

УДК 577.3:537.63

Б. Э. КАШЕВСКИЙ¹, А. М. ЖОЛУДЬ¹, С. Б. КАШЕВСКИЙ¹, И. В. ГОРУДКО²,
Т. В. МОХОРТ³, О. Н. ШИШКО³

МАГНИТОФОРЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПО СТЕПЕНИ ОКСИГЕНАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА

(Представлено академиком О. Г. Пенязьковым)

¹Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси, Минск

²Белорусский государственный университет, Минск

³Белорусский государственный медицинский университет, Минск

Поступило 08.12.2014

Введение. Эритроциты, в силу их важной физиологической роли, доступности и относительной простоты состава и строения, являются наиболее изученным биологическим объектом, широко используемым в клинической диагностике. Научный интерес к ним, однако, не ослабевает. Актуальны исследования механизма кооперативного связывания кислорода молекулой гемоглобина [1], транспортных процессов в концентрированном растворе инкапсулированного гемоглобина [2], механического поведения эластичных клеток в сложных гидродинамических условиях [3], процессов транспорта кислорода эритроцитами к различным органам [4], изменения транспортных функций эритроцитов в процессе их старения и при патологиях [5]. Углубление исследований связано с применением новых экспериментальных методов, таких как биолюминесценция, высокоскоростная оптическая визуализация, нейтронное рассеяние, лазерная кинетическая спектроскопия, атомная силовая спектроскопия и др. Здесь мы отметим методы, основанные на зависимости магнитной восприимчивости гемоглобина от степени его оксигенации. Прежде всего, это функциональная магнитно-резонансная томография [6], позволяющая визуализировать области с различной интенсивностью поглощения кислорода на основе изменения контраста изображения, обусловленного искажением постоянного магнитного поля томографа на неоднородностях магнитной восприимчивости крови. Кроме того, исследуются возможности использования магнитофореза эритроцитов (движение клеток в жидкой среде под действием высокоградиентного магнитного поля) в задачах диагностики (концентрирование эритроцитов, пораженных малярией [7], регистрация изменений в процессе хранения эритроцитарной массы [8]) и прямой магнитной сепарации эритроцитов из цельной крови, в частности, в микрожидкостных аналитических системах [9; 10]. В настоящей работе представлен магнитофоретический метод исследования эритроцитов *in vitro*, позволяющий в достаточно больших клеточных популяциях ($N \sim 1000$) одновременно находить распределения клеток по скорости седиментации и магнитной восприимчивости и степени оксигенации инкапсулированного гемоглобина.

Материалы и методы исследования. Материальную базу предлагаемого метода составляет экспериментальный комплекс [11] для определения магнитной восприимчивости клеток (магнитоцитометр), который обеспечивает цифровую видеорегистрацию и автоматизированную обработку протяженных двумерных траекторий движения клеток в плоском канале микрожидкостной системы при воздействии скрещенных полей силы тяжести и магнитной силы, создаваемой установленным на боковой стенке канала тонким цилиндрическим ферромагнитным стержнем. Схемы магнито-оптико-механической и микрожидкостной систем комплекса представлены на рис. 1. Программное обеспечение комплекса позволяет определять для каждой клетки скорость седиментации и относительную удельную магнитную восприимчивость κ , связанную с магнитными восприимчивостями χ , χ_0 и плотностями ρ , ρ_0 клетки и несущей жидкости соотношением

