

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ФИЗИКА И БИОФИЗИКА

Светослав Методиев Йовчев

**МОДЕЛНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ
АГРЕГАЦИОННОТО ПОВЕДЕНИЕ НА
ЕРИТРОЦИТИ**

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
за придобиване на образователна и научна степен
"Доктор"**

научна специалност „Биофизика”; шифър: 01.06.08

**Ръководител: чл. кор. проф. д-р Стоил Стоилов
Институт по физикохимия на БАН**



СОФИЯ

2011

Използвани съкращения

	English	Български
AI	aggregation index	агрегационен индекс
Dx	dextran	декстран
GA	glutaraldehyde	глутаров алдехид
HCT	hematocrit	хематокрит
mPEG-SPA	methoxypolyethylene glycol succinimidyl propionate	Метоксиполиетилен гликол суксинимидил пропионат
mPEG-SPA 2K	2000 Dalton	
mPEG-SPA 5K	5000 Dalton	
mPEG-SPA 20K	20000 Dalton	
Neu, NANA-ase	neuraminidase	невраминидаза
PBS	phosphate buffered saline	фосфатно буферизиран разтвор на натриев хлорид
PEG	polyethylene glycol	Полиетилен гликол
RBC	red blood cells	Еритроцити, червени кръвни клетки
RCF, G, g	relative centrifugal force	Относителна сила на центрофугиране
ZCT	zetacrit	Дзетакрит
ZSR	zeta sedimentation ratio	Дзета седиментационно отношение

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения

Съдържание

Глава 1. Въведение	6
Глава 2. Литературен обзор	7
I Реология на кръвта и сърдечно съдови заболявания (ССЗ)	7
II Агрегация на еритроцити	9
1. Външни фактори	11
<i>А Условия на течение</i>	11
<i>Б Плазмени фактори</i>	11
<i>В Йонна сила на средата</i>	11
<i>Г Киселинност на средата (pH)</i>	12
2. Агрегируемост на еритроцитите	12
<i>А Гликокаликсът на човешките еритроцити</i>	12
а повърхностен електричен заряд на еритроцитите	12
б въглехидратните вериги на гликокаликса	13
<i>Б Деформируемост на еритроцитите</i>	13
<i>В Форма на червените кръвни клетки</i>	14
3. Методи за изследване на агрегацията на еритроцити	14
<i>А Микроскопските агрегационни индекси</i>	15
<i>Б Измерване на преминала през или отразена светлина</i>	15
<i>В Седиментационни методи</i>	15
<i>Г Вискозиметрия при ниски градиенти на скоростта</i>	15
<i>Д Ултразвукови методи</i>	15
<i>Е Определяне на електрическия импеданс на суспензии от еритроцити</i>	15
III Модели за обясняване на агрегацията на еритроцити	16
1. Модел на омреждане (МО)	16
2. Моделът на обеднения на макромолекули слой (ОМС)	17
Глава 3. Цел, задачи, материали и методи на изследване	20
I Цел	20
II Задачи	20
III Материали и методи на изследване	21
1. Химикали	21

2. Приготвяне на изследваните обекти	22
<i>А Еритроцити</i>	22
<i>Б Липозоми</i>	23
3. Помощни аналитични методи	25
4. Микроскопия	25
5. Вискозиметрия	25
6. Изследване на повърхностните характеристики на еритроцити и липозоми	26
<i>А Електрофореза</i>	26
<i>Б Електро-оптика</i>	27
7. Изследване на агрегационното поведение на еритроцити	28
<i>А Метод, който базира на разсейването на светлината</i>	30
<i>Б Дзета седиментационен метод</i>	31
Глава 4. Анализ и обсъждане на резултатите	34
I Оценка на възможностите на въведения от нас метод на дзета седиментация	
1. Характеристики на метода	34
<i>А Измервания в цялостна кръв</i>	34
<i>Б Измервания в среди с декстран</i>	36
2. Моделни експерименти	41
<i>А Изследвания върху ролята на външни фактори</i>	41
а агрегационен потенциал на други полимери	41
- вискозиметрично определяне размера на полимерите	
б роля на механичното притискане за агрегационното поведение на еритроцитите	42
в влияние на йонната сила на средата върху агрегацията на еритроцити	46
<i>Б Клетъчни фактори, които влияят на процеса на агрегация на еритроцити</i>	48
а повърхностен електричен заряд	48
б деформируемост на клетките	49
в еритроцити ковалентно декорирани с PEG	53

- електрофореза на пегилирани RBC	
- електрофореза на липозоми, декорирани с PEG	
- проучване ролята на стеричните особености на гликокаликса за агрегацията на еритроцити	
II Изследвания, имащи отношение към механизма на агрегация, предизвикана от полимери	63
1. Модели за обясняване на агрегацията на еритроцити	63
<i>A Електрофореза на липозоми</i>	65
<i>B Електро-оптика на еритроцити</i>	68
III Изследвания в цялостна кръв и съпоставката им с измерванията в моделни условия	70
1. Фактори от кръвната плазма, корелиращи с агрегационното поведение на еритроцити	70
2. Възможности на дефинираните агрегационни показатели в медико-биологични изследвания	71
Глава 5. Изводи и препоръки	73
Глава 6. Приноси	74
Глава 7. Библиография	75
Списък на публикации и участия в научни прояви, свързани с дисертацията	84
Справка за цитирания на публикациите, свързани с дисертацията	86

Глава 1. Въведение

Задачата на кръвта като самостоятелен орган е да пренася газове, хранителни вещества, метаболитни продукти, хормони, соли, антитела, както и топлина. Тази важна транспортна функция може да се осъществява само при нормална функция на сърцето и нормална реология на кръвоносните съдове и кръвта. Хемореологията е наука, занимаваща се с потока и деформационното поведение на кръвта и нейните формени елементи, т.е. еритроцити, бели кръвни клетки (левкоцити) и тромбоцити. Реологичните характеристики на кръвта са от основен научен и клиничен интерес, тъй като въз основа на множество експериментални и клинични данни е показано, че те са важен фактор в контрола на кръвния ток и участват в развитието и изявите на редица болестните състояния. В миналото на преден план в дискусиата на тези патологии стояха измененията в архитектурата на кръвоносните съдове (т.е. в геометрията, условия, при които кръвта тече) и заболяванията на сърцето. Без да се омаловажава значението на тези фактори в настоящото работа основно място ще бъде отделено на реологичните свойства на кръвта и в частност на агрегационното поведение на еритроцитите.

Взаимодействията, включващи клетъчните компоненти на кръвта, като агрегация, аглутинация и адхезия са предмет на огромен брой изследвания, върху бозайници и човек – в нормални и патологични условия. Формирането на еритроцитни агрегати в статични условия или при слабо течащ поток, аглутинацията с плазмени антитела, адхезията и агрегацията на тромбоцити, адхезията на левкоцити към ендотела са пример за такива взаимодействия. В случая на еритроцитната аглутинация се наблюдава специфичното свързване на имуноглобулини, лектини и други към повърхността на близко разположени клетки, докато агрегацията на еритроцитите в плазмата е причинена от наличието на протеини: фибриноген, имуноглобулини, както високомолекулни водно разтворими полимери, използвани като заместители на кръвната плазма – декстран, полиетилен гликол и др.

В рамките на нашите изследвания върху реологичните свойства на кръвта в периода 1984 – 1990 се появи необходимостта от разширяване областта на проучванията ни с тематиката на агрегационното поведение на еритроцити. В тогавашните условия не бе възможно да се получат сериозни финансови средства за закупуването на модерна апаратура. Първоначално използвахме методичната база на колегите в Института по медицинска физика и биофизика на Медицинския факултет (Charite) на Humboldt University, Berlin, Germany, в рамките на две програми за обмяна на опит в областта на образованието по медицинска физика и биофизика на студенти по медицина и

стоматология и изследвания върху електричните и механичните свойства на мембрани и клетки. Наложил се сами да разработим методика, като използваме чужд опит.

В настоящата работа ще бъдат изследвани факторите, които определят агрегационното поведение на еритроцити в моделни условия – вида, молекулната маса и концентрацията на различни макромолекули, йонната сила на средата, ролята на механичното притискане между клетките. Особено внимание ще се обърне на ролята на различните клетъчни фактори – електрични и стерични особености на клетъчната повърхност, деформируемостта им.

Глава 2. Литературен обзор

I Реология на кръвта и сърдечно съдови заболявания (ССЗ)

Епидемиологични изследвания показват, че през 80-те години на миналия век над 50% от смъртните случаи в САЩ се дължат на сърдечно-съдови заболявания. През 1999 този процент е намален на 40, но продължава да водеща причина за смъртността там (American Heart Association, 2002). Взема се решение, да се търсят нови фактори, които са отговорни, за развитието на ССЗ и големия процент смъртни случаи. С това се цели да се намерят нови области за терапевтична интервенция. Вниманието се насочва към механичните сили, действащи върху кръвоносните съдове, и връзката между реологията на кръвта и биохимичните механизми в нея (Smith, 1996). В последните години все по-голямо място се обръща на хемореологичната патофизиология, т.е. на патологични процеси, които се причиняват от изменения на кръвотока. В миналото на преден план в дискусиата на тези патологии стояха изменения в архитектурата на кръвоносните съдове (т.е. в геометричните условия, при които тече кръвта) и заболявания на сърцето и големите съдове. Понастоящем обаче все по-голямо внимание се обръща на реологичните свойства на кръвта и тяхното значение за нормалната микроциркулация. Установено е, например, че първичната локализация на образуването на атеросклеротични плаки са винаги местата, където има изменения в кръвния ток. Това са бифуркациите (Friedman, et al. 1987) и винаги там, където силите са редуцирани. Експерименти върху хиперлипидемични животни показват, че с моделиране условия подобни на тези на бифуркациите, води до образуване на атеросклеротични плаки само за няколко месеца (Uematsu, et al. 1991). Тези промени могат да се предотвратят, ако се измени вискозитета на кръвта (Sawchuk, et al., 1999). Механичните сили, определящи потока на кръвта, и тези действащи върху съдовете се детерминират от три фактора: кръвното налягане, геометрията на кръвоносните съдове и вискозитета на кръвта.

Съществен брой епидемиологични изследвания показват връзката между вискозитета на кръвта и ССЗ. Рискът от сърдечно-съдови инциденти се увеличава 3 пъти в индивиди с увеличен вискозитет на кръвта (Yarnell, et al., 1991). Такава картина е установена при болни от хипертония и диабет, при пушачи и др. Тези факти подчертават необходимостта от сериозни изследвания върху факторите, които на свой ред определят вискозитета на кръвта. Това са концентрацията на кръвни клетки (над 94% червени кръвни клетки), вискозитетът на кръвната плазма, балансът на процесите агрегация – дезагрегация на еритроцити (като доминиращата като брой и обемна фракция вид клетка), както и тяхната деформация (виж Baskurt, et al. 2007, един от последните сборници обзорни статии в областта на хемореологията и микроциркулацията). Агрегацията на еритроцити е главният фактор, който определя вискозитета на кръвта в условия на ниски хлъзгащи напрежения (shear stress) и с това влияе на динамиката на кръвния поток главно в микроциркулаторната област, където такива условия на течение е съществуват (Soutani, et al. 1995). Посткапилярните венули са тези съдове, където се смятат, че кръвния ток е най-сериозно повлиян от агрегацията на еритроцитите. Докато в капилярите основен фактор, определящ течението е деформируемостта им. Агрегацията на еритроцитите влияе силно на аксиалната миграция и радиалното разпределение на еритроцитите в кръвоносните съдове. Създава се слой от плазма, близо до стената, където няма клетки, с което се намалява съдовото съпротивление и се влияе на транспорта на кислорода (Tateishi, et al., 2001). В центъра на съда, пък вискозитетът расте, заради акумулацията на клетки. Крайният ефект ще зависи от типа и размера на съда. Например, в мускул в покой, 60% от венозното съдово съпротивление се приписва на RBC агрегацията (Bishop, et al., 2001). От това се заключава, че дезагрегацията дава основния принос за намаляване на съдовото съпротивление. В условията на нормален кръвен ток (високи стойности на плъзгащото напрежение) *in vivo* агрегация не се наблюдава, т.е. клетките са монодисперсни. Кръвта се отличава с нисък вискозитет и тече с висока скорост. При падане на хлъзгащото напрежение (σ_s) под критичната стойност, кръвта представлява съвкупност от бавно течащи агрегати с висок вискозитет. Ако устойчивостта на тези агрегати на хидродинамично разрушаване е повишена (напр. заради условия на слаба перфузия), вискозитетът на кръвта параболично нараства, с което кръвният поток става още по-малък. Може да се стигне накрая до запушване съда, исхемия и инфаркт. Паралелно с хемодинамичните ефекти, увеличената RBC агрегацията може да повлиява поведението и функциите на други клетки в съдовата система:

- да активира клетките на съдовия ендотел, като увеличава хлъзгащото напрежение;

- да спомага за миграцията на тромбоцитите към съдовата стена, където те да могат да взаимодействат с клетките на ендотела;

- да маргинализира белите кръвни клетки към стените на съда, където те да адхезират.

Вземайки предвид дадените примери, може да се заключи, че увеличената агрегация на RBC притежава потенциала да влошава кръвния ток и да допринася по този начин за оклузията на кръвоносните съдове по различни пътища. Установено е, че увеличената агрегация участва в патофизиологията на редица заболявания с нарушения в циркулацията – ССЗ, възпаление, диабет, хиперлипидемия, сърповидно-клетъчна анемия, таласемия и травми (Shiga, et al., 1990). Тя създава проблеми и при трансплантация на органи. За съхраняването им от взимането до присаждането са разработени редица специализирани среди и разтвори за съхранението им и промиването им – напр. разтворът на Университета в Уисконсин (UW solution). Той съдържа PEG, който предизвиква силна агрегация на еритроцитите. След присаждане тя влошава оросяването на присадения орган и създава условия за сериозното му увреждане. Появява се риск от отхвърляне на органа, дори развиване на опасни последствия за целия организъм (Van der Plaats, 2005). Както се споменава в цитирана тук работа, опитът да се отмят агрегатите с увеличена разлика в налягането, може да увреди ендотелните клетки. Предлага се, да се намери оптимална молекулна маса на PEG. От една страна, да не предизвиква агрегация на еритроцитите, но от друга да изпълнява ролята си, определена му в разтвора за съхраняване на органите за трансплантация. Подобен проблем е съществувал и при производството на заместители на кръвната – полимерите, които са използвани тогава – декстран с различни молекулни маси (за детайли виж обзора на Meiselman, 2009). След установяването на факта, че молекули с маса над 40000 предизвикват агрегация и циркулаторни проблеми, докато фракцията 40000 – не, се оптимизират разтворите, така че просто да намаляват хематокрита и увеличават кръвния ток. По същия начин се подхожда и с полимера поливинил пиролidon (PVP). Припомнянето на тези изследователски успехи, които помагат да се оптимизира една терапевтична стратегия, е с цел да се подчертае практическата насоченост на проучванията, засягащи агрегацията на еритроцитите, и да обоснове нашата мотивация за експериментални търсения в тази област.

II Агрегация на еритроцити

Първо ще представим фундаментални концепции и дефиниции, които имат отношение към процеса агрегация на клетки, и в частност агрегацията на еритроцити.

