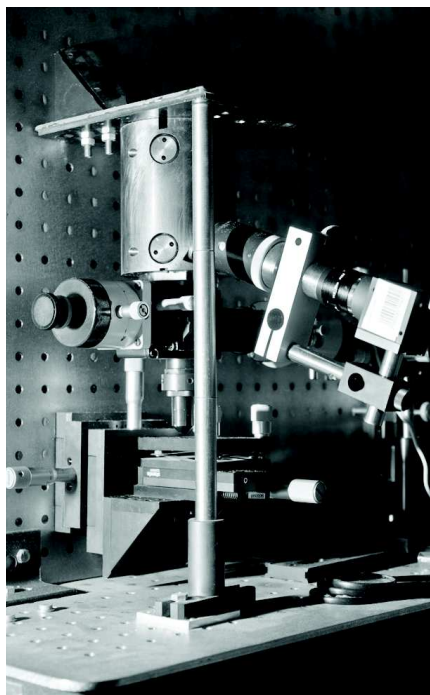
Традиционная оптическая схема интерференционного микроскопа подразумевает наблюдение и регистрацию двумерных микроскопических изображений поверхности объекта с интерференционными полосами, характер искривления которых несет информацию о рельефе поверхности исследуемого объекта. В данной работе использовался модифицированный вариант интерференционного микроскопа, позволяющего осуществлять автоматическое изменение (сканирование) оптической разности хода в интерферометре путем перемещения объекта и параллельную запись микроинтерференционных изображений при каждом новом положении объекта относительно интер-



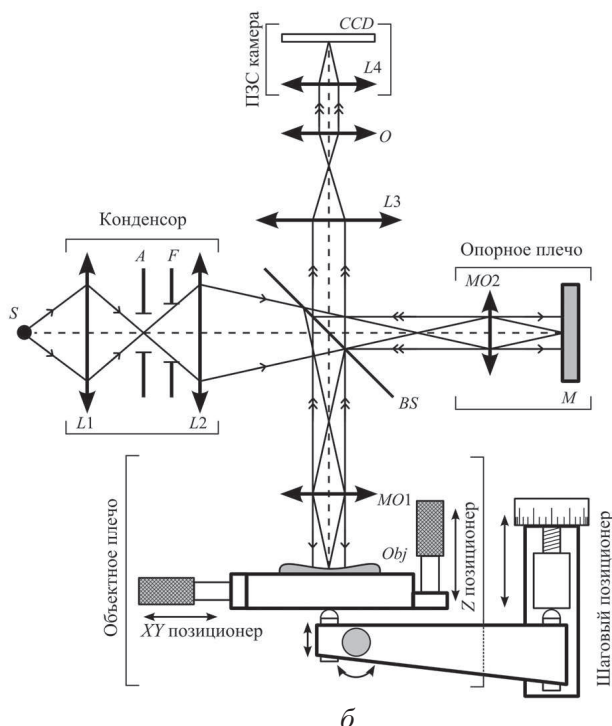
ферометра и, следовательно, при каждом новом значении оптической разности хода [11,12]. Такой подход, известный в низкокогерентной интерферометрии, оптической когерентной томографии и конфокальной микроскопии, в данном случае позволяет восстанавливать форму поверхности объекта и его объемную внутреннюю структуру посредством формирования набора двумерных интерферограмм-сечений структуры объекта плоскостями, перпендикулярными к поверхности

объекта. Такие интерферограммы также могут рассматриваться как микроинтерференционные изображения объекта.

Разработанная система сканирующей полнопольной интерференционной микроскопии (рис. 1, а) позволяет проводить исследования биологических объектов на клеточном уровне и визуализировать отдельные клетки. В ее основу положена схема микроинтерферометра Линника, изображенная на рис. 1, б. Для получения необ-



а



б

Рис. 1. Система сканирующей полнопольной интерференционной микроскопии: а – внешний вид, б – оптико-механическая схема: S – протяженный источник света, $L1, L2, L3$ – линзы, A, F – диафрагмы, $MO1, MO2$ – микрообъективы, BS – светоделитель, Obj – объект, M – зеркало, O – окуляр, $L4$ – объектив цифровой камеры, CCD – ПЗС матрица

ходимого продольного и поперечного разрешения системы использован тепловой источник света и монохромная ПЗС-матрица без ИК-фильтра для регистрации изображения. Это позволило получить интерференционный импульс, ширина которого не превышает 1 мкм. Сканирование осуществлялось с помощью специально разработанного объектного столика, основанного на шаговом позиционере Standa 8MT173-25, обеспечивающего перемещение объекта с шагом 0.015 мкм в объектном плече интерферометра вдоль оптической оси системы.