$$\kappa = \frac{\chi - \chi_0}{\rho - \rho_0}. \quad (1)$$

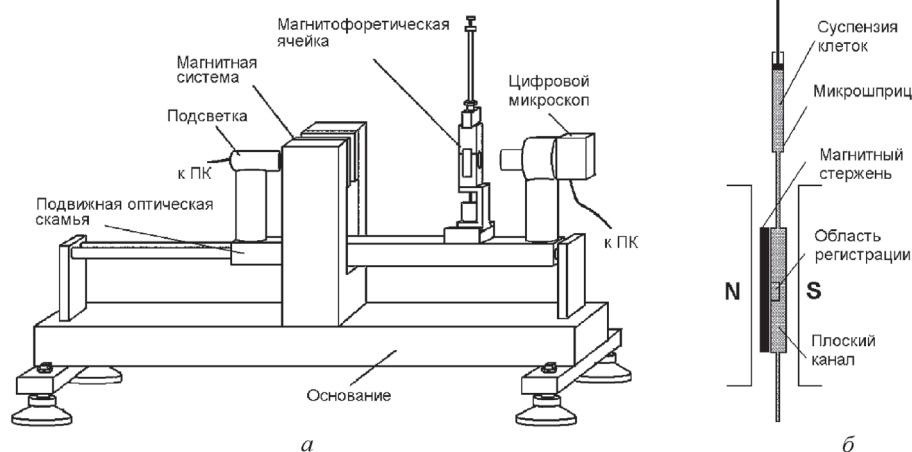


Рис. 1. Схемы магнито-оптико-механической (а) и микрожидкостной (б) систем магнитоцитометра

Полагая, что плотность и магнитная восприимчивость цитоплазмы эритроцита незначительно отличается от плотности и магнитной восприимчивости несущего физиологического раствора, их можно выразить через плотность ρ_{Hb} , объемную концентрацию c , и среднюю магнитную восприимчивость $\bar{\chi}_{\text{Hb}}$ инкапсулированного в эритроците гемоглобина соотношениями

$$\chi = (1 - c)\chi_0 + c\bar{\chi}_{\text{Hb}}, \quad \rho = (1 - c)\rho_0 + c\rho_{\text{Hb}},$$

которые приводят (1) к виду

$$\kappa = \frac{\bar{\chi}_{\text{Hb}} - \chi_0}{\rho_{\text{Hb}} - \rho_0}. \quad (2)$$

Преимущество соотношения (2) перед соотношением (1) состоит в том, что характеристики гемоглобина в (2), плотность и магнитная восприимчивость, подвержены гораздо меньшей дисперсии, чем аналогичные характеристики эритроцитов в (1), зависящие от варибельной концентрации в них гемоглобина. Это позволяет использовать найденные из эксперимента значения относительной удельной магнитной восприимчивости эритроцита для определения средней магнитной восприимчивости инкапсулированного в нем гемоглобина:

$$\bar{\chi}_{\text{Hb}} = \chi_0 + \kappa(\rho_{\text{Hb}} - \rho_0). \quad (3)$$

Как известно [12], магнитная восприимчивость молекулы гемоглобина резко уменьшается при присоединении молекулярного кислорода: ионы железа простатических групп (гемов) гемоглобина как такового находятся в высокоспиновом состоянии (четыре неспаренных электрона с параллельными спинами на гем), исчезающем при оксигенации. Введем обозначения $\chi_{\text{deoxy Hb}}$ и $\chi_{\text{oxy Hb}}$ для магнитных восприимчивостей полностью восстановленного (деоксигенированного) и полностью оксигенированного (присоединившего четыре молекулы кислорода на молекулу гемоглобина) эритроцита, а также обозначение S ($0 \leq S \leq 1$) для степени его оксигенации (отношение количества присоединенных молекул кислорода к полному количеству гемов). Средняя магнитная восприимчивость гемоглобина в эритроците связана со степенью его оксигенации линейным законом

$$\bar{\chi}_{\text{Hb}} = \chi_{\text{deoxy Hb}} - S\Delta\chi, \quad (4)$$

где $\Delta\chi_{\text{Hb}} = \chi_{\text{deoxy Hb}} - \chi_{\text{oxy Hb}}$.