Във физиката, ако вследствие някаква сила на привличане, частици от един и същ материал се прилепят една към друга, то физиците наричат това явление *агрегация*. В

случай, че частиците са от различен материал, тогава процесът се нарича **конгломерация**. В медицината понятията са много повече: **аглутинация, коагулация, образуване на тромби, агрегация, явлението „sludge”**. Няма обща дефиниция. **Коагулацията, образуването на тромби, явлението „sludge”** са процеси, в които са включени различни кръвни клетки (RBC, бели кръвни клетки, тромбоцити) и биологични макромолекули. Обратно, **агрегацията** и **аглутинацията** описват струпването на взаимодействащи клетки с еднаква природа, които се причиняват от химични и физични сили. Такива са агрегатите от еритроцити и тромбоцити. В случая на RBC, под **аглутинация** се разбира образуването на клетъчни асоциати от тях, посредством постоянна връзка, осъществена от антитела, лектини и др. В тази работа, обратно, изследвани са агрегати от еритроцити, които са образувани в резултат на слаби сили на взаимодействие, които лесно могат да се разрушават, т.е. контактът между клетките е обратим. Малки по големина механични сили, каквито съществуват в циркулацията, са достатъчни да разрушат връзките и разпръснат еритроцитите. Ако тези механични сили отслабнат под определено критично ниво, RBC започват да агрегират отново. Трябва да се разграничат и други две понятия, засягащи обратимата агрегация на еритроцитите: агрегация и **агрегируемост** („aggregability”, Meiselman, H. 2009). Агрегация на RBC се наблюдава и/или измерва във всяка една среда. Агрегируемостта е наблюдаваната и/или измерваната агрегация на отмити от плазмени белтъци еритроцити в разтвори на определени полимери или белтъци, сравнена с тази на RBC от друга суспензия или от друг индивид, суспендирани в същия разтвор на полимери или белтъци. За да няма недоразумения в интерпретацията на понятието агрегируемост, абсолютно необходимо е да се тестват – два типа еритроцити или клетки от два източника в идентична среда. Клетките показващи по-голяма агрегация в този разтвор, имат по-голяма агрегируемост в него.

Първичните агрегати от червени кръвни клетки приличат на ролки (rouleaux) или стълбчета (stacks) от монети (coins), които могат да се свързват във вторични, подобни на мрежи агрегати. Те са определящи за т.н. структурен вискозитет на бавно течащата кръв. С други думи те нарушават течението на плазмата в много по-голяма степен, отколкото индивидуалната клетка, а оттам имат по-сериозното влияние върху вискозитета на кръвта.

Факторите, които определят степента на агрегация на еритроцитите условно могат да се класифицират като:

- **външни**: условията на течение (градиент на скоростта, γ ; хлъзгащо напрежение, σ_s), физико-химични свойства на суспензионната среда (вид и концентрацията на

макромолекули - плазмени белтъци; полимери, използвани в разтвори – заместители на кръвната плазма; йонната сила и киселинността на средата (I, pH);

- **клетъчни**, свързани със самите червени кръвни клетки - т.н. *агрегируемост*. Това са всички онези характеристики на клетките, които имат значение за агрегацията).

1. Външни фактори

A условия на течение

Агрегацията на еритроцити се определя от условията на течение. При ниски градиенти на скоростта, до около 0.5 s^{-1} образуването на RBC агрегати се засилва, вероятно поради учестените сблъсъци между клетките. Затова някои методики за количествена оценка на процеса, не изключват напълно хидродинамичните сили, действащи на клетките, а ги установяват на нива, които засилват агрегацията, напр., при агрегометъра на фирмата Mupenne. Явлението се наблюдава особено ясно при кръв от диабетици. Някои моделни изчисления (Lim, et al., 1997) получават областта на максимална агрегация между $0.1 - 0.25 \text{ dyn/cm}^2$. Нормалната физиологична агрегация е обратим процес. Плъзгащи напрежения от порядъка на 0.2 Pa напълно диспергира еритроцитните агрегати, следователно агрегацията ще влияе на вискозитета на кръвта само при стойности на σ , по-малки от посочената. Оттук се налага изводът, че всяка патология, която по един или друг начин намалява приплъзващото напрежение под тази стойност (намален сърдечен дебит, напр.) създава условия за увеличаване на вискозитета на кръвта и сериозно нарушаване на циркулацията.

B плазмени фактори

Агрегацията на еритроцитите силно зависи от концентрацията на фибриноген, някои имуноглобулини, някои заместители на плазмата (напр. декстрини с молекулна маса над 40 000) и водно разтворими полимери – полиетилен гликол и други също могат да индуцират агрегацията. Трябва да се подчертае, че тук важно значение играе, не само на степента на агрегация, а и на здравината на агрегатите и кинетиката на тяхното образуване, респ. разрушаване. Повишаването на агрегацията на червените кръвни клетки е добре познат резултат от тъканно увреждане, инфаркт на миокарда, възпаление или травми, като това повишение е свързано с увеличените плазмени нива на групата протеини познати като фактори на акутната фаза. Освен фибриногена тук се включва и С-реактивният протеин, серумния амилоид- L, хаптоглобина и церулоплазмина.

B йонна сила на средата

Ролята на този показател, свързан с концентрацията и заряда на йони в средата, в която се намират еритроцитите, се обяснява с увеличаване на некомпенсирания повърхностен

електричен заряд на еритроцитната мембрана (при намаляване на йонната сила), което води до увеличаване на електростатичните сили на отблъскване между клетките и с това до намаляване степента на агрегация, въпреки присъствието на агрегиращи протеини (Lerche, 1982). Дискутира се също, възможността пространственото разположение на въглехидратите на гликокаликса да се променя, при промяна на йонната сила. При намаляване на компенсацията на електричните заряди в гликокаликса при ниски йонни сили, се смята че е много вероятно веригите на полизахаридите да се изправят, с което дебелината на гликокаликса да се променя и с това стеричното взаимодействие

Г киселинност на средата (pH)

Киселинността на средата има отношение към степента на електролитна дисоциация на йоногенните групи в мембраните на клетките. Както и за други полиелектролити и за клетките, може да се установи стойността на **pH**, при която клетките не се движат в електрично поле (т.н. изоелектрична точка). В тази точка образуването на агрегати трябва да е особено интензивно, заради намаленото електростатично отблъскване. За човешки еритроцити тази точка е грубо около **pH= 3**. Тъй като при такива условия нативните еритроцити са неустойчиви, обикновено се работи с фиксирани клетки. Тяхната агрегация, обаче се влияе от степента на втвърдяване на клетки, ето защо литературата по въпроса – агрегация на наивни еритроцити в изоелектричната точка – е оскъдна.

2. Агрегируемост на еритроцитите

Терминът агрегируемост се използва за изразяване на присъщото агрегационно поведение на еритроцитите, независимо от характеристиките на суспензионната среда.

А Гликокаликсът на човешките еритроцити

Гликокаликсът на еритроцитите е един от клетъчните фактори, които определят агрегационното им поведение. Той представлява слой от прави или разклонени хетерополимерни въглехидратни вериги от външната страна на еритроцитната мембрана, които са свързани ковалентно с белтъците и липидите на бислоя и при физиологични условия от адсорбирани върху клетъчната повърхност плазмени протеини. От белтъчните фракции – тази на гликофорините и тази от ивица 3 са основните носители на тези олигозахариди. Друга част влиза в състава на гликолипидите.

а повърхностен електричен заряд на еритроцитите

За агрегацията на еритроцитите от значение е повърхностният електричен заряд (surface electric charge, SEC) на техните мембрани (Jan, 1973). Той е отрицателен по знак и е

резултат от присъствието на N-ацетилневраминовата (сиаловата) киселина в полизахаридните вериги на гликокаликса на еритроцитите. Счита се, че остатъците от сиалова киселина са разпределени в два слоя: дълбоко разположен слой, който не може да бъде отстранен с неврамидаза и съдържащ около 12% от общото количество сиалова киселина на гликокаликса и външен - съдържащ останалото количество сиалови киселини. SEC е отговорен за електростатичните сили на отблъскване между клетките, които противодействат на агрегационните, водещи началото си от присъствието на асиметрични макромолекули (напр. фибриноген, декстран, PEG) (Baskurt, 2003).

б) Въглехидратните вериги на гликокаликса

Полизахаридите от гликокаликса, като слой от макромолекули, действат като стерична преграда, предотвратявайки неспецифичните взаимодействия и агрегация (адхезия) на клетките. Структурата на най-външния слой на мембраната - гликокаликса е много важна по отношение на механизма на агрегацията. Той е съставен от външната част на гликопротеини и гликоганглиозиди, които са декорирани с въглехидрати, свързващи сиалова (невраминова) киселина. Дебелината на гликокаликса е около 5 nm при физиологична йонна сила. Плътноста на слоя е значително по-ниска от тази на останалите два слоя. Така например, третирането на еритроцитна мембрана с неврамидаза намалява количеството на сиаловата киселина на повърхността на еритроцитната мембрана с 80-90%, което рефлектира върху електрофоретичната подвижност. В допълнение към редукцията на електричния заряд, неврамидазата намалява и стеричното отблъскване. При премахването на повърхностния заряд, електростатичното отблъскване между гликокаликса и мембраната намалява. В допълнение третирането с неврамидаза води до повишаване на мембранната хидрофобност. Тази повишена хидрофобност увеличава и неспецифичната адхезия на клетките към повърхностите. Именно увеличаването на неспецифичните адхезивни сили както и намаляването на стеричното и електростатично отблъскване между гликокаликсите на съседни клетки води до повишаване енергията на свързване и степента на агрегацията между третираните с неврамидаза еритроцити в сравнение с тази при нормалните клетки.

Б деформируемост на еритроцитите

Важно значение за процеса на агрегация има деформируемостта на еритроцитите (Chien, 1987). Тя играе роля при образуването на еритроцитните агрегатите - при приближаването, приплъзването на клетките една спрямо друга с плоските им страни, здравината на връзките между клетките. За напълно втвърдени човешки еритроцити

агрегация не се наблюдава. Evans и Parsegian (Evans, 1983) дават теоретични доказателства относно важността на деформируемостта за агрегацията на еритроцитите. Работата по деформацията, която ще се извършва от конкретни агрегационни сили за формирането на стабилен адхезивен контакт между двете клетъчни повърхности, включва работата необходима за промяна на клетъчния обем и деформацията на клетъчната мембрана. В процеса на агрегация, вискозните характеристики (който включват и мембраната проницаемост) лимитират само процента на образуваните контакти, но не крайното ниво на адхезия. За стационарната агрегация, деформацията се конкурира с адхезионните сили (химичния афинитет) за определяне степента на агрегацията.

В форма на червените кръвни клетки

Установено е, че сферулирали еритроцити агрегират много по-слабо, отколкото тези с нормална биконкавна форма. Това се дължи най-вероятно на намалена повърхност, с която могат да се слепват сферичните по форма клетки едни с други.

3. Методи за изследване на агрегацията на еритроцити

Различни подходи и методи са разработени за изследване на еритроцитната агрегация. Могат да се закупят и апарати от пазара на научна апаратура. Засега обаче няма „стандарт“ или „калибрационна процедура“, която да позволи директното сравняване на резултатите, получени с различните техники.

В идеалния случай агрегацията на еритроцитите трябва да се характеризира чрез времевата зависимост на инерционния радиус на агрегатите и тяхната фрактална размерност. Само визуализацията на агрегатите и съпътстваща обработка на образите отговаря на такова изискване. Тъй като тази методика работи с тънки слоеве от разредени суспензии на клетки, данните за агрегацията получени с нея са повлияни от взаимодействия на клетките със стените на работните кювети. Проблем представляват и опитите получените резултати да се разпростират върху агрегация на еритроцити в цялостна кръв.

Условно може да класифицираме методите в 2 групи методи:

- непосредствена визуализация на агрегатите от еритроцити
- техники обработващи отговора на агрегиращите клетки след въздействие с физично поле върху тях

А Микроскопските агрегационни индекси – могат също да описват динамиката на изменение в размера и формата на образуващите се агрегати. Може обаче да оценява и само стационарното състояние

Б Измерване на преминала през или отразена светлина от суспензии от агрегиращи еритроцити. Обикновено се проследява изменението във времето (силектограма). От получените криви се получават параметри, които се отнасят към динамиката на процеса или към стационарното състояние на суспензията. Използват се и подходи за оценка на здравината на агрегатите.

В Седиментационни методи

Идейно се използва тезата за утаяването на частици на Stokes, където основният параметър, определящ скоростта на процеса е радиуса на частиците (монодисперсни или агрегирали). Най-разпространен е параметърът скорост на утаяване на еритроцитите (СУЕ или ESR). Има и други варианти, които също могат да са свързани с динамиката на процеса или стационарното състояние в суспензията (ZSR).

Г Вискозиметрия при ниски градиенти на скоростта.

Най-общо казано, градиенти на скоростта под 1 до 5 s^{-1} създават условия за масивно образуване на агрегати в цялостна кръв, затова вискозитетът при тези условия се използва като мярка за агрегацията на клетки. Използва се и отношението на вискозитета при ниски, към този при високи градиенти.

Д Ултразвукови методи

Клетките и техните агрегати отразяват ултразвука, така че коефициентът на отражение се използва за количествена оценка на процеса.

Е Определяне на електрическия импеданс на суспензии от еритроцити

В последните 10 години се разшириха изследванията във връзка с промяната в електричните свойства на агрегиращи суспензии (Pribush, 2000, Antonova, 2010) и тяхната апробация за използване в клинични студии. Параметризацията варира между различните подходи, но дава възможност, както за проследяване на динамиката на процеса, така и за оценка на стационарната агрегация.

Като резюме може да се заключи, че подходите за изучаване на явлението еритроцитна агрегация са много разнообразни. Сравняването на резултатите е възможно само, ако се дефинират стандартни условия, при които да се правят измерванията. Такава е и идеята за използването на полимерни разтвори с фиксирана концентрация, при която да се

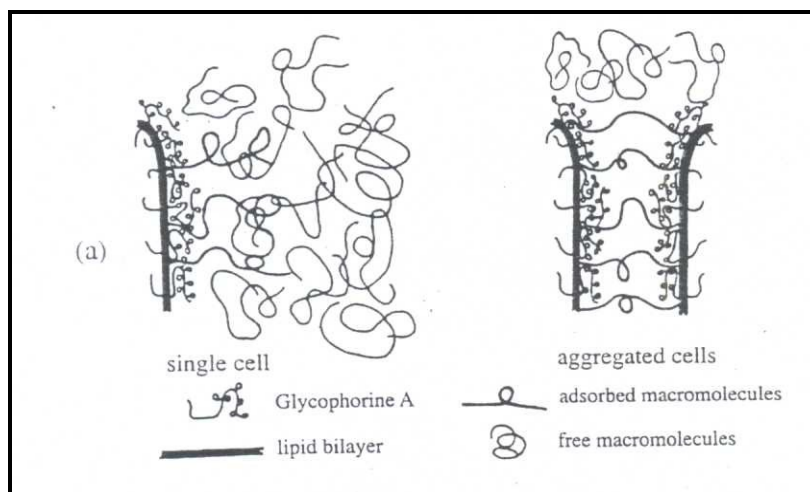
проследява агрегационното поведение на клетки. (3g/dl Dx70K; 0.5 g/dl Dx500K, други подходящи полимери). Получените резултати се смятат, че ще са свързани с индивидуалните особености на клетки, т.е. тяхната агрегируемост. Сравняването на тези резултати с агрегацията в автоложна плазма, пък ще даде възможност за разделяне на факторите, които при дадено заболяване играят доминантна роля - клетъчните, плазмените или и двете групи фактори.

III Модели за обясняване на агрегацията на еритроцити

На базата на структурата на еритроцитната повърхност и особеностите на взаимодействие на макромолекулите от средата с нея са развити два модела, които обясняват механизма на обратимата еритроцитна агрегация моделът на омрежване (cross-bridging model) и моделът на обеднения на макромолекули слой (depletion model, ОМС).

1. Модел на омрежване (МО)

Моделът е развит от Merrill et al през 1963, за плазмени протеини (фибриноген и др.), предизвикващи агрегация на еритроцити и от Shien и Jan и Brooks за неутрални декстранови молекули индуциращи еритроцитна агрегация (Shien и Jan, 1973, Brooks, 1973).