Объектом исследований служили эритроциты в мазке крови на стеклянных подложках. Программный комплекс обработки и визуализации данных предоставляет возможность автоматического сканирования объекта и последующей обработки и визуализации полученных данных.

Для достижения высокой степени автоматизации, необходимой для исключения человеческого фактора при получении и анализе интерференционных изображений, в разработанном программном комплексе реализованы алгоритмы машинного зрения для автоматического поиска изображений эритроцитов на поверхности подложки в поле зрения камеры, отвечающих заданным требованиям, таким как расстояние до соседних эритроцитов, размер и форма. Результаты сканирования можно представить как набор сигналов, записанных различными элементами (пикселями) ПЗС-матрицы в плоскости изображения. Другими словами, получается набор одномерных зависимостей интенсивности оптического поля от положения объекта (в зависимости от разности хода) для различных точек в плоскости изображения в интерферометре.

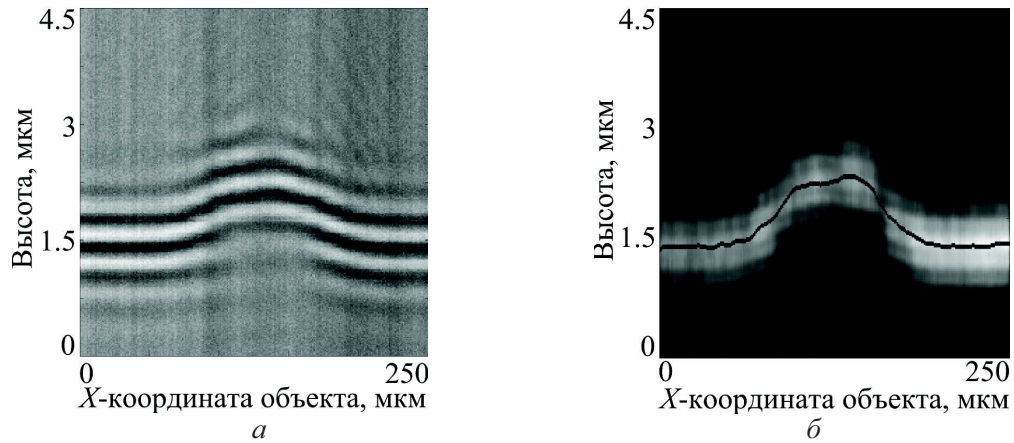


Рис. 2. В-скан эритроцита мазка крови на поверхности стекла: *a* – XZ-интерферограмма-изображение, *б* – выделенная огибающая интерференционного сигнала и программно восстановленный профиль сечения поверхности

На рис. 2, *a* представлен скан эритроцита на стеклянной подложке в плоскости XZ (В-скан), а на рис. 2, *б* – огибающая интерференционного импульса, выделен максимум огибающей, показывающий форму поверхности эритроцита в выбранном сечении.

На рис. 3 представлены трехмерные изображения эритроцита. Для получения таких изображений определялось положение центра огибающей интерференционного импульса в каждом А-скане, после чего по этим точкам строилась поверхность.