Подстановка (4) в (3) дает прямую зависимость степени оксигенации гемоглобина эритроцита от измеренной величины относительной удельной магнитной восприимчивости κ :

$$S = \frac{1}{\Delta\chi_{\text{Hb}}} [\chi_{\text{deoxy Hb}} - \chi_0 - \kappa(\rho_{\text{Hb}} - \rho_0)]. \quad (5)$$

Для практического применения соотношения (5) необходимо определить характеристики гемоглобина эритроцитов и физраствора, в котором содержатся клетки. Величина $\Delta\chi_{\text{Hb}}$ есть пара-

магнитный вклад ионов железа в магнитную восприимчивость деоксигемоглобина, который можно рассчитать по формуле Ланжевена

$$\Delta\chi_{\text{Hb}} = \frac{4N\mu^2}{3k_{\text{B}}T} \frac{1}{v_{M,\text{Hb}}} = 0,996 \cdot 10^{-6}.$$

Здесь $\mu = 5,46$ магнетонов Бора [12] – магнитный момент иона Fe^{2+} в гемоглобине; N – число Авогадро; k_{B} – постоянная Больцмана; T – температура; $v_{M,\text{Hb}} = 48,277 \text{ см}^3/\text{моль}$ [13] – молярный объем гемоглобина. Для величины $\chi_{\text{oxy Hb}}$, с учетом данных для удельной магнитной восприимчивости оксигенированного гемоглобина $\chi'_{\text{oxy Hb}} = -0,587 \cdot 10^{-6} \text{ см}^3/\text{г}$ [14] и его плотности $\rho_{\text{Hb}} = 1,335 \text{ г}/\text{см}^3$ [13], имеем значение $\chi_{\text{oxy Hb}} = \chi'_{\text{oxy Hb}} \rho_{\text{Hb}} = -0,784 \cdot 10^{-6}$. Следовательно, $\chi_{\text{deoxy Hb}} = \chi_{\text{oxy Hb}} + \Delta\chi_{\text{Hb}} = 0,212 \cdot 10^{-6}$. Для χ_0 примем значение магнитной восприимчивости воды $\chi_0 = -0,719 \cdot 10^{-6}$, а плотность раствора (см. ниже) $\rho_0 = 1,005 \text{ г}/\text{см}^3$ измерена пикнометром.

Для анализа распределения эритроцитов по степени оксигенации гемоглобина использовали образец цельной крови, приготовленный стандартным методом в Белорусском государственном медицинском университете на базе 1-й городской клинической больницы Минска. Кровь разбавляли стандартным (аптечным) солевым раствором с добавкой альбумина, pH 7,4 (состав, использованный ранее для магнитофоретического исследования эритроцитов в [15]) до концентрации $1,5 \cdot 10^6$ клеток/мл. Одна часть суспензии эритроцитов подвергалась оксигенации, другая – деоксигенации путем продувки соответственно кислорода или азота в течение 40 мин над объемом суспензии (2 мл) в закрытом резиновой пробкой стеклянном 10-миллилитровом пенициллиновом флаконе. Газ подавали и выводили через вставленные в пробку медицинские иглы, сосуд в процессе продувки покачивали. Для исследования степени оксигенации гемоглобина эритроцитов образец суспензии отбирали в микрошприц магнитоцитометра (рис. 1, б) через пробку при продолжающейся продувке. Исследования проводили при комнатной температуре $20 \text{ }^\circ\text{C}$ и атмосферном давлении 756 мм рт. ст. На рис. 2 представлены примеры используемых для определения оксигенации гемоглобина отдельных эритроцитов траекторий магнитофореза клеток в оксигенированной и деоксигенированной суспензиях.