Фигура 1. Схематично представяне на модела на омрежване (cross-bridging model). Вляво абсорбция на декстриани върху единична клетка; вдясно - образуване на напречни контакти между съседни клетъчни повърхности от полимерните молекули - води до формиране на монетни стълбчета от еритроцити (Baumler, 1999).

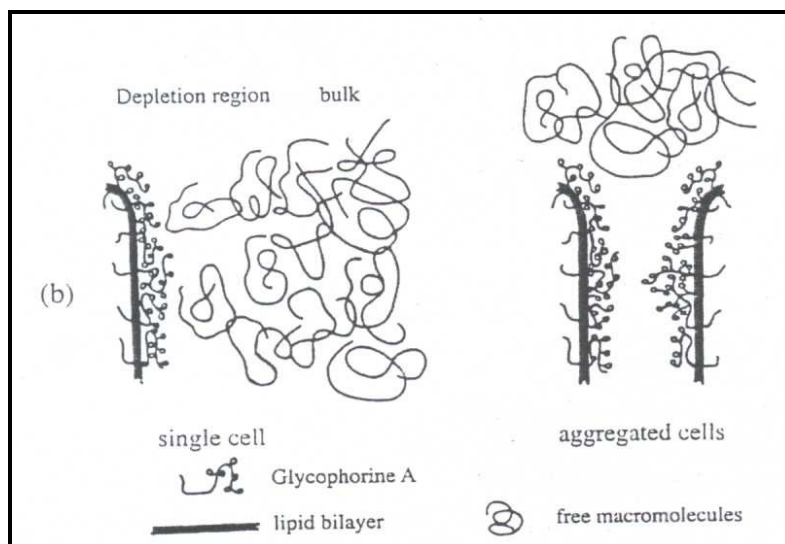
В този модел се постулира, че макромолекулата, (напр. декстранът (DX) - изграден от глюкозни единици, свързани с 1,6-а връзки или 1,3 и 1,4 връзки) или полиетилен гликола (PEG, изграден от етиленоксидни остатъци) са линейни, верижноподобни структури, които не абсорбират върху гликокаликса с цялата си дължина, а само в специфични абсорбционни места. В такъв случай свободните брънки и несвързаните крайни участъци на веригите могат да взаимодействат с повърхността на съседни близко разположени клетки и да формират двуклетъчен агрегат (Brooks, 1973).

Силите на взаимодействие между съседни клетъчни повърхности изцяло водят началото си от молекули, едновременно абсорбирани на две срещуположни клетъчни повърхности. Енергията на омрежване за единица взаимодействаща мембранна повърхност е равна на произведението на свързващата енергия за връзка, броя на връзките, осъществявани от всяка молекула с повърхността на еритроцита и броя на свързаните молекули за единица взаимодействаща площ.

Повишаването на агрегацията на еритроцитите с увеличаването на декстрановата концентрация в областта от 0-4 g/dl показва повишаване на свързващата енергията с увеличаване на броя свързани молекули, абсорбирани върху двете клетъчни повърхности. Еритроцитната агрегация по този механизъм се явява в случаите, когато свързващите сили, дължащи на абсорбция на макромолекули върху съседни клетъчни повърхности, надвишават по големина силите на дезагрегация, дължащи се на електростатично отблъскване, мембранно напрежение и механично приплъзване.

2. **Моделът на обеднения на макромолекули слой (ОМС)**

Според него еритроцитната агрегация е резултат от намалената локална концентрация на макромолекули (протеини или полимери) в близост до клетъчната повърхност в сравнение с концентрацията им в суспензионната среда далече от мембраната. Основната теория на ОМС - взаимодействието и нейното приложение в колоидните системи е предложена от de Gennes и van Oss, а приложена за агрегацията на RBC - от Evans et al. и van Oss et al. (Evans, 1988, van Oss, 1988, 1990).



Фигура 2. Схематично представяне на моделът на обеднения на макромолекули слой (ОМС). Понижената концентрация на макромолекули в близост до клетъчната повърхност довежда до агрегация, ако клетките са близко разположени и съществува разлика в осмотичното налягането в обемната фаза и това непосредствено между клетките (Bäumler, 1999).

Ако клетъчната повърхност е в контакт с полимерен разтвор и загубата на конфигурационна ентропия на полимера не е уравновесена от абсорбционната енергия се развива ОМС в близост до клетъчната повърхност, като полимерната концентрация в този слой е по-малка от концентрацията на полимера във обемната фаза. Така при доближаването на два еритроцита, разликата в химичния потенциал на разтворителя (т.е. разликата в осмотичното налягане на областта между клетките и обемната фаза) води до преразпределение на разтворителя по посока на обемната фаза и по тази причина клетките формират агрегат. Често при това взаимодействие се формират сили на привличане, които се стремят да намалят до минимум свободното от полимер пространство между клетките.

Процесът на еритроцитна агрегация може да бъде определен като резултат от баланса между агрегационните и дезагрегационните сили, като силите на дезагрегация включват механичните сили на прихлъзване, електростатичното отблъскване между клетките, стеричната компонента от гликокаликса като полимерен слой и еластичната енергия на клетъчната мембрана при деформация.

И до днес няма решение, коя от двете, в определени отношения взаимно изключващи се тези, описва по-добре експерименталните резултати натрупани в годините. Може би умелото комбиниране на двете хипотези, в зависимост от конкретиката на случаите, ще

доведе до по-плодотворно развитие в теоретичното описание на явлението (van Oss, , 2006, 2008)

От изложеното дотук става ясно, че изпълнението на функциите на кръвта зависи по сложен начин от множество фактори, които по своята същност са с биофизична природа. Познаването на физичните закономерности, на които те се подчиняват и развитието на методики за тяхното количествено описание и контрол могат да въоръжат медицинската наука с подходи и средства за диагностициране и терапия на редица патологични състояния, базиращи на нарушения в кръвоснабдяването на тъкани и органи. Агрегацията на еритроцитите е важен фактор, който определя кръвния ток в микроциркулацията и е с значителен патофизиологичен потенциал в тази област. От обзора става ясно, че тя се определя от множество явления при сложни взаимоотношения между тях. В настоящата работа внимание е обърнато именно на тези сложни взаимодействия на клетъчните и извънклетъчни фактори определящи взаимодействието на еритроцитите в моделни суспензии и нивото на тяхната агрегация. Основен акцент е поставен на въвеждането на дзета седиментационния метод, като подход на изследване на взаимодействието на еритроцитите помежду им в Катедрата по медицинска физика и биофизика. През всичките години на изследвания в тази област, ние сме сравнявали достигнатото от нас, с постигнатото от по-виско технизирани лаборатории и изследователски групи. Затова в тази работа сериозно място заемат съпоставките с резултати получени с други методики. За това допринесе въвеждането на понятието агрегируемост на еритроцитите, което дава по-добра основа за сравняване на резултатите.

Глава 3. Цел, задачи, материали и методи на изследване

I Цели

1. Да се оценят възможностите и приложимостта на въведения от нас метод за определяне на агрегация на еритроцити
2. Да се изследва влиянието на клетъчни и извънклетъчни фактори върху агрегационното поведение на еритроцити в моделни суспензии и цялостна кръв

II Задачи

1. Да се оценят възпроизводимостта и чувствителността на въведения от нас дзета седиментационен метод за провеждане на изследвания в цялостна кръв и моделни условия
2. Да се изследва ролята на концентрацията и физикохимичните особености на макромолекулите в суспензионната среда за агрегационното поведение еритроцити.
3. Да се изследва влиянието на йонната сила на средата върху агрегацията на еритроцити
4. Да се оцени ролята на механичното притискане между клетките за тяхното агрегационно поведение.
5. Да се установи влиянието на клетъчни фактори върху агрегационното поведение на еритроцити: повърхностен електричен заряд, деформируемост, стерични особености
6. Да провери експериментално хипотезата за съществуването на област с ниска концентрация на полимери в близост до повърхността на еритроцитните мембрани с оглед изясняване на механизма на индуцираната от тях агрегация.
7. Да се оцени влиянието на различните фактори за агрегацията на еритроцити в контекста на клинично приложение на този комплексен подход на изследване

III Материали и методи

1. Химикали

A За разтвори

Основната суспензионна среда за еритроцитите в моделните изследванията, представени в този дисертационен труд, е фосфатно буфериран разтвор на натриев хлорид (PBS): 151.2 mmol/l натриев хлорид (NaCl), 5.6 mmol/l калиев хлорид (KCl), 5.48 mmol/l динатриев водороден фосфат ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 0.32 mmol/l натриев дихидроген фосфат ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), киселинност (pH) – 7.40 ± 0.05 , осмотично налягане (π) = 300 ± 5 mOsmol/kg, йонна сила (I) – 0.171 mol/l. Разтворите с различна йонна сила са приготвени от 5.48 mmol/l динатриев водороден фосфат ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 0.32 mmol/l, натриев дихидроген фосфат ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), и NaCl в различни концентрации ($\text{pH} - 7.40 \pm 0.05$, $\pi - 300 \pm 5$ mOsmol/kg постигнато с добавка на захароза). Йонната сила е смятана по формулата:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

където: c_i е моларната концентрация (mol/l); z_i е валентността на йоните. Съставките за разтворите са с аналитична чистота от фирмите Fluka, Serva, Sigma, Valerius. Полимерите са със следния произход: декстран Т 70 ($\overline{M}_w \sim 70\,000$, означаван по-нататък в текста като Dx 70K) и декстран Т 500 ($\overline{M}_w \sim 500\,000$, означаван по-нататък в текста като Dx 500K) – Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden; полиетилен гликол с молекулни маси 20 000 (означаван по-нататък в текста като PEG 20K) и 35 000 (PEG 35K) са от фирмата Fluka, както и Merck, Darmstadt, Germany, а 200000 от фирмата Serva (предоставен от д-р Александър Живков, Институт по физикохимия, БАН). Човешкият албумин е закупен от Института по заразни и паразитни заболявания.

Б За модифициране на еритроцитите:

- Активирани полимери за покриване на еритроцитната повърхност: Метоксиполиетиленгликол сукцинил пропионат (methoxy polyethylene glycol succinimidyl propionate, означаван по-нататък в текста mPEG-SPA) с различна молекулна маса (2000, 5000, 20000, означени като 2K, 5K and 20K са от Nektar Transforming Therapeutics.
- Ензимът невраминидаза за намаляване на сиаловата киселина е от *Vibrio cholerae* (Serva, 200 mU/ml)
- Глутаров алдехид за химично втвърдяване на еритроцитите е от фирма BDH, UK.

В Липиди за приготвянето на липозоми

Бяха използвани димиристоил фосфатидил етаноламин (dimyristoylphosphatidyletanol-amine, DMPE) с ковалентно свързан полиетилен гликол - PEG 2000 (DMPE-PEG 2000) и PEG 5000 (DMPE-PEG 5000), яйчен фосфатидил холин (egg phosphatidylcholine, EggPC) и фосфатидил серин (phosphatidyl serine, PS) са от Avanti Polar Lipids.

2. Приготвяне на изследваните обекти:

А Еритроцити

- Взимане на кръвните проби: Доброволните кръводарители (зdravi хора и болни) са подбирани с добре уеднаквени антропометрични и клинични показатели и след устно заявяване на съгласие за участие в изследванията. Всеки от тях е прекарал 30 минути в седнало положение преди даването на кръв. Взимането на кръвни проби за клинично-лабораторни и реологични изследвания се осъществява между 9:00 и 12:00 часа от кубиталната вена според препоръките на ICSH (ICSH, 1988). Използвани са вакутейнери (фирма Greiner, Austria) за да се осигури краткотрайно запушване на вената и минимално засмукване, с цел предотвратяване активацията на кръвосъсирващата система на кръвта. Като антикоагулант е използван 1.5 mg EDTA/ml кръв.

- Стандартна процедура: Веднага след взимане на пробата е определяна агрегацията на еритроцитите чрез дзета седиментационния метод в цялостна кръв. Малка част от оригиналната проба (0.5 ml) се отделя за стандартизиране на концентрацията на клетки. Следва определяне на обемната концентрация на клетки (хематокрита, НСТ) с центрофугационен метод (5 минути при 10000 g, Biofuge A, Baujahr 1986, Heraeus Christ GmbH, Osterode am Harz, Germany). Ако се налага НСТ на малката проба цялостната кръв се довежда до 0.40 l/l и агрегацията се определя наново. След центрофугиране в продължение на 10 мин при 1000 g (MLW Janetzki, VEB Zentrifugenbau, Baujahr 1974, Engelsdorf, Leipzig, DDR) се отделя кръвната плазма за допълнителни изследвания. Повърхностният слой от бели кръвни клетки и плазмени протеини се отстранява чрез засмукване с водоструйна помпа. Еритроцитите се отмиват от плазмените белтъци с PBS трикратно. Хематокритът на получената суспензия се довежда до 0.60 l/l. Извършват се различните третириания на клетките. Следва ресуспендирането на клетките в PBS, който съдържа изследваните полимери + 1% човешки албумин за предотвратяване на промяната във формата при допира с стъклените капилярки (крайният хематокрит е 0.40 l/l).

- Третириания: Намалването на повърхностния електричен заряд на клетките се постига с невраминидаза (от *Vibrio cholerae*, Serva, 200 mU/ml), която отделя от

въглехидратите на мембраната сиаловата киселина. Равни обеми от митите еритроцити се смесват с еднакви пропорции на воден разтвор, съдържащ ензима (крайна концентрация е 25 mU/ml, НСТ е 0.30). Суспензиите се инкубират в термостат, при 37 °С, за различни периоди от време. Действието на ензима се прекратява посредством три последователни процедури на миене с ледено студен PBS, като се добавят и отнемат еднакви обеми от суспензионната среда – по този начин броят клетки в единица обем суспензия остава постоянен. Деформируемостта на еритроцитите е намалявана посредством третиране с глутаров алдехид (glutaraldehyde, GA, Merck или BDH) в различни концентрации (10^{-8} - 10^{-1} % в PBS) в продължение на 15 min (Dzhenev, et al. 1990). След това клетките се мият трикратно с PBS, както бе описано за клетките, третирани с неврамнидаза. Пълна фиксация на еритроцитите е постигната посредством обработка с GA в PBS, добавян капка по капка при непрекъснато умерено разбъркване с магнитна бъркалка (крайна концентрация 1%) в продължение на 12 часа. Клетките се мият след това пет пъти (1 обем клетки към 9 обема PBS). Температурно намаляване на деформируемостта се постига като отмити еритроцити се инкубират за 5-7 минути при температури между 47 и 50 °С (Lerche, D. et al. 1984). Ковалентното свързване на mPEG-SPA към външната повърхност на червените кръвни клетки в PBS (НСТ = 0,50 v/v) се осъществява чрез инкубация при стайна температура, в продължение на 60 min. Концентрацията на активираните полимери в инкубационната среда бе 20 и 40 mg/ml еритроцитен седимент за да се постигне различна степен на покриване на клетъчната повърхност – т.е. броят на местата на свързване на полимера за единица повърхност да варира. Процедурата завършва с двукратно миене с PBS (Armstrong et al. 1997, Sabolovic et al 2000, Bradley, et al. 2002).

- Получаване на еритроцитни мембрани: Отмити от плазмените белтъци еритроцити (от контролни или третирани с неврамнидаза суспензии) се смесват внимателно с ледено студен хипотоничен буфер (pH=8.0). Съотношението еритроцити/буфер трябва да бъде 1/40. След няколко секунди суспензията се избистря, показвайки разрушаването на клетките. Мембраните се утаяват в пластмасови епруветки (центрофуга K-24, MLW Janetzki, VEB Zentrifugenbau, Engelsdorf, Leipzig, DDR) използвайки ъглов ротор, при 16000 об/мин. Чистият червен супернатант се отстранява чрез изсмукване с водоструйна помпа, така че да не се размеси лекия седимент от еритроцитни мембрани (ghosts = сенки). Епруветката се завъртва, така че сенките да се приплъзнат на страни от лежащото под тях плътно петно, богато на левкоцитни протеази, което се отстранява. Същият цикъл на промиване се повтаря, докато не се получи кремаво-бял седимент.