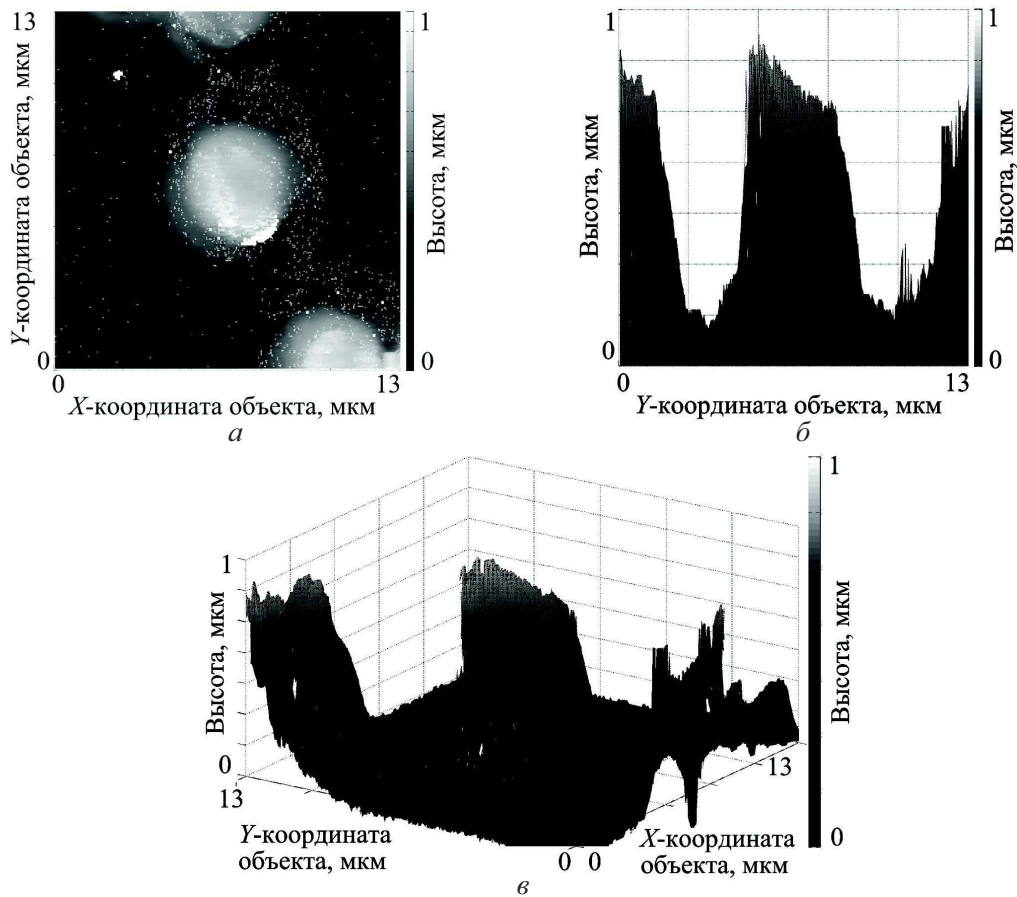


Рис. 3. Трехмерная поверхность эритроцита на стеклянной подложке, построенная с помощью разработанного программного комплекса по экспериментальным данным: *a* – XY-проекция, *б* – YZ-проекция, *в* – трехмерный график поверхности эритроцита



Таким образом в ходе выполнения работы были получены экспериментальные микроинтерференционные изображения эритроцитов в мазке нативной крови. Разработаны алгоритмы, позволяющие восстанавливать форму поверхности клетки из серии микроинтерференционных изображений. На основе полученных экспериментальных данных и с использованием этих алгоритмов восстановлена форма поверхности исследованных биологических клеток.

Влияние острой гипергликемии на морфофункциональные свойства эритроцитов пациентов с ишемической болезнью сердца

В исследование были включены пациенты с ишемической болезнью сердца (ИБС) (стенокардией напряжения II и III функционального класса по Канадской классификации), составившие основную группу. В группу сравнения вошли больные со стенокардией напряжения II и III функционального класса по Канадской классификации, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа. Наличие атеросклеротического поражения коро-

нарных артерий верифицировалось проведением прямой селективной ангиокардиографии. Исследование проводилось на добровольной основе с соблюдением всех требований Хельсинской декларации.

У больных после 12–14-ти часового голодания определялся уровень глюкозы капиллярной крови экспресс-методом при помощи портативного глюкометра «Smart Scan» с приготовлением нативного мазка крови, который и считался контрольным. Затем проводилось внутривенное болюсное введение 40%-ного раствора глюкозы в стандартной индивидуальной дозе – 0.5 мг сухого вещества/кг массы тела. Через 10, 30, 60 и 120 мин. от момента введения глюкозы у пациента также определялся уровень глюкозы крови и приготавливались мазки капиллярной крови, в которых проводилась оценка изменения толщины слоя плазмы при переходе ее от подложки к отдельно расположенному эритроциту.