Результаты и их обсуждение. На рис. 3, а, б полученные результаты представлены в форме гистограмм распределения эритроцитов по степени оксигенации гемоглобина. Рис. 4, а, б отражает зависимость между степенью оксигенации гемоглобина эритроцитов и скоростью их гравитационной седиментации. Данные, представленные на рис. 3, в и рис. 4, в, получены путем обработки траекторий эритроцитов, свободно седиментирующих вне магнитного поля. Они позволяют определить методическую ошибку измерений, связанную с гидродинамическим взаи-

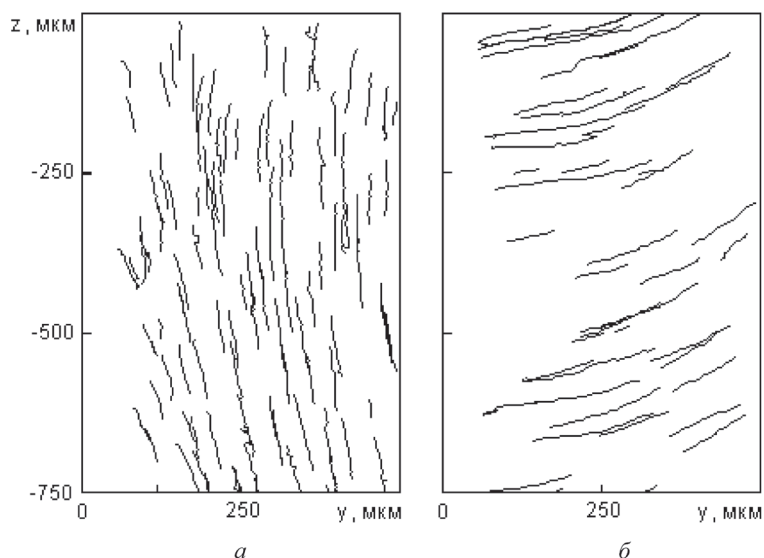


Рис. 2. Траектории движения эритроцитов в оксигенированной (а) и деоксигенированной (б) суспензиях: y – расстояние от магнитного стержня, z – вертикальная координата

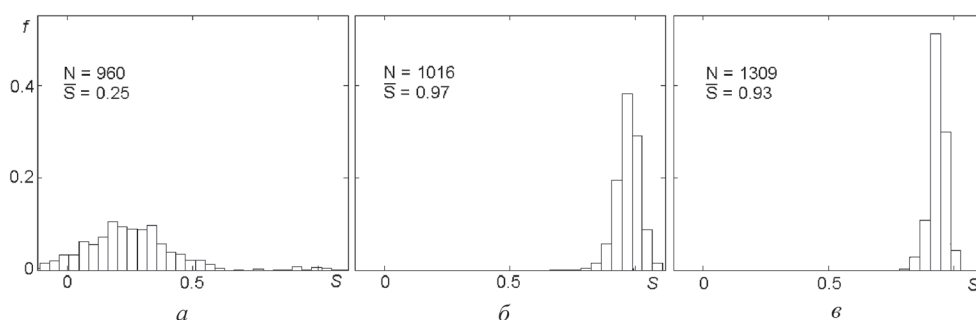


Рис. 3. Гистограмма распределения эритроцитов по степени оксигенации S гемоглобина в деоксигенированной (a) и оксигенированной (b) суспензиях, а также в суспензии свободно седиментирующих вне магнитного поля эритроцитов ($в$)

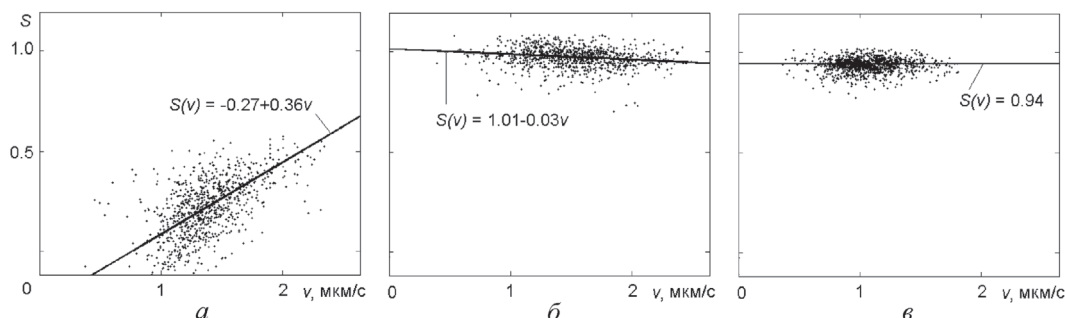


Рис. 4. Портрет деоксигенированной (a), оксигенированной (b) и свободно седиментирующей вне поля ($в$) суспензий эритроцитов на плоскости «скорость оседания эритроцита, v » – «степень оксигенации гемоглобина, S ». Сплошные кривые – результат линейной медиан-медианной регрессии массивов точек (v, S)