- Съдържание на сиалова киселина в еритроцитните мембрани: Сиаловата киселина в мембрани от еритроцити е определяна въз основа на цветната реакция с тиобарбитурова киселина по метода на Warren (Warren, 1959, 1963). Еритроцитните мембрани се хидролизират за един час с 0.1 N H₂SO₄ at 80 °C. Натриев перйодат (мета) 0.2 mol/l в 9 mol/l фосфорна киселина се прибавя и сместа се оставя при стайна температура за 20 минути. Натриев арсенит (10%) в 0.5 mol/l натриев сулфат – 0.1 mol/l H₂SO₄ се добавя и епруветките се разклащат до изчезване на жълто-кафявия цвят. Тиобарбитурова киселина (0.6% в 0.5 mol/l натриев сулфат се смесва с пробите и се инкубира за 15 минути в кипящата водна баня. След охлаждане цветното съединение се екстрахира в циклохексанон и се измерва екстинкцията при 549 nm. Резултатите са представени като μmol/mg мембранен белтък или като % от стойността на контролните (респ. нетретираните) клетки. Получените от нас стойности (около 0.140 μmol/mg мембранен белтък = 140 μmol/g мембранен белтък) са от порядъка на резултатите получени от Reznikova et al. (Reznikova, et al. 1984).

- Определяне концентрацията на белтък в еритроцитни мембрани: Съдържанието на белтък в еритроцитните мембрани е измервана по метода на Bradford (Bradford, 1976), който базира върху свързването на багрилото Coomassie Brilliant Blue G-250 с протеина. За стандарт е използван човешки серумен албумин. Процедурата е следната: 100 μl мембранни белтъци се смесва с 5.0 ml реагент на Bradford (0.01% (w/v) Coomassie brilliant blue G-250; 4.7% (w/v) етанол и 8.5% (w/v) фосфорна киселина). След инкубация от 15 min при стайна температура се измерва абсорбцията при 595 nm срещу празна проба (суспензионна среда + 5 ml реагент на Bradford).

Б Липозоми

- Мултиламеларни липозоми (multilamellar vesicles, MLV): В облодънна колба се смесват разтворите на отделните липиди в хлороформ, в желаното моларно съотношение и разтворителят се изпарява. Следва диспергира в подходящ буфер посредством разклащане над температурата над фазовия преход за 10 min (Bangham, et al. 1974)

- Големи моноламеларни липозоми (large unilamellar vesicles, LUV): От MLV се приготвят LUV чрез пет последователни цикъла на замразяване - размразяване в течен азот (Düzgünes, et al, 1983). Използвайки мембрани с пори от 100 nm (Nucleopore), при температура над фазовия преход и петкратна екструзия на липозомната суспензия, се получават LUV. Размерът им е определян въз основа на фотонна-корелационна спектроскопия (Zetasizer 4, Malvern, UK) и е около 100 nm. Приготвяни са два вида липозоми с еднаква молна част отрицателно заредени липиди: „гладки“ – съдържащи

EggPC и PS, и декорирани с PEG 2000 и PEG 5000 – съставени от EggPC, PS и DMPE-PEG 2000(респ. DMPE-PEG 5000) в подходящи пропорции.

3. Помощни аналитични методи:

Киселинността на разтворите е определяна с рН-метър (PHM84 Research pH meter) на фирмата Radiometer, Copenhagen, Denmark. Специфичното съпротивление на разтворите е измервано с кондуктометър (CDM83 Conductivity meter) на фирмата Radiometer, Copenhagen, Denmark. Осмотичното налягане е определяно с осмометър (Vapour pressure osmometer 5500) на фирмата Wescor, Logan, Utah, USA.

4. **Микроскопия:** Снимките на агрегати от еритроцити са направени с микроскоп Olympus BX41M.

5. Вискозиметрия:

Вискозитетите на средите в които са суспендирани клетките са изследвани с вискозиметър на Освалд. Той е капиларен тип вискозиметър. Измервани са времената на изтичане (5-10 пъти) на определен обем от течностите през капиларката на вискозиметъра при 25 °С. При всички измервания в уреда е сипван един и същи обем течност, за да са уеднаквени условията на течение. За стандарт е използвана бидистилирана вода.

В общия случай вискозитетът на една суспензия от макромолекули трябва да е нелинейна функция от концентрацията на частиците, тъй като при високи концентрации изменението в разпределението на скоростите в течността предизвикано от една частица, може да променя градиента на скоростта в областта на съседните частици. Въвеждайки, относителния (η_{rel}) и специфичния вискозитет (η_{spec}) тази зависимост изглежда така:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = 1 + k_1c + k_2c^2 + \dots$$

$$\eta_{spec} = \eta_{rel} - 1 = k_1c + k_2c^2 + \dots$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{spec}}{c}$$

От тук се вижда, че цялата информация за характера на влиянието на разтвореното вещество върху вискозитета на разтвора се съдържа в специфичния вискозитет, респ. редуцирания вискозитет. С коефициентът k_1 в такова вириално разлагане може да се

свърже приносят на отделните молекули на разтвореното вещество. Коефициентът k_2 отразява двустранното взаимодействие при контакта на две молекули и т.н. Най-интересен е k_1 , който носи информация за свойствата на индивидуалните макромолекули. Той се нарича граничен вискозитет $[\eta]$ и се дефинира по следният начин (Панайотов и Факиров, 2005):

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{specific}}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red} = k_1 + k_2 c + \dots$$

$[\eta]$ се измерва в cm^3/g или dl/g .

Ние сме го определяли чрез линейна регресия на данните за η_{red} и концентрацията (фиг.) по уравнението на Хагинс (Huggins):

$$\eta_{red} = [\eta] + k_H [\eta]^2 c$$

Хидродинамичният радиус сме изчислявали с уравнението на Айнщайн (R_H):

$$R_H = \left(\frac{3qM_w}{4\pi N_A} \right)^{\frac{1}{3}} = \left(\frac{3 \frac{[\eta]}{2.5} M_w}{4\pi N_A} \right)^{\frac{1}{3}}$$

$[\eta]$ в ml/g , M_w - в g/mol , R_H в nm , където $q = [\eta]/2.5$ и N_A е числото на Авогадро.

6. Изследване на повърхностните характеристики на еритроцити и липозоми

А Електрофореза:

- Микроелектрофореза на еритроцити: Електрофоретичната подвижност на клетките е определяна с микроелектрофоретична апаратура създадена в Катедрата по медицинска физика и биофизика (Стоев, 1979, Василева, 1980, Димитров, и съавт., 1982). С микроскоп мануално се определя скоростта на движение в предната стационарна равнина на термостатирана правоъгълна камера, при алтернативна смяна на посоката на външно електрично поле, за 35-40 клетки. Електрофоретичната подвижност на клетките (EM) се изчислява с:

$$EM = \frac{v}{E} \left[\frac{m^2}{V \times s} \right]$$

където: $v = \frac{l}{t} \left[\frac{m}{s} \right]$, е скоростта на движение в електричното поле, $E = \frac{I\rho}{S} \left[\frac{V}{m} \right]$ е

интензитетът на електричното поле, l е изминатото разстояние от клетката, за единица време t , I , е големината на тока в камерата, S е напречното ѝ течение, ρ е специфичното съпротивление на средата. Големината на тока е 8 или 10 милиампера, което за физиологични йонни сили създава електрично поле с големина от около 10^3 V/m .

Резултатите са представяни като абсолютни стойности или като процент от контролните, респ. нетретираните клетки. Електрокинетичният потенциал на клетките (ζ) е изчисляван с уравнението на Хелмхолтц – Смолуховски:

$$\zeta = \frac{\eta \times EM}{\varepsilon \times \varepsilon_0},$$

където η е вискозитетът в равнината на прехлъзване, ε е диелектричната проницаемост на водата, ε_0 е диелектричната проницаемост на вакуума. Отделни измервания са правени с микроелектрофоретичната апаратура Electrophor на фирмата HaSoTec, Rostock, Germany по време на специализация на дисертанта по програма ТЕМПУС – ФАР (Vertrag IMG-96-BG-2072 zur Unterstützung eines Besuchs zur Weiter- und Fortbildung) в Humboldt-Universität zu Berlin, в Германия.

- Микроелектрофореза на липозоми: Електрофоретичната подвижност на липозоми е определяна с Zetasizer 4 на фирмата Malvern, оборудван с клетка AZ 104, в Института по медицинска физика и биофизика на Университета в Лайпциг, Германия, по време на гостуване във връзка с Проект 197 на DFG, част A10 „Организация на липиди и взаимодействия липид-белтък в биологични и моделни мембрани. Измерванията са правени при големина на тока 5 mA и температура 25 °C.

Б Електро-оптични изследвания на еритроцити. Еритроцитите са двойно вдлъбнати дискове. Отношението на диаметъра към средната дебелината на диска е около 4. Поставени във външно хомогенно променливо електрично поле (1 kHz) и ниска йонна сила (изотоничен разтвор на захароза в бидистирирана вода (специфична проводимост < 1.5 μ S/m) те се ориентират вследствие появата на индуциран диполен момент (Stoylov, 1991). Степента на ориентация и динамиката на процеса на дезориентация, след изключване на полето, ние сме проследявали по разсеяната от клетките светлина (дължина на вълната $\lambda = 546, 690$ nm, ъгъл на наблюдение 40°) по относителния електро-оптичен ефект (α):

$$\alpha = \frac{I_E - I_0}{I_0} = \frac{\Delta I}{I_0}$$

I_0 и I_E са интензитетите на разсеяната от диспергираните частици светлина, в отсъствие и след прилагане на външното електрично поле. Релаксационното време на дезориентация се определя със зависимостта:

$$\alpha_t = \alpha_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Където: α_0 - стационарен електро-оптичен ефект, α_t - електро-оптичния ефект, след изключване на полето, τ – е времето на релаксация. $D_r = \frac{1}{6\tau}$, е ротационният дифузионен коефициент на частицата. От този израз диаметърът (B) на клетката може да

се изчисли с: $B = \left(\frac{3kT}{4\eta D_r} \right)^{\frac{1}{3}}$. В случай, че е известен диаметърът, от τ може да се

изчисли вискозитетът (η) на повърхността на частицата (Bäumler, et al, 1988). Уравнението е както следва:

$$\eta = \frac{9 k_B T \tau}{2 B^3} [Pa \cdot s] \text{ за } 25 \text{ }^\circ\text{C: } \eta = 1.851 \times 10^{-20} \frac{\tau}{B^3} \text{ с } B^3 = (6.89 \times 10^{-6} \text{ m})^3$$

$$\eta = 5.669 \times 10^{-5} \tau$$

Ако се знаят диаметърът и вискозитета, може да се прогнозира времето на релаксация:

$$\tau = \frac{2 B^3 \eta}{9 k_B T} [s] \text{ за } 25 \text{ }^\circ\text{C } \tau = 5.40 \times 10^{19} B^3 \eta [s] \text{ и с данните отгоре:}$$

$$\tau = 17641 \times \eta [s]$$

Времето на релаксация се увеличава с намаляване на деформируемостта на еритроцитите с максимална стойност между 28-33 сек (τ_{max}) за клетки от различни донори фиксирани с 1% глутаров алдехид в PBS (Дженев, и съавт. 1987, Dzhennev, et al. 1990). Тъй като при нашите експериментални условия интензитетът на електричното поле е нисък, то RBC не са деформирани и брауновото движение е отговорно за дезориентацията на клетките. Третирането на клетките с GA премахва повърхностните трептения на еритроцитната мембрана. В резултат на това втвърдената повърхност не реагира на брауновата бомбардировка и по този начин значително забавя хаотичното ротационно движение на фиксираните клетки (Jay, et al, 1971, Jay and Canham, 1972) и с това увеличава времето на релаксация след изключване на полето. Тази експериментална находка дава възможност за използване на релаксационното време за количествена оценка на деформируемостта на клетките – като абсолютна стойност, като нормирана ригидност ($\tau_{GA \text{ treated}}/\tau_{control}$) или като скалирана ригидност ($R = (\tau_{GA \text{ treated}} - \tau_{control}) / (\tau_{max} - \tau_{control})$), респ. скалирана деформируемост ($D = 1-R$).

7. Изследване на агрегационното поведение на еритроцити

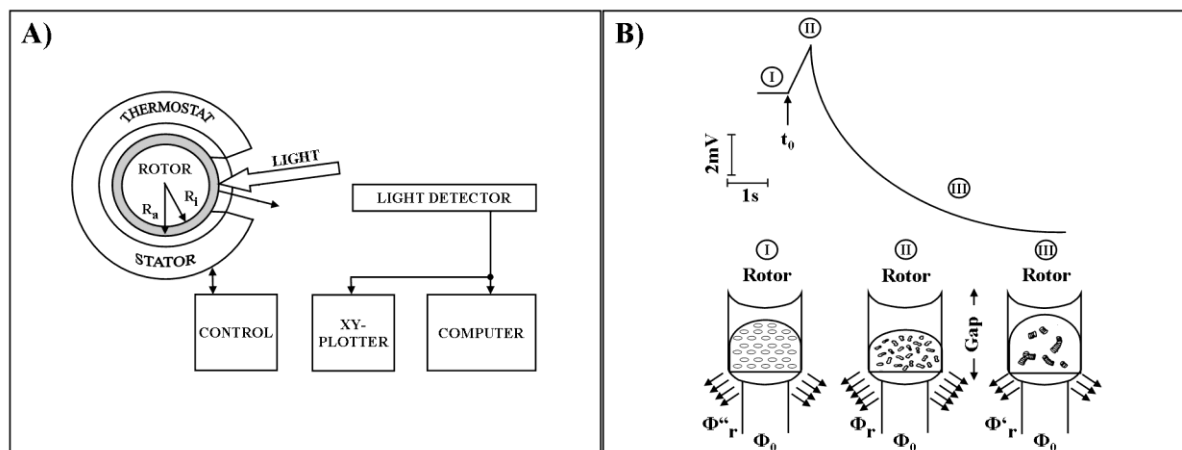
За количествено изследване на агрегацията на еритроцити се използват най-различни методи: микроскопски, седиментационни, центрофугационни, оптични, вискозиметрични, ултразвукови, импедансни. Първоначално използвахме методичната база на колегите в Института по медицинска физика и биофизика на Медицинския

факултет (Charite) на Humboldt University, Berlin, Germany (методът описан в точка А). После разработихме и внедрихме собствена апаратура (дзета седиментационния метод).

А Метод, който базира на отразяването на светлината

Използвана е методика разработена от колегите в Института по медицинска физика и биофизика на Медицинския факултет (Charite) на Humboldt University, Berlin, Germany (Lerche, et al 1983), оригинално развита от Mills et al. (Mills, et al. 1980).

На фиг. 3 са представени схематично апаратурата (А) и принципа на измерване (Б)



Фигура 3. Схема на апаратура (А) и принцип на измерване (Б) в метода за проследяване агрегационното поведение на еритроцити по отразяването на светлината.