На рис. 4 представлена динамика изменения тангенса угла наклона этой поверхности в процессе внутривенной нагрузки глюкозой. Ноль соответствует исходному (контрольному) состоянию.

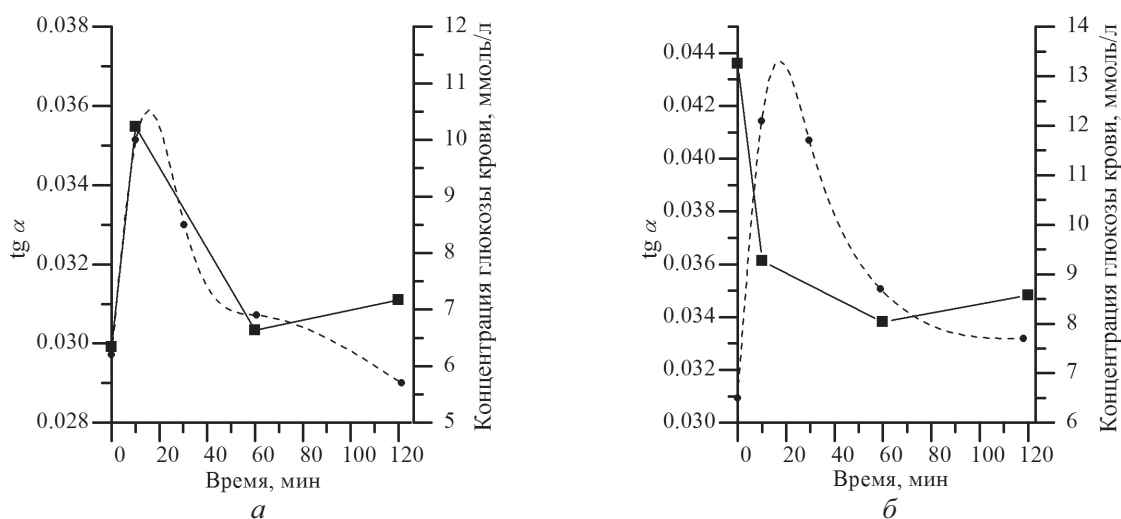


Рис. 4. Сопоставление динамики изменения тангенса угла наклона поверхности плазмы при переходе к отдельно расположенному эритроциту (квадраты) и динамики изменения концентрации глюкозы (пунктир) в процессе внутривенной нагрузки глюкозой: а – у больных основной группы (ИБС), б – у больных группы сравнения (ИБС + сахарный диабет 2-го типа). Левая шкала ординат – тангенс угла наклона

Как видно из представленных данных, пациенты основной группы и группы сравнения характеризуются качественными различиями динамики тангенса угла наклона поверхности плазмы в процессе внутривенной нагрузки глюкозой. Если для больных ИБС отмечается практически синхронное нарастание тангенса угла наклона поверхности плазмы к отдельно расположенному эритроциту и уровня гликемии,

то для больных группы сравнения эти параметры меняются в противофазе.

Изменение толщины приклеточного слоя нативной плазмы во многом определяется характером и прочностью нековалентных связей, образующихся между белками плазмы и цитоскелета эритроцита, что, в свою очередь, характеризует, с одной стороны, сорбционные, а с другой стороны – вязко-упругие свойства эритроцитарной мембраны.



Полученные данные не противоречат известным к настоящему времени изменениям агрегатно-суспензионного состояния крови при ИБС и сахарном диабете 2-го типа. Описано повышение агрегационной способности эритроцитов для обеих форм патологии, однако преимущественным агрегатом в первом случае является фибриноген, тогда как для пациентов с сахарным диабетом эту роль в основном принимают на себя молекулы α -глобулинов.

Выводы

В настоящем исследовании проведена оценка изменения функционального состояния мембраны эритроцитов в процессе внутривенной нагрузки глюкозой. Полученные результаты выявили диаметрально противоположную динамику изученных параметров, что может свидетельствовать о принципиальных различиях патогенетического механизма формирования перфузионных расстройств при ишемической болезни сердца и сахарном диабете 2-го типа, и нуждается в дальнейшем исследовании.