модействием и несферической (анизодиаметричной) формой движущихся в жидкости клеток [11], результатом чего является отклонение траекторий от направления действующей силы, что воспринимается программой обработки как некая дополнительная магнитная восприимчивость. Так, для оседающих вне поля вертикально вниз клеток $k = 0$ и, согласно (5), $S = 0,933$. На практике регистрируется (рис. 3, $в$, рис. 4, $в$) разброс значений S вокруг среднего $\bar{S} = 0,939$, весьма близкого к теоретическому значению 0,933.

Прежде всего, следует сказать, что продувка азотом не привела к полной деоксигенации эритроцитов. Средняя измеренная степень оксигенации составила значение $\bar{S} = 0,25$ (рис. 3, a). Согласно данным по равновесной оксигенации гемоглобина эритроцитов крови человека при различных рН и температурах [16], этому значению \bar{S} в наших условиях соответствует парциальное давление кислорода в несущей жидкости $P_{O_2} = 7$ мм рт. ст. По отношению к $P_{O_2} = 159$ мм рт. ст. в равновесии с атмосферным воздухом это составляет 4,4 %. Таким образом, 4,4 % от исходного содержания кислорода осталось после продувки азотом в жидкости. После продувки кислородом средняя оксигенация гемоглобина выросла до 97 % (рис. 3, b), а разброс эритроцитов по степени оксигенации гемоглобина резко уменьшился, приблизившись к приборному разбросу (рис. 3, b , $в$). Из этого следует, что возможность исследовать распределение оксигенации в эритроцитах в условиях насыщения жидкости кислородом весьма ограничена. Вместе с тем результаты, полученные при малом парциальном давлении кислорода в несущей жидкости, представляют большой интерес, хотя и в этом случае приборный разброс данных имеет место, проявляясь в регистрации небольшого количества эритроцитов с нефизической отрицательной степенью оксигенации (рис. 3, a , рис. 4, a). Они показывают, что в условиях дефицита кислорода существуют фракции эритроцитов с заметно пониженным или повышенным содержанием кислорода. Нам представляется, что зарегистрированный в условиях дефицита кислорода разброс эритроцитов по степени оксигенации гемоглобина может быть связан с физиологическими различиями молодых, зрелых и старых эритроцитов. На пониженное содержание кислорода в старых эритроцитах указывает корреляция между степенью оксигенации гемоглобина эритроцитов и скоростью их седиментации (рис. 3, a): чем выше степень оксигенации, тем выше скорость седимента-

ции. С гидродинамической точки зрения причинами изменения скорости седиментации эритроцитов являются изменения их объема, плотности и формы, которые сопровождают естественный процесс их старения или различные формы анемии. Известно, в частности, что с возрастом эритроцита (продолжительность его жизненного цикла в норме около 120 дней) его объем уменьшается до 2 раз [5], что должно приводить к уменьшению скорости седиментации. Исследованию изменений в стареющих эритроцитах посвящена обширная литература, однако данные, свидетельствующие о снижении их основной транспортной функции, получены нами, видимо, впервые.