В система на Couette ($\Delta R = R_a - R_i = 0.5 \text{ mm}$) се поставя кръвната проба (0.4 ml) и при големи скоростни градиенти ($\gamma > 128 \text{ s}^{-1}$, по правило $\gamma = 600 \text{ s}^{-1}$, в продължение на 5 min) и еритроцитите в нея се дезагрегират (Bäumler, 1988). От външния цилиндър (статор) суспензията се осветява с фотодиод (VQ 110, $\lambda_{\text{max}} = 960 \text{ nm}$, $\Phi_0 = 1058 \text{ mV}$, фиг. 3, А.) Интензитетът на отразената светлина от дезагрегираните, ориентираните и деформираните клетки се регистрира с фотопреобразовател (фаза I, фиг. 3, Б). След бързо спиране на ротора в момента $t = t_0$ интензитетът на разсеяната светлина нараства вследствие на дезориентацията и релаксацията на деформираните и дезагрегирани еритроцити (фаза II, фиг. 3, Б). Започващата сега агрегация на клетките води до намаляване на интензитета на светлинния сигнал (фаза III, фиг. 3, Б). Дигитализираните стойности на интензитета на светлината във времето се описват със следното уравнение:

$$y = Ae^{-at} + Be^{-\beta t} + C$$

В него първата експоненциална функция се определя от формирането на малки линейни агрегати от еритроцити. Вторият член вероятно отразява образуването на големи агрегати, тяхното омрежване и/или преструктуриране в такива с различна геометрична форма. Последният сумант представя интензитета на отразената светлина от агрегатите и останалите отделни клетки в крайното стационарно състояние. За характеризирание на стационарното агрегационно поведение на RBC се използва агрегационният индекс (AI_S), който се изчислява с (Bäumler, et al, 1986; Lerche, et 1984):

$$AI_S = 1 - \frac{c}{A+B+c}$$

Кинетиката на агрегационния процес се описва от времеконстантите α и β и коригираното с вискозитета на средата време за образуване на двойки еритроцити (t_2) (Snabre, et al., 1985):

$$t_2 = t(AI_S = 0.3) \frac{\eta_p}{\eta_{PBS}}$$

т.е. t_2 е времето, за което AI_S достига стойност 0.3. η_p е вискозитетът на средата в присъствие на полимер, респ. плазма, η_{PBS} е вискозитетът на PBS. Всички измервания са правени при $T = 25.0 \pm 0.2$ °C.

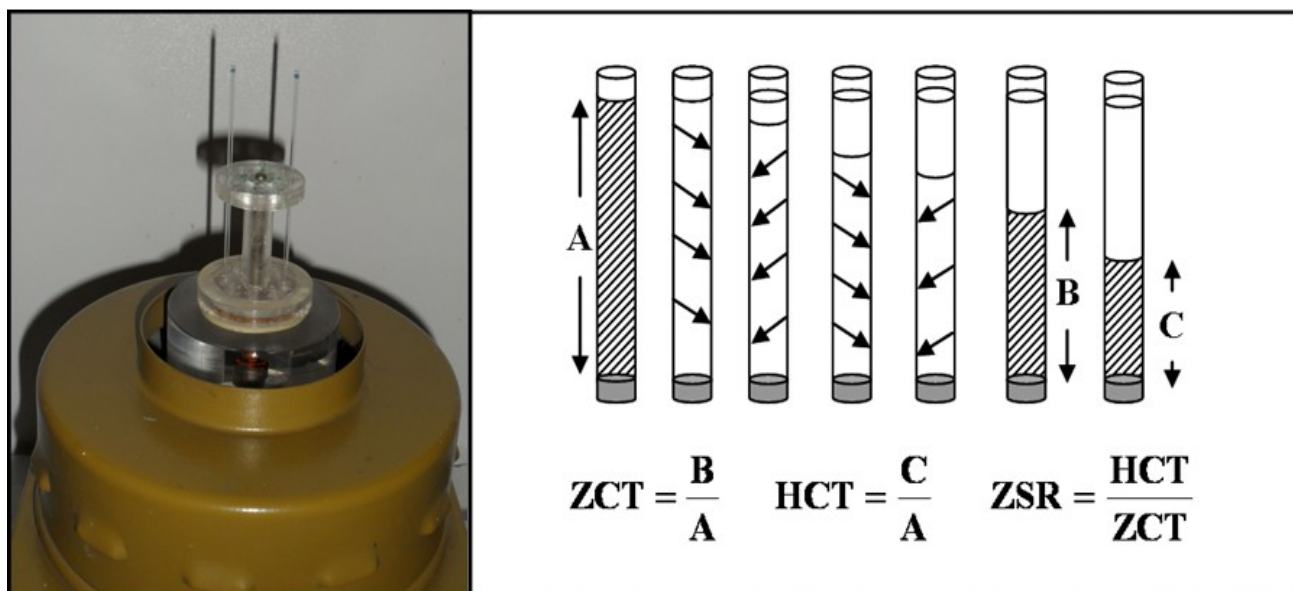
Б Дзета седиментационен метод

Най-отдавна и най-широко в медицинската практика се използват седиментационните методи. Още през 1929 година Робин Фареус (Robin Fåhræus) установява, че основната причина за увеличената скорост на утаяване на еритроцитите (erythrocyte sedimentation rate, ESR) е тяхната агрегация и въвежда този макар и неспецифичен показател в клинично-лабораторните изследвания. Законът на Стокс (Stokes, макар и не съвсем пълно) дава факторите от които тази скорост зависи:

$$v = \frac{2gr^2(\rho - \rho_0)}{9\eta_0}$$

v – скорост на утаяване, g – земното ускорение, r – е радиусът на частицата, ρ и ρ_0 са плътностите на частицата и средата, η_0 - е вискозитетът на средата. Вижда се, че ESR зависи най-силно от големината на частиците. Ако всички частици на дисперсната фаза са еднакви, те се движат с еднаква скорост и между най-горните от тях и суспензионната среда се образува утаителна граница. ESR се измерва като разстоянието, което изминава утаителната граница за единица време [mm/h]. Сериозен недостатък на всички

методични варианти за определяне на ESR е зависимостта на този показател от обемната концентрация на кръвните клетки – хематокрита (HCT). През 1972 година Бул и Брейлсфорд (Bull and Brailsford, 1972) предлагат нов седиментационен метод, който замества ESR с нов параметър за оценка на агрегацията – дзета седиментационно отношение (англ. Zeta sedimentation ratio, ZSR). Апаратът, който те използват наричат дзетафуга. Нашата апаратура (Дженев и съавт. 1991) е ниско технизиран вариант на оригиналната дзетафуга, която тогава вече не се произвеждаше. Ние продължаваме да я използваме и в наши дни. Освен за изследователски цели ние я въведохме и в обучението на студенти от специалности медицина и фармация. Процесът на измерване е следният (виж фиг. 4). Кръвните проби или еритроцитните суспензии се пълнят в стандартни тръбички с дължина 75 mm като се внимава стълбът течност да е непрекъснат и се запушват. Така напълнените тръбички се поставят в статива на апарата вертикално и се маркират от едната страна с водоустойчив маркер. Центрофугират се за 45 секунди с определена скорост на въртене отбелязана на апарата (или определена от асистента). През този период клетките се притискат от силата на центрофугиране (големината и е от порядъка на 7-8 пъти земното ускорение g) към стените на тръбичките и една към друга. Тази сила способства за преодоляване на електростатичното отблъскване между клетките, дължащо се на отрицателните заряди на сиаловата киселина от повърхността на еритроцитната мембрана (една експериментална оценка на този заряд е дзета потенциалът– оттук



Фигура 4. Определяне агрегацията на еритроцити с дзета седиментационния метод (за обяснения виж текста)

и името “дзета седиментационно отношение”), така благоприятства образуването на агрегати. След спирането тръбичките се завъртат на 180° около вертикалната ос кръвните проби се центрофугират наново. В зависимост от големината на агрегиращите RBC сили по време на този период агрегатите първоначално се разрушават после наново се формират при притискането на клетките към стената. Неразрушените агрегати се окрупняват и с това ускоряват утаяването на клетките. Това се повтаря до общо 4 цикъла на въртене. Определя се обемната концентрация на еритроцитите, т.н. дзетакрит (ZCT, фиг. 4) – т.е. обемът до който са опаковани и утаени клетките (измерван чрез височината на стълба клетъчна утайка в тръбичката – В) към общия обем на кръвната суспензия (измерван чрез височината на стълба суспензия (А). Тръбичките се изваждат от статива на апарата и се поставят в стандартна хематокритна центрофуга. Центрофугират се при 10 000 g за 5 min и се определя хематокрита (C/A). Стойността на хематокрита към дзетакрита се определя като дзета седиментационно съотношение (ZSR). Дзетакритът зависи от степента на утаяване на кръвните елементи. Кръвни проби, които агрегират бързо имат и висока скорост на утаяване и дават ниски стойности на дзетакрита и оттам висок агрегационен индекс – ZSR. Обратно, неагрегиращите кръвни проби имат ниски нива на утаяване и поради това висок дзетакрит и ниско дзета седиментационно съотношение.

Глава 4. Анализ и обсъждане на резултатите

I Оценка на възможностите на въведения от нас метод на дзета седиментация

В рамките на нашите изследвания върху реологичните свойства на кръвта в периода 1984 – 1989 се появи необходимостта от разширяване областта на проучванията ни с тематиката на агрегационното поведение на еритроцити. В тогавашните условия не бе възможно да се получат сериозни финансови средства за закупуването на модерна апаратура. Наложихме се сами да разработим методика, като използваме чужд опит. Резултатът бе апаратурата, която ползваме и до днес (Дженев и съавт. 1991). Най-напред апробирахме възможностите на нашата методика за количествена оценка на агрегацията на еритроцити в моделни условия и я сравнихме с данни, които са получени с други методи (Jovtchev, et al, 1996). За агрегиращ агент основно в работата е използван декстран с молекулна маса 70000 (Dx 70K). Тествани са и други полимери - Dx 500K, PEG 20K, 35K, 200K – за оценка на техния потенциал като агрегиращи агенти (Jovtchev, et al 2009). Направени са сравнения с агрегационните сила на фибриноген на кръвната плазма и декстрана (Jovtchev, et al, 1996). Проверени са възможностите на намаляване на йонната сила на средата за предотвратяване на полимер индуцираната агрегация (Шиева, et al. 2003, Jovtchev, et al 2009). Проведени са изследвания върху ролята на различни клетъчни характеристики за процеса на агрегация на еритроцитите – повърхностния електричен заряд, деформируемостта на клетките (Jovtchev, et al. 2000), структурата на техния гликокаликс (Jovtchev, 2008).

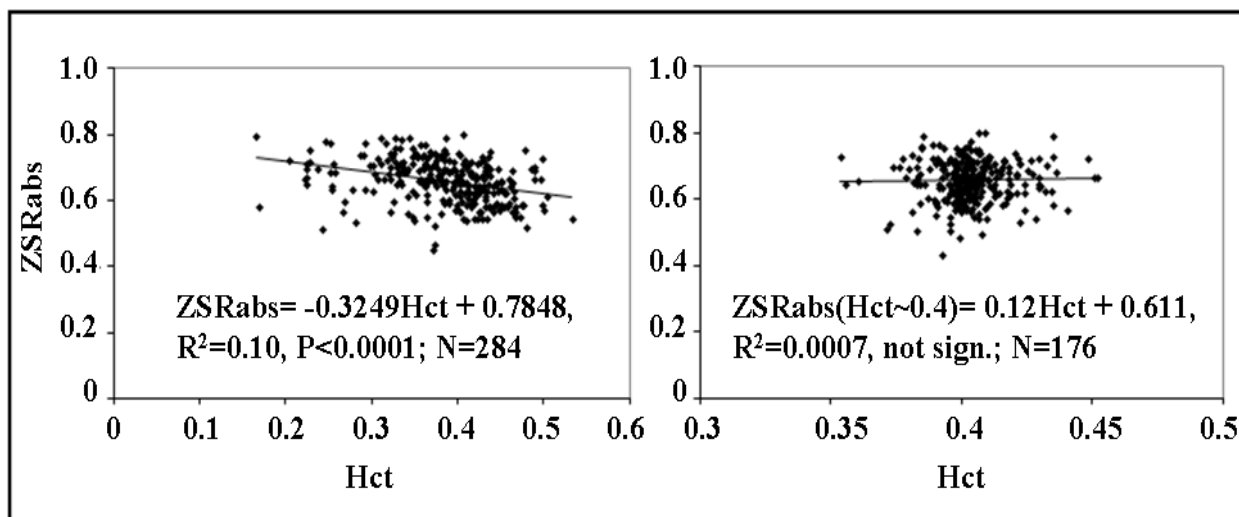
1. Характеристики на метода:

A Измервания в цялостна кръв

Оригиналният агрегационен индекс, който авторите на метода въвеждат е дзета седиментационното отношение (ZSR). Коефициентът на вариация (CV) от 12 измервания за кръвна проба от един индивид, в рамките на 2 часа след взимане (оценява методичната прецизност) е около 2%. За сравнение, една от най-новите методики за оценка на агрегацията, предложена 2011 година, предлага 14 различни агрегационни индекси, от които 2 са с инструментална прецизност около 1%, четири – около 2%, останалите варират между 3 и 9% (Baskurt et al. 2011). В рамките на 8 часа CV - е от порядъка на 5%, което е сравнимо с възможностите на оригиналната методика (Bull and Brailsford, 1972).

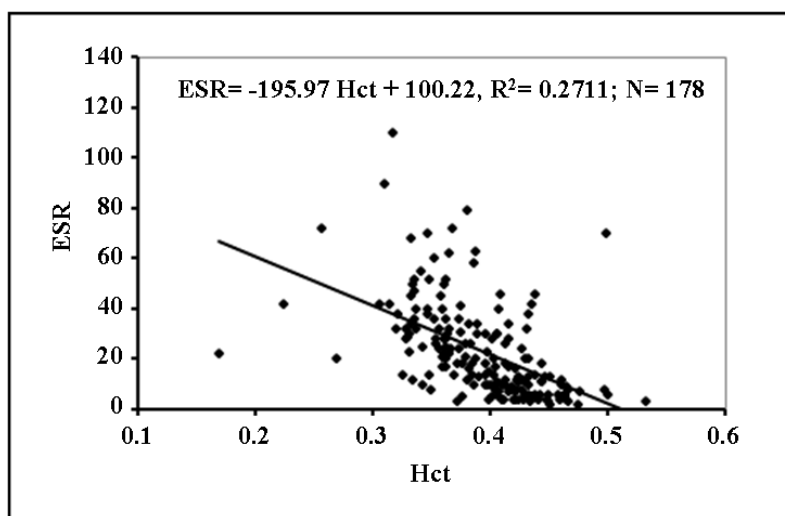
Биологичният коефициент на вариация на ZSR за четирикратно измерени оригинални кръвни проби от 61 здрави индивиди е 8.2 %. За същите проби скоростта на утаяване на еритроцити (ESR), методът използван рутинно в клиничните лаборатории и до днес, CV е около 60%. За сравнение, този коефициент за един от широко използваните

агрегатометри в миналото и сега на фирмата Myenne е 10-12% (Meiselman 1993). При горе споменатия метод предложен от Baskurt и съавтори – само един е с CV - 6.5%. Останалите варират от 11 до над 100%. Тъй като обемната концентрация на клетки в кръвта (хематокрит, Hct) влияе на агрегацията и стойностите на параметрите, които я описват количествено, ние тествахме тази зависимост.