Разработана методика, позволяющая в автоматическом режиме проводить исследование образцов крови на покровных стеклах. Высокая степень автоматизации обеспечивает исключение человеческого фактора при обработке результатов, а возможность изучения образцов, стандартно используемых в медицинской практике, делает возможным интеграцию предложенной методики с обычно проводимыми медицинскими исследованиями.

Полученные результаты наглядно демонстрируют возможность применения полнопольной сканирующей микроинтерферометрии в белом свете для получения изображений эритроцитов в нативном мазке и визуализации их формы с оценкой приклеточного слоя плазмы в задачах диагностики патологических состояний сердечно-сосудистой системы.

Исследования проведены при финансовой поддержке Аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2011 годы)» и НТП ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (государственные контракты № 02.740.11.0879, 02.740.11.0770).

Список литературы

1. Fuller J. H., Shipley M. J., Rose G., Jarrett R. J., Keen H. Mortality from coronary heart disease and stroke in relation to degree of glycaemia : the Whitehall study // Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.). 1983. Vol. 287. P. 867–870.
2. Balkau B., Shipley M., Jarrett R.J., Pyorala K., Pyorala M., Forhan A., Eschwege E. High blood glucose concentration is a risk factor for mortality in middle-aged nondiabetic men. 20-year follow-up in the Whitehall Study, the Paris Prospective Study, and the Helsinki Policemen Study // Diabetes Care. 1998. Vol. 21. P. 360–367.
3. Butter W. J., Ostrander L. D., Carman W. J., Lamphier D. E. Mortality from coronary heart disease in the Tecumseh study. Long-term effect of diabetes mellitus, glucose tolerance and other risk factors // Amer. J. Epidemiol. 1985. Vol. 121. P. 541–547.
4. Haffner S. M., Mykkanen L., Festa A., Burke J. P., Stern M. P. Insulin-resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin-sensitive prediabetic subjects : implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic care // Circulation. 2000. Vol. 101. P. 975–980.
5. Brownlee M., Cerami A., Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications // N. Engl. J. Med. 1988. Vol. 318. P. 1315–1321.
6. Baynes J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes // Diabetes. 1991. Vol. 40. P. 405–412.
7. Schmidt A. M., Hori O., Cao R., Yan S. D. Brett J., Wautier J. L., Ogawa S., Kuwabara K., Matsumoto M., Stern D. RAGE : a novel cellular receptor for advanced glycation end products // Diabetes. 1996. Vol. 45. Suppl. 3. P. S77–80.
8. Бондарь Т. П., Козинец Г. И. Морфофункциональное состояние эритроцитов периферической крови при поздних сосудистых осложнениях сахарного диабета типа 2 (обзор литературы) // Клин. лаб. диагн. 2002. № 12. С. 22–34.
9. Кравец Е. Б., Колосова М. В., Новицкий В. В., Степанова Е. А. Белковый спектр и состояние липидного бислоя мембран эритроцитов у детей с инсулинзависимым сахарным диабетом (по данным электрофореза в полиакриламидном геле и флуоресцентного анализа) // Бюл. exper. биол. 2000. № 3. С. 306–309.
10. Ефимов А. С. Диабетические ангиопатии. М., 1989. 169 с.
11. Optical coherence tomography : technology and applications / eds. W. Drexler, J. G. Fujimoto. New York : Springer, 2008. 1330 p.
12. Лычагов В. В., Кальянов А. Л., Рябухо В. П. Низкокогерентная микроинтерферометрия внутренней структуры кристаллизовавшейся плазмы крови // Опт. и спектр. 2009. Т. 107, № 6. С. 909–916.
13. Dubois A., Vabre L., Voccaro A., Beaurepaire E. High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope // Appl. Opt. 2002. Vol. 41, №. 4. P. 805–812.
14. Вишняков Г. Н., Левин Г. Г., Минаев В. Л. Томографическая микроскопия трехмерных фазовых объектов в частично когерентном свете // Опт. и спектр. 2003. Т. 95, № 1. С. 142–146.