Заключение. Разработан метод одновременного измерения распределения эритроцитов по магнитной восприимчивости и степени оксигенации их гемоглобина, а также по скорости седиментации клеток в жидкости, основанный на видеорегистрации и автоматизированной обработке траекторий движения клеток в плоском микрожидкостном канале при воздействии гравитационного и высокоградиентного магнитных полей. Исследование суспензии эритроцитов с низким парциальным давлением кислорода впервые выявило существование фракций эритроцитов с заметно пониженным и повышенным содержанием кислорода в условиях его дефицита, что может быть связано с ослаблением основной транспортной функции стареющих эритроцитов. Предложенный метод создает дополнительные возможности исследования естественных и патологических процессов в эритроцитах, имеет перспективы в медицинской диагностике заболеваний, сопровождающихся нарушениями функции эритроцитов. Нашей ближайшей целью является изучение информативности данного метода для клинической диагностики и мониторинга компенсации сахарного диабета в качестве альтернативы или дополнения к используемым ныне трудоемким и подверженным влиянию многих факторов методикам [17], основанным на определении гликированного гемоглобина, служащего маркером хронической гипергликемии, сопровождающейся нарушением сродства гемоглобина эритроцитов к кислороду.

Литература

1. Shibayama N., Sugiyama K., Park S.-Y. // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 38. P. 33661–33668.
2. Doster W., Longeville S. // Biophys. J. 2007. Vol. 93. P. 1360–1365; Stadler A. M. et al. // J. Royal. Soc. Interface. 2011. Vol. 8. P. 590–595.
3. Forsyth A. M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. Vol. 108. P. 10986–10990.
4. Tsai A. G., Cabrales P., Intaglietta M. // Antioxid. Redox Signalling. 2010. Vol. 12. P. 683–691.
5. Higgins J. M., Mahadevan L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. P. 20587–20592.
6. Уэстбрук К., Потб К. К., Тэлбот Д. Магнитно-резонансная томография: практ. рук-во. М., 2012.
7. Bhakdi S. C. et al. // Malaria J. 2010. Vol. 9. P. 38–42.
8. Jin X. et al. // Analyst. 2011. Vol. 136. P. 2996–3003.
9. Jung Y., Choi Y., Han K., Frazier A. B. // Biomed. Microdevices. 2010. Vol. 12. P. 637–645.
10. Shen F. et al. // Anal. Chem. 2012. Vol. 84. P. 3075–3081.
11. Kashevsky B. E., Zholid A. M., Kashevsky S. B. // Rev. Sci. Instrum. 2012. Vol. 83. Atr. N 075104 (11 p.).
12. Pauling L., Coryell C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1936. Vol. 22. P. 210–216.
13. Dickerson R., Gies I. Hemoglobin: structure, function, evolution and pathology. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings Publishing, 1983.
14. Cerdonio M. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. Vol. 82. P. 102–103.
15. Zborowski M. et al. // Biophys. J. 2003. Vol. 84. P. 2638–2645.
16. Severinghaus J. W. // J. Appl. Physiology. 1958. Vol. 12. P. 485–486.
17. Aldasouqi S. A., Gossain V. V. // Ann. Saudi. Med. 2008. Vol. 28, N 6. P. 411–419.

B. E. KASHEVSKY, A. M. ZHOLID, S. B. KASHEVSKY, I. V. GORUDKO, T. V. MOKHORT, O. N. SHISHKO

bekas@itmo.by

MAGNETOPHORETIC METHOD FOR STUDYING RED BLOOD CELLS BY HEMOGLOBIN OXYGENATION DISTRIBUTION

Summary

The method is developed for a simultaneous differentiation of red blood cells in terms of magnetic susceptibility, hemoglobin oxygenation, and sedimentation velocity based upon video recording and automated handling of cell motion trajectories in a thin microfluidic channel under the action of crossed gravitational and high-gradient magnetic fields. The study of suspension of red blood cells with a low oxygen partial pressure, for the first time, revealed the existence of cell fractions with considerably reduced and increased hemoglobin oxygenation, which is presumably related with a weakened oxygen transport function of old red blood cells. Our method creates additional possibilities of studying native and pathogenic processes in red blood cells, and can be useful for medical diagnostics.