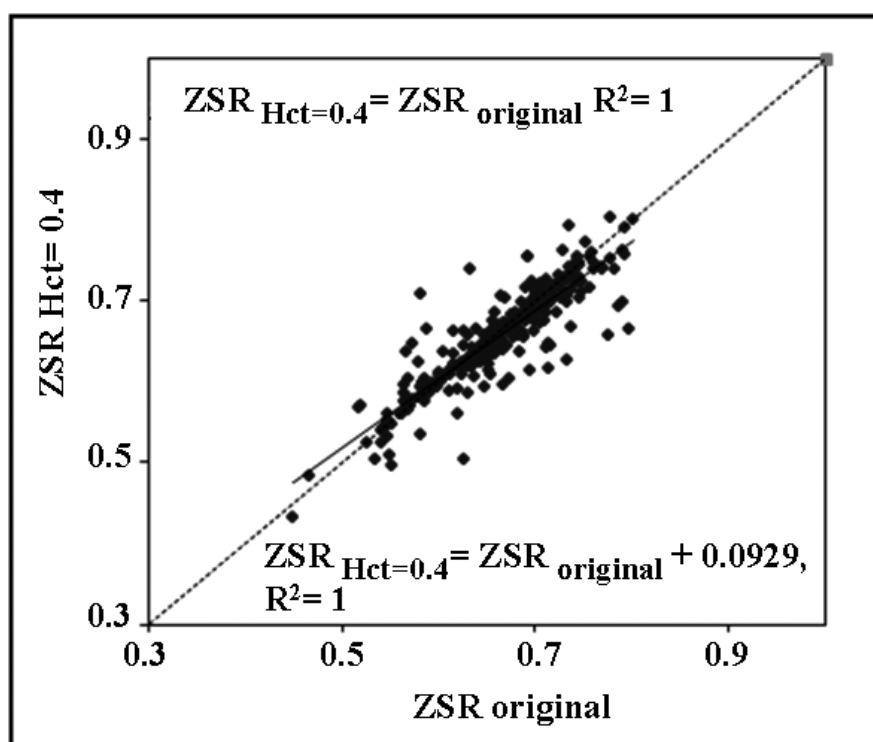
Фигура 5. Зависимост на ZSR от хематокрита. Лявата графика е за оригиналните кръвни проби, дясната е за същите проби след коригиране на хематокрита (Hct) на стойност около 0.40 ± 0.05 .

Корелационната зависимост е много слаба ($R^2 = 0.1$), но статистически достоверна ($P < 0.0001$). След корекцията за хематокрит в областта между 0.35 – 0.45 тази взаимовръзка става недостоверна. За сравнение, за ESR тази зависимост е доста по-силна (фиг. 6) $R^2 = 0.27$, а наклонът доста по-стръмен.



Фигура 6. Показана е корелационната връзка между ESR на оригиналните проби от хематокрита (Hct).

Тези резултати показват предимствата на нашата методика спрямо рутинно използваната в клиничните лаборатории.



Фигура 7. Корелационна зависимост на ZSR на оригиналните проби с тези коригирани за хематокрит (N=280).

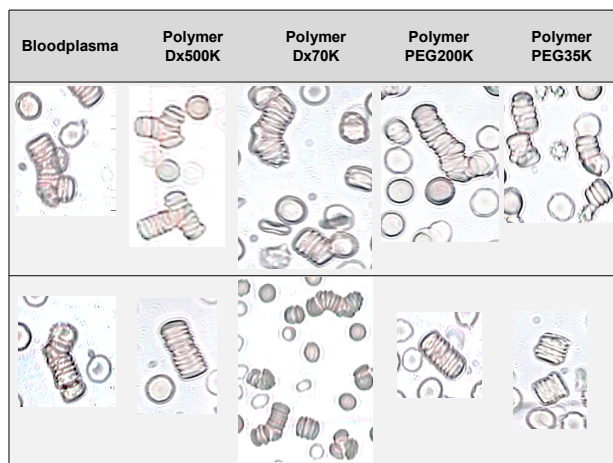
Корелационната зависимост между стойностите ZSR без и с корекция за Hct е много достоверна ($R = 0.79$, $P=0.0001$) а наклонът от 0.85 е близо до идентичността. Въз основа на това оригинални проби, които са влизали в тази област ($Hct = 0.35 - 0.45$) не сме ги коригирали за Hct.

Б Измервания в среди с декстран

Основната част от резултатите, представени в тази работа, са от изследвания на агрегационното поведение на еритроцитите, суспендирани в разтвори на неутрални полимери – декстран и полиетилен гликол. Избрани са, поради ред причини. Първо, защото агрегатите от човешки еритроцити, получени с тях, са много близки по вид и устойчивост до тези наблюдавани в цялостна кръв (Фиг. 3). Ето защо, техни разтвори се използват като стандартизирани среди за агрегация на еритроцити с цел да се удостовери ролята на клетъчните фактори за агрегационния процес, т.н. „агрегируемост“ (aggregability) (Başkurt, et al. 2000, Başkurt and Meiselman, 2009). Второ, намират редица приложения в биотехнологичен план: PEG се използва от десетилетия за сливане на липозоми и клетки; за създаване на неимуногенни покрития върху изкуствени

(трансплантанти) и природни материали („stelth” липозоми, „stelth” еритроцити. Декстран и полиетилен гликол се използват като добавки към разтвори, заместители на кръвна плазма, или в разтвори, които се използват за съхранение на органи, преди трансплантация. Натрупаният експериментален материал е огромен по количество и дава възможност за сравняване на новосъздадени методики за оценка на агрегационното поведение на еритроцити с досега съществуващи апарати и методи (Baskurt et al. 2009b). Така можем да сравним нашият метод и резултатите, получени чрез него с етаблирани вече апарати.

Най-често използваният полимер е декстран с молекулна маса 70000 (Dx70K), защото агрегатите от човешки еритроцити, получени с него, са много близки по вид до тези наблюдавани в цялостна кръв (Фиг. 8). На микроскопските фотографии в следващата фигура са представени типични агрегати от човешки еритроцити в различни среди. Вижда се типичният начин на свързване – с плоските страни. Трябва да се обърне внимание и на факта, че контура на крайните клетки в агрегатите, индуцирани от различните полимери имат различни кривини. Това обстоятелство е използвано от някои изследователски екипи за оценка на механичната деформация, която предизвиква агрегационните сили на агентите. От нея те изчисляват енергията на взаимодействие между клетките (Chien et al. 1983, 1987).



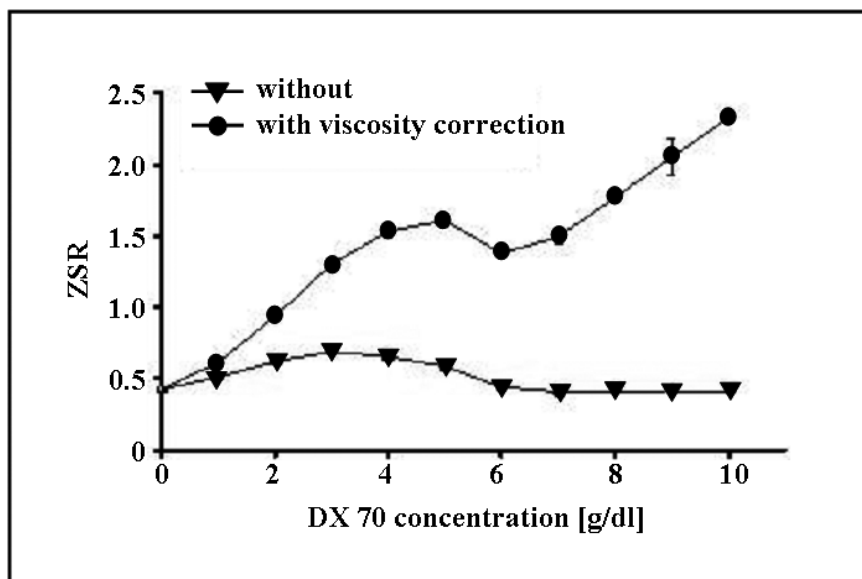
Фигура 8. Микроскопски снимки на агрегати от човешки еритроцити в кръвна плазма и в различни полимери: Dx 500K – 1 g/dl, Dx 70K – 3g/dl, PEG 200K – 0.5 g/dl, PEG 35K – 0.5 g/dl.

Когато концентрацията на полимери в суспензионната среда се варира в широки граници силно се променя вискозитетът на разтвора. Законът на Стокс (Stokes) дава факторите от които тази скорост седиментация зависи:

$$v = \frac{2gr^2(\rho - \rho_0)}{9\eta_0}$$

v – скорост на утаяване, g – земното ускорение, r – е радиусът на частицата, ρ и ρ_0 са плътностите на частицата и средата, η_0 - е вискозитетът на средата.

Тъй като скоростта на утаяване зависи обратно пропорционално от вискозитета на средата, предлага се агрегационните индекси, базирани на седиментационни методи, да се коригират за вискозитета на средата (Dintenfass, 1976). На следващата графика (Фиг. 9) е представена зависимостта на ZSR без и с корекцията за вискозитет за Dx70K.



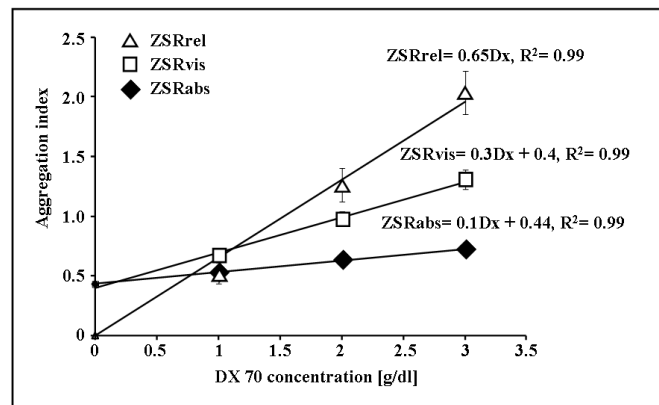
Фигура 9. Зависимост на ZSR от концентрацията на Dx70K – без (долната крива) и със корекция за вискозитет (горната крива).

За ZSR без корекция за вискозитета на средата се наблюдава позната от литературата камбановидна крива с максимум около 3 g/dl и липса на агрегация над 6 g/dl (Shien et al. 1973). Вижда се, че корекцията за вискозитет на ZSR (горната крива) дава подвеждаща информация за агрегацията на еритроцитите. В съгласие с нашата констатация са данни за друг полимер HES (хидрокси етил нишесте) получени с оригиналната апаратура (Corry et al. 1983). Затова по-нататък в нашите изследвания, корекция за вискозитета е правена само за концентрации на полимери до максимума на кривата.

При количествената оценка на степента на агрегация е прието, стойностите на агрегационните индекси да се отнасят към условия, където агрегация не се осъществява, например когато клетките са суспендирани във буфериран физиологичен разтвор (PBS). Затова ние винаги сме изследвали нашите кръвни проби в присъствие на полимери съпроводени от една суспензия от клетки в PBS. Това дава възможност да се формулират нови агрегационни индекси с корекции за вискозитет, за хематокрит и сравнени със стойностите на ZSR във PBS:

- $ZSR_{vis\ corr} = \eta_{medium} \times ZSR$, където η_{medium} – вискозитет на средата, която може да е кръвна плазма или PBS, който съдържа различни полимери
- $ZSR_{0.40}$
- $ZSR_{rel} = \frac{ZSR}{ZSR_{PBS}}$
- $ZSR_{rel}^{vis\ corr} = \frac{\eta_{medium}}{\eta_{PBS}} \frac{ZSR}{ZSR_{PBS}}$

Агрегацията на еритроцити в среди с полимери сме изследвали при хематокрит 0.40. Затова в символизирането на индекса по-нататък ще пропускаме означението за хематокрита. На следващата графика (фиг. 10) са представени някои от тези параметри в зависимост от концентрацията на Dx 70K. CV за тях са представени в табл. 1. Коефициентът на биологична вариация за здрави индивиди не надхвърля 14% при нито един от параметрите. За сравнение, този коефициент за един от широко използваните агрегатометри в миналото и сега, на фирмата Murene, е 20-25% (Meiselman, 1993).



Фигура 10. Зависимост на някои от агрегационните индекси от концентрацията на Dx70K в линейната област за здрави индивиди (N=59)

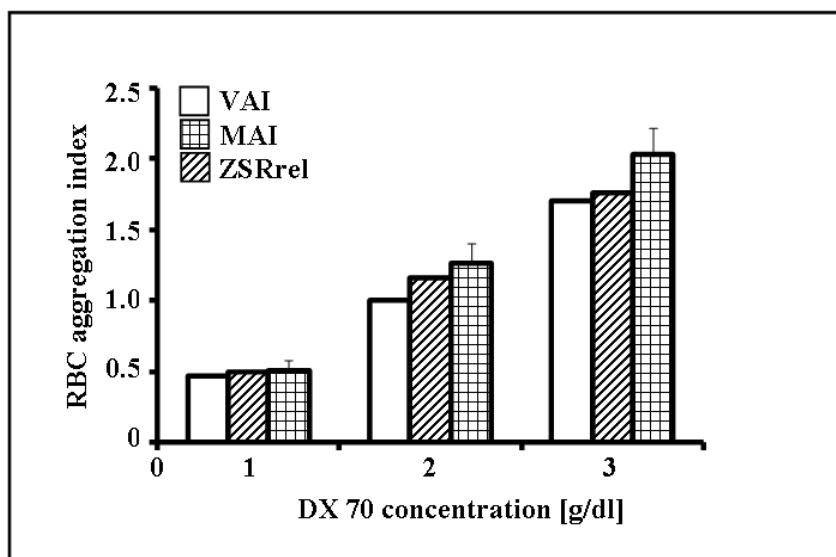
В случаите когато агрегационното поведение е изследвано в областта на линейно увеличение на агрегацията при няколко концентрации на полимера, тогава за агрегационен индекс (*AI*) може да се вземе наклона на правата от линейната регресия за всеки един от дефинираните по-горе параметри. Той ще отразява изменението на агрегационния параметър за единица концентрация на полимера. И при наклоните на регресионните прави за представените агрегационни индекси CV не надвишава 16%, най малък е този за ZSR_{rel} – 8.3%. *AI* може да се класифицират и според вида и агрегационния потенциал на полимера – малък или голям.

Табл. 1. Средни стойности, стандартно отклонение и коефициентите на биологична вариация за здрави индивиди на дефинираните от нас агрегационни параметри (N=59) в модела на Dx70K индуцирана агрегация.

	0	1	2	3
	ZSRabs	ZSRabs	ZSRabs	ZSRabs
Mean	0.431	0.533	0.650	0.712
SD	0.014	0.028	0.037	0.042
CV [%]	3.3	5.3	5.7	5.9
	ZSRvis	ZSRvis	ZSRvis	ZSRvis
Mean	0.431	0.650	0.976	1.308
SD	0.014	0.034	0.062	0.083
CV [%]	3.3	5.3	6.3	6.3
	ZSRrel	ZSRrel	ZSRrel	ZSRrel
Mean	0	0.509	1.265	2.033
SD	0	0.071	0.139	0.181
CV [%]		13.9	11.0	8.9

На следващата графика (Фиг. 11) е направена съпоставка на **ZSRrel** за използвания от нас модел на полимерно индуцирана агрегация с Dx70K с други популярни методики за оценка на еритроцитната агрегация – микроскопския (Chien, 1976) и вискометричния (Brooks et al. 1974) по литературни данни. Агрегационният индекс за първия се означава като MAI, където се броя клетъчните единици (агрегати и отделни клетки) в кръвната проба с агрегиращ агент и се отнасят към броят им в неагрегираща среда – напр. PBS. При втория, означен от нас като VAI, се съпоставя вискозитетът на суспензията от еритроцити, определен при ниски градиенти на скоростта (наличие на агрегация), към този измерен при градиенти, които са разрушили агрегатите (напр. 200 s^{-1}). На фигурата се забелязва доброто съвпадение на получените резултати с трите метода. При добавяне на едно и също количество агрегиращ агент, относителната промяната в стойностите на агрегационните индекси спрямо условия без наличието на агрегати са много близки. Това говори за еднаква чувствителност спрямо изследваното агрегиращо вещество.

От изложените данни може в резюме да се каже, че нашият вариант на дзета седиментационния метод по своите характеристики е сравним с оригиналния и с други прилагани в миналото и сега методики за изследване на агрегационното поведение на еритроцити.



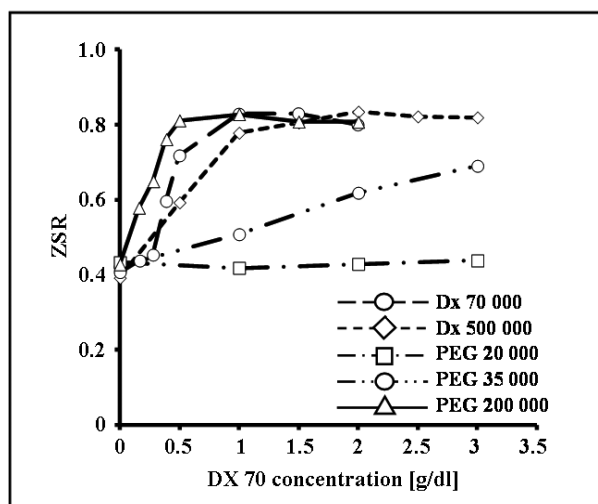
Фигура 11. Съпоставка на чувствителността на ZSR_{rel} с микроскопския (MAI) и вискометричния (VAI) за предизвиканата от Dx70K агрегация на човешки еритроцити в линейната област (здравни индивиди, N=59)

2. Моделни експерименти

А Изследвания върху ролята на външни фактори

а Изследвания върху агрегационния потенциал на други полимери

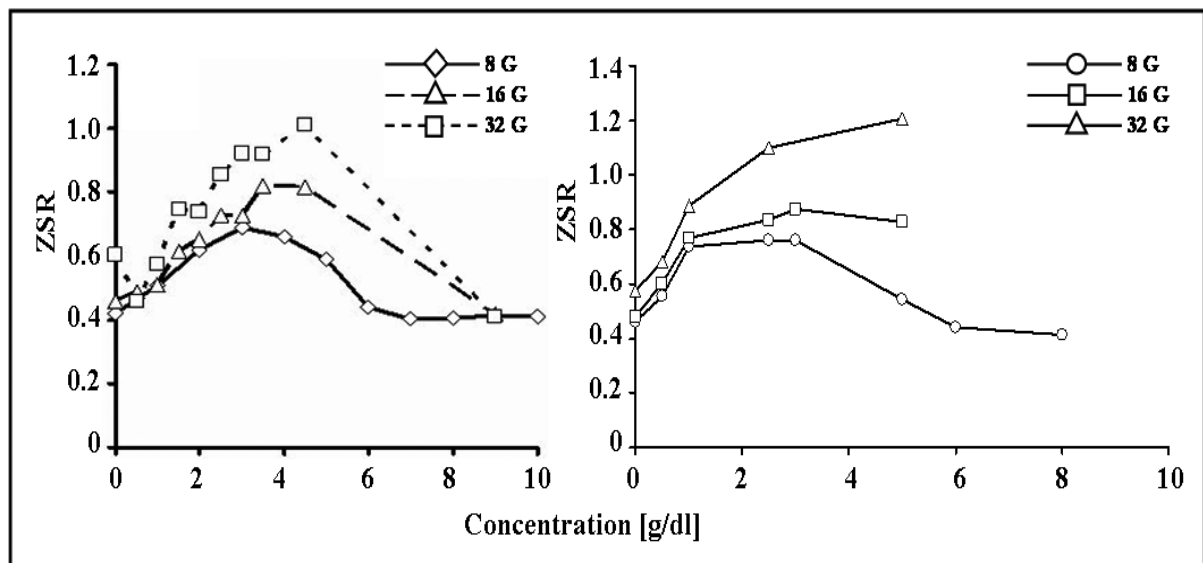
За да разширим спектъра от възможности за оценка на способността на еритроцитите да агрегират, т.н. агрегируемост (aggregability) ние продължихме нашите изследвания с включването на други полимери в моделните среди – декстран 500000 (Dx500K), полиетилен гликол 20000, 35000, 200000 (PEG 20K, PEG35K, PEG200K). Първо проследихме зависимостта на ZSR от концентрацията на полимера. На следващата (фиг. 12) са представени тези резултати. В областта от изследваните концентрации (0 – 3 g/dl)



Фиг. 12. Зависимост на ZSR от концентрацията на полимери от различен вид.

Вижда се, че агрегационният потенциал на полимерите е различен. PEG 20K при тези условия на механично притискане на клетки (8 G) няма агрегираща способност в посочения концентрационен интервал (0-3 g/dl). В рамките на един химичен вид полимер индуцираната агрегация се увеличава с молекулната маса. От двата вида полимери PEG е по мощният агрегиращ агент. Ако съпоставим концентрацията на полимери, която съответства на стойността на ZSR за здрави хора в плазма (0.614 ± 0.05) получаваме следната последователност: PEG 200K - около 0.3 g/dl, PEG 35K – около 0.4 g/dl, за Dx 500K – около 0.5 g/dl и Dx 70K – около 2 g/dl. Това може да се използва като оценка на агрегационния потенциал в контекста на описание на агрегируемостта на еритроцитите. Тези наши резултати съвпадат с литературата от миналото (Chien and Jan, 1973, Chien, S. 1975) и настоящето (Armstrong, 2004, Baskurt et al. 2011b). Кои са молекулните характеристики, които определят този агрегационен потенциал е все още дискуссионен въпрос. Съществуват данни, които внушават, че хидродинамичният радиус на молекулата е от решаващо значение (Armstrong, 2004, Baskurt et al. 2011).

б Роля на механичното притискане за агрегационното поведение на еритроцитите

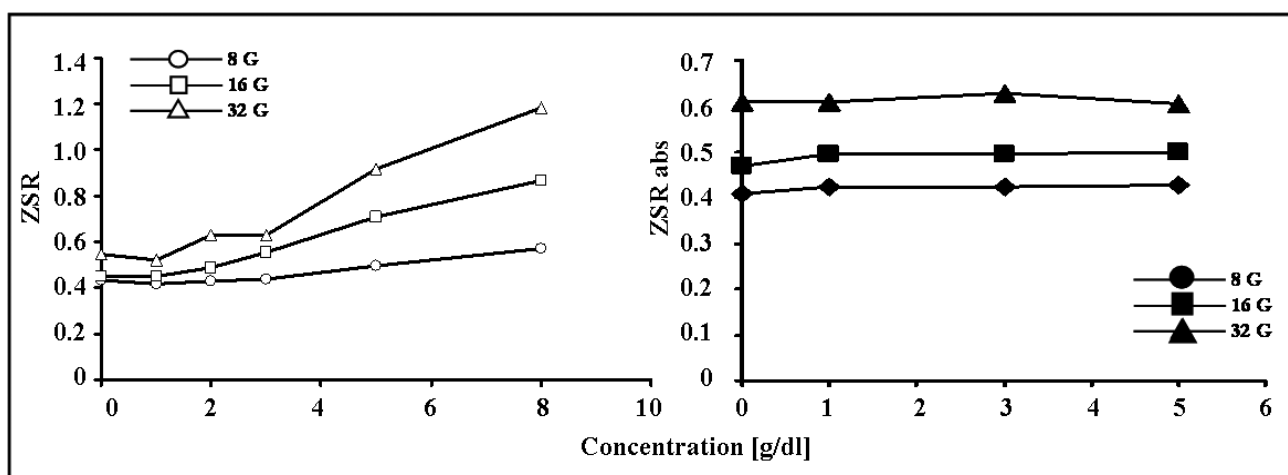


Фигура 13. Зависимост на агрегационния индекс за еритроцити от концентрацията на DX 70K и DX 500K при различни сили на притискане на клетките към стената на капилярката.

Фигура 13 показва зависимостта на еритроцитния агрегационен индекс от концентрацията на DX 70 и DX 500 при различни сили на притискане на клетките към стената на капилярката. При сили от порядъка на 8g (която се използва в оригиналната методика) за двете молекулни маси на полимера кривата е с камбановидна форма. До около 3-4 g/dl агрегационният индекс расте, след това намалява до пълно отсъствие на

агрегация. Декстранът с по-голямата молекулна маса предизвиква даваТъй като това са двете молекулни маси на декстран, които се използват най-масово в агрегационни експерименти с еритроцити, всеки един метод се тества при тези стандартизирани условия. Нашите резултати напълно съвпадат с тези получени с други методики – много по скъпи или много по трудоемки (Shien, 1987, Neu, et al., 2002, 2008).

Увеличаване на силата на притискане между клетките води до нарастване на агрегацията. Това може да се използва за изследване на клетки, които трудно агрегират, или да се постигне агрегация с полимери, които при обикновени условия нямат такова действие. В следващата фигура (фиг. 14) са представени резултати за PEG 20K и албумин. Вижда се, че засилване на притискането между еритроцитите води до измерима агрегация на клетките, но при по-високи концентрации от тези, използвани при другите мономери. Досега се смяташе, че PEG 20K няма агрегационна способност в случая на нативни еритроцити. Следователно нашия резултат може да се третира като оригинална експериментална находка. Това обаче не е така за албумина (Фиг. 14, дясната графика), който в рамките на условията на експеримента не предизвиква агрегация.



Фиг. 14. Зависимост на агрегационния индекс за еритроцити в среди с PEG 20K (лявата графика) и албумин (дясната) при различни сили на притискане на клетките към стената на тръбичката.

Всъщност албуминът е известен по-скоро като белтък, който намалява агрегацията на еритроцити в среди с други агрегиращи агенти. Така че нашите резултати за условия на притискане 8G са напълно очаквани (Armstrong, 2004). Причината за това, че PEG 20K има агрегиращо действие, а албуминът – не, може би е разликата в размера на хидродинамичния им радиус. За PEG 20K той 4.01 nm, а за албумина 2.05 nm. Смята се,

че критичния радиус за предизвикване на агрегация на еритроцити е 4 nm (Armstrong, 2004).

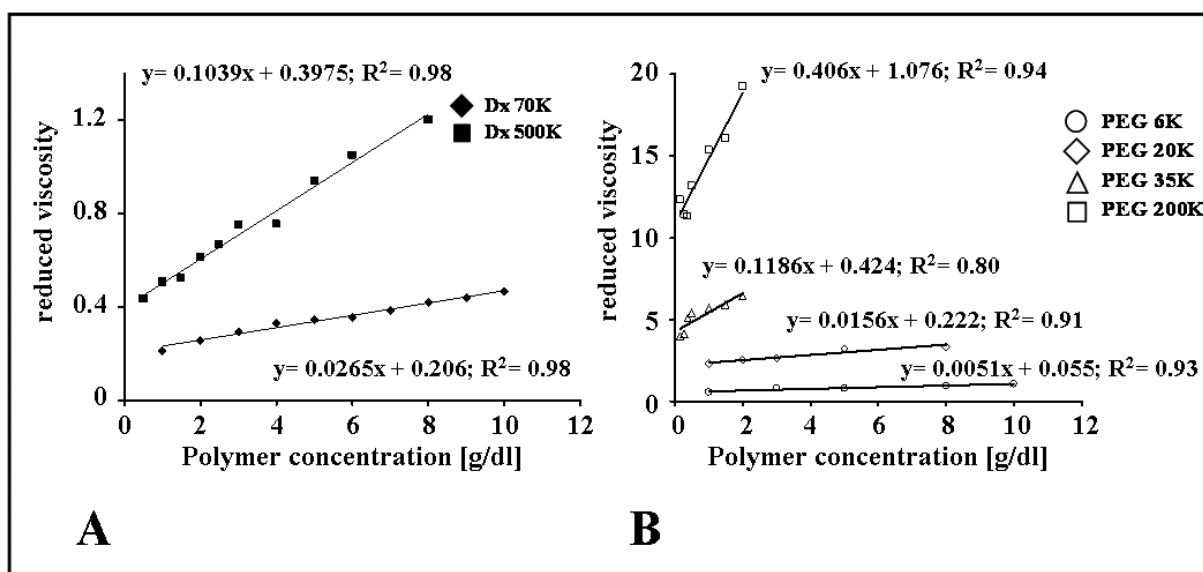
В PBS, който съдържа различно количество автоложна плазма, коригираните за вискозитета на средата стойности на ZSRabs и ZSRrel показват линейна зависимост от концентрацията на фибриногена (CFg, g/dl):

$$ZSR_{vis} = 1.843CFg + .464 \quad (r^2 = .994) \text{ and}$$

$$ZSR_{rel} = 3.60 \times CFg .$$

Ако вземем средната стойност за концентрацията на Fg в плазмата на здрави индивиди – 0.3 g/dl, то агрегационният му потенциал ще от порядъка на този за PEG 200K.

Следвайки тази теза ние определихме вискозиметрично размера на използваните от нас молекули. На фигура 15 са показани резултатите от вискозиметричното характеризиране на използваните от нас полимери. Граничният вискозитет се получава за концентрации на полимерите клонящи към 0. С него сме изчислявали след това хидродинамичните радиуси.



Фигура 15. Зависимост на редуцирания вискозитет от концентрацията на полимери с различна молекулна маса: А – декстран, В – полиетилен гликол.

На графиките са представени и резултатите от линейната регресия съгласно уравнението на Хагинс (Huggins), с която са определяни граничните вискозитети за отделните молекули. От получените стойности за $[\eta]$ сме определяли хидродинамичния радиус на молекулите. Те са представени в таблица 2.

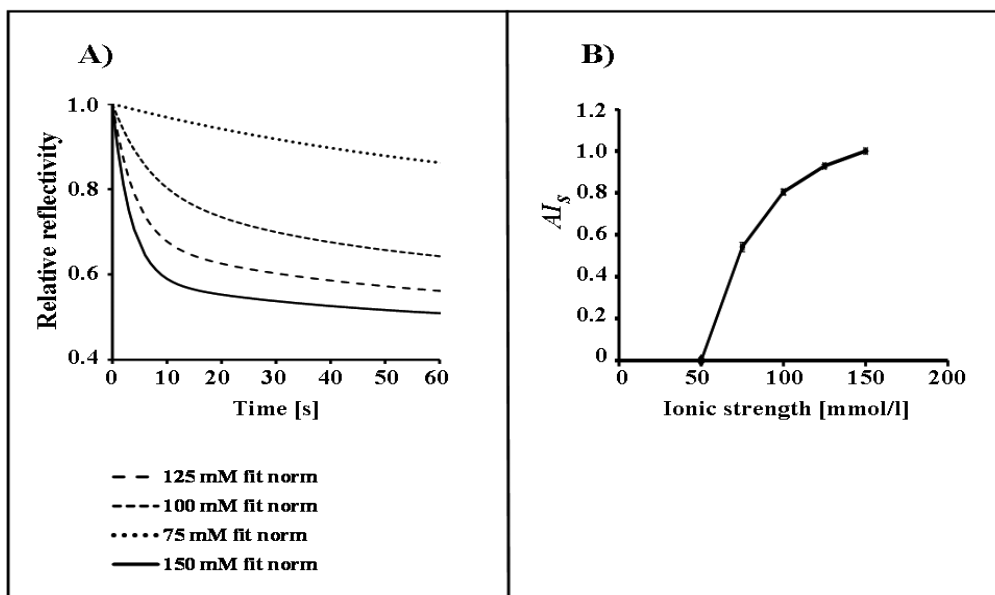
Таблица 2. Експериментално определеният граничен вискозитет $[\eta]$ и хидродинамичният радиус на молекулата на изследваните полимерите в PBS.

Вид на полимера	Характеристичен Вискозитет $[\eta]$ ml/g	Хидродинамичен Радиус R_H nm
Dx 70K	20.5	6.1
Dx 500K	39.8	14.7
PEG 6K	5.5	1.7
PEG 20K	22.2	4.1
PEG 35K	42.4	6.2
PEG 200K	107.6	15.1
Човешки албумин	0.82	2.05

Получените от нас резултати са в добро съответствие с данни от литературата (Armstrong, et al, 2004; van Oss, C.J., 2008, pp. 224). Молекулите на PEG имат сравними геометрични размери с тези на декстрана (PEG 35K и Dx 70K, както и PEG 200K и Dx 500K) при доста по-малки молекулни маси. Това означава, че хидратираните вериги на този полимер, ще заемат по-големи обеми от пространството в сравнение с тези на декстрана при еднаква молекулна маса. Това е от значение не само за хидродинамиката на техните разтвори, но и за осмотичните им свойства, а с това и за взаимодействията им с колоидни частици (напр. липозоми) и клетки. Armstrong и съавт. (Armstrong et al. 2004) са сравнявали вискозиметрично определяните размери на молекулите с данни от квази-еластично разсейване на светлината. Връзка на двойките стойности дава корелационен коефициент от порядъка на 0.96, което е много добър показател. Като се има предвид, че капилярните вискозиметри използвани от нас и Armstrong и съавт., са значително поевтини от апаратурата за квази-елестично разсейване на светлина, приложеният подход за количествено описание на свойствата на полимерите има сериозни възможности за приложение в медицинската практика.

в Влияние на йонната сила на средата върху агрегацията на еритроцити

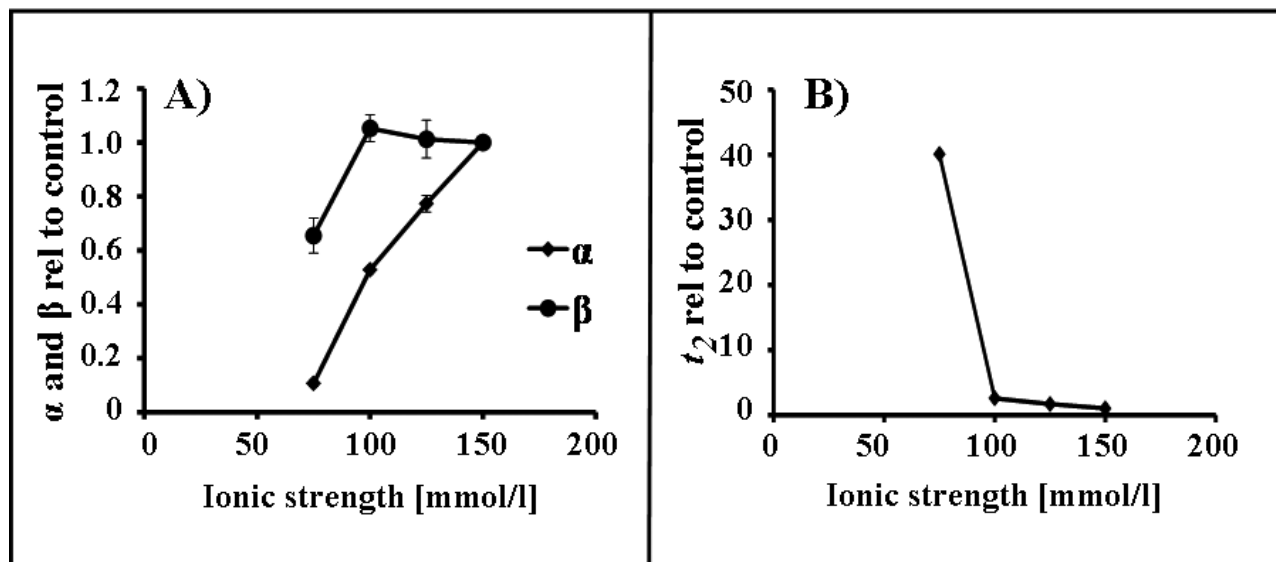
Досега представяхме влиянието на външни проагрегиращи компоненти в баланса на силите на взаимодействие между еритроцитите. Тук показваме ролята на един дезагрегиращ фактор – намаляването на йонната сила на средата.



Фигура 16. Изследване агрегацията на еритроцити с метода, на отразяване на светлината. А Изменение на рефлектиралата светлина с времето след спиране на ротора в кюветата; пример за една определена кръвна проба. В – намаляване на агрегацията на еритроцити (оценена със стационарния агрегационен индекс AI_s (нормиран със стойността в нормална йонна сила) понижаване на йонната сила на средата; усреднени стойности от 6 различни кръвни проби. Агрегиращ агент е Dх 70К, 3 g/dl. Разликите са статистически достоверни, $P < 0.05$.

На фиг. 16А се вижда, че интензитетът на отразената светлина намалява най-много и най-бързо в средата с най-високата йонна сила. Тъй като там електростатичното отблъскване между клетките е най-слабо, то стационарното ниво на агрегация в суспензиите трябва да е най-високо. Това се доказва от данните на фиг. В, където е представен стационарният агрегационен индекс AI_s , изчислен от времевите зависимости на отразената светлина. Стойностите му намаляват почти наполовина за йонна сила 75 mmol/l. При 50 mmol/l еритроцитите не показват видима агрегация – тъй като интензитетът на отразената светлина достига бързо максималната стойност (отговаряща на дезагрегирани, дезориентирани и недоформирани клетки, фаза I от схемата на фиг. 1) и после не се променя във времето. Кинетичните индекси, които описват агрегационното поведение на клетките са представени на фигурата отдолу.

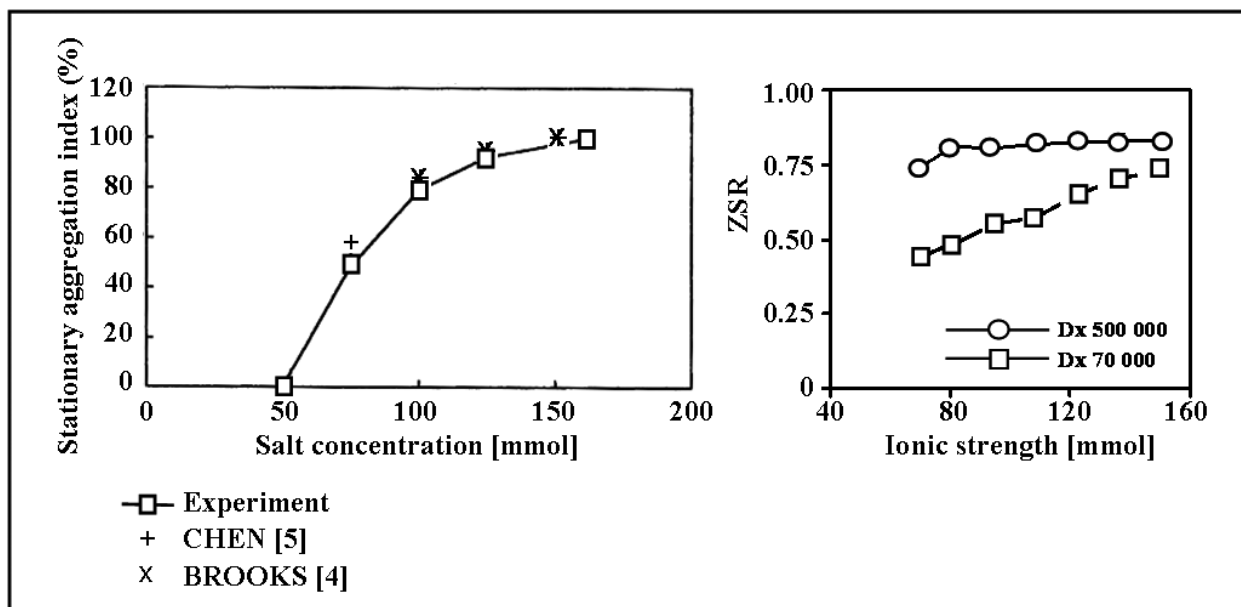
Вижда се ясно, забавянето на процеса на агрегация на клетките. Времеkonстантите за образуването, както на малки, така и на големи агрегати, намаляват спрямо контролните суспензии. Най-чувствителен индикатор на това забавяне е времето за образуване на двойки еритроцити - t_2 . Това се подчертава и от авторите на оригиналната методика (Mills, et al., 1980).



Фигура 17. Кинетични агрегационни индекси получени с метода на отразената светлина от суспензиите на еритроцити в среди с различна йонна сила. А: α – експонентният показател, отразяващ образуването на малки агрегати; β – експонентният показател, отразяващ образуването на големи агрегати; В - t_2 е времето, за което AI_S достига стойност 0.3. Усреднени стойности от 6 различни кръвни проби. Агрегиращ агент е Dх 70К, 3 g/dl. Разликите са статистически достоверни, $P < 0.05$.

На следващата фиг. 18, графика вляво, са сравнени резултатите, получени от нас с метода на отразената светлина, и данни от литературата за същия агрегиращ агент (Dх 70К), и концентрация 3 g/dl. Наблюдава се намаляване на стойностите на агрегационните индекси и за трите метода, с идентична чувствителност към промените в йонната сила. Много добро съвпадение на кривата за рефрактометричния метод (Берлин) и ZSR показва съпоставянето на резултатите за Dх 70К (фиг. графиката вляво) - при около 50 mmol/l клетките вече не агрегират. Подобни резултати са публикувани и в по-ново време (Pribush, et al. 2007; Neu, et al 2003). При 1 g/dl Dх 500К йонната сила почти не влияе на предизвиканата от него агрегация до концентрации 70 mmol/l. Този резултат навежда на идеята агрегационният потенциал на полимерите да се оценява и на базата обратимост, предизвикана от йонната сила. В случаи, където дадена методика губи чувствителността си за промени в степента на агрегация (каквото пример е дзета

седиментационният метод в условия, които предпоставят много мощен агрегационен потенциал в суспензията) зависимостта от йонната сила може да хвърли допълнителна светлина във връзка с агрегационното поведение на клетките и вида на полимера (химичен вид, молекулна маса и др.). Вижда се ясно от фигурата отдолу (графиката вдясно), че агрегационният потенциал на 1 g/dl D_x 500K е значително по-голям от този на 3 g/dl D_x 70K при ниска йонна сила, отколкото при физиологична.



Фигура 18. Агрегационният индекс за еритроцити в среди с различна йонна сила на средата: лява графика – стационарен агрегационен индекс, получен с рефрактометричен метод Берлин, сравнен с данни на Brooks, et al, 1974 и Chien et al, 1976; 3 g/dl D_x 70K; дясна графика, ZSR за 3 g/dl D_x 70K и 1 g/dl D_x 500K при различни йонни сили.

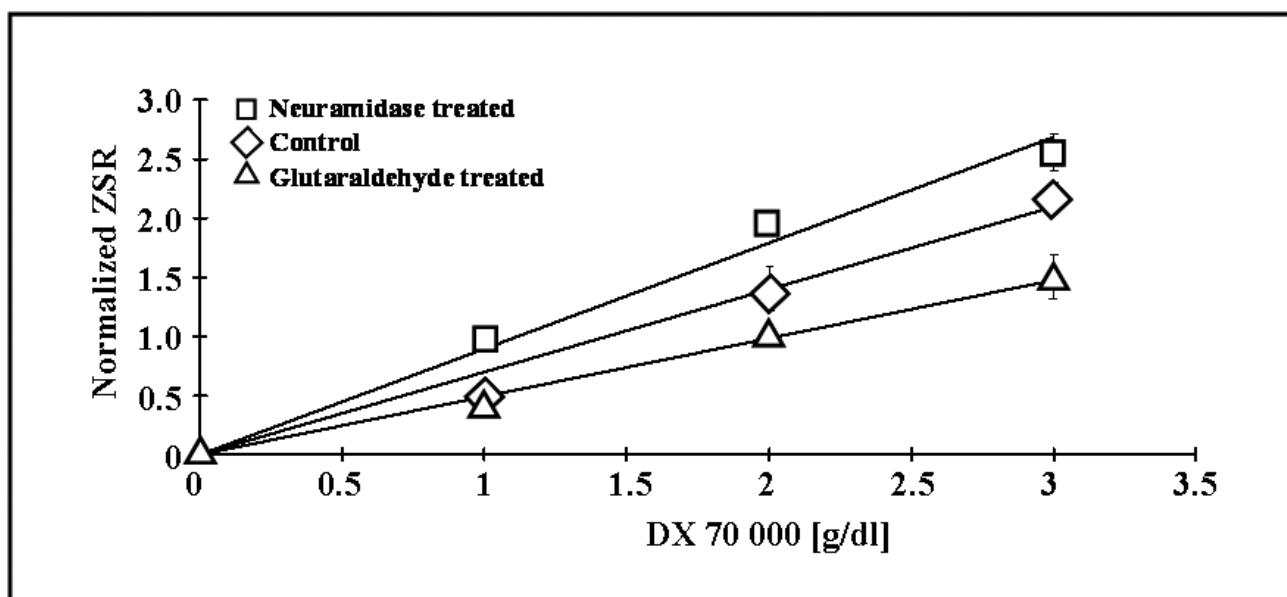
Б Клетъчни фактори, които влияят на процеса на агрегация на еритроцити

От клетъчни фактори на еритроцитите сме изследвали: повърхностния електричен заряд на външната повърхност на мембраната, деформируемостта и стерични особености на гликокаликса на клетки ковалентно декорирани с полиетилен гликол. Тествали сме и информативността на динамиката на дзета седиментацията за характеризиране на агрегационното поведение на еритроцитите.

а повърхостен електричен заряд

Ролята на повърхностния електричен заряд (surface electric charge, SEC) сме изследвали, като сме третирали клетките с неврамидаза. Този ензим класически се използва за отстраняване на сиаловата киселина от повърхността на клетките. Деформируемостта на еритроцитите сме намалявали с глутаралдехид (GA). На

следващата фигура (фиг. 19) сме показали изменението на агрегацията за клетки с намалена деформируемост и намален повърхностен заряд.

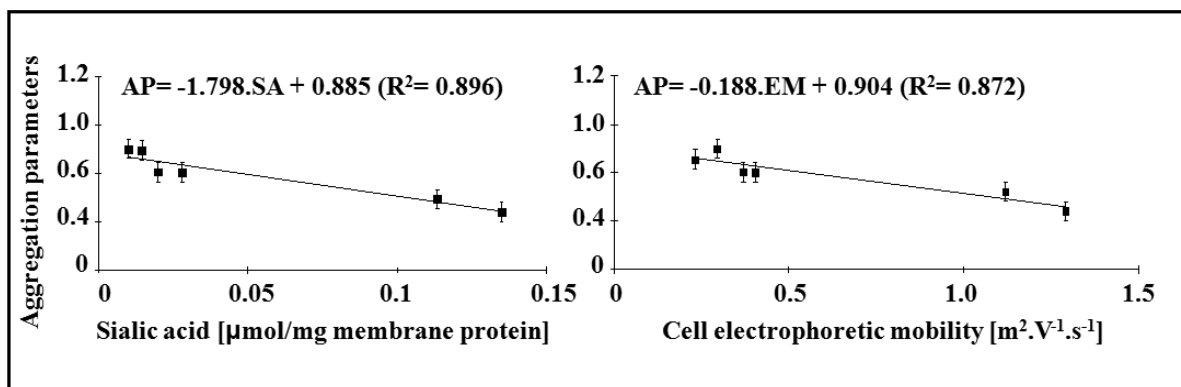


Фигура 19. Агрегация на еритроцити с намалени повърхностен електричен заряд (N-RBC, инкубация с неврамидаза, 60 min, горната права) и намалена деформируемост (GA-RBC, GA - 10⁻² %, долната права). използван е ZSR, коригиран за вискозитет и отнесен към стойността му в PBS. Агрегиращ агент е DX 70К.

Вижда се, че намаленият SEC води до засилване на агрегацията, поради намаленото електростатично отблъскване (Jan and Chien, 1973, Chien, 1977).

б деформируемост

Втвърдените клетки показват намаление на агрегационната способност, вследствие на увеличаване на енергийния разход за деформация на клетките при образуване на агрегатите (Кнох, et al 1977, Chien, 1976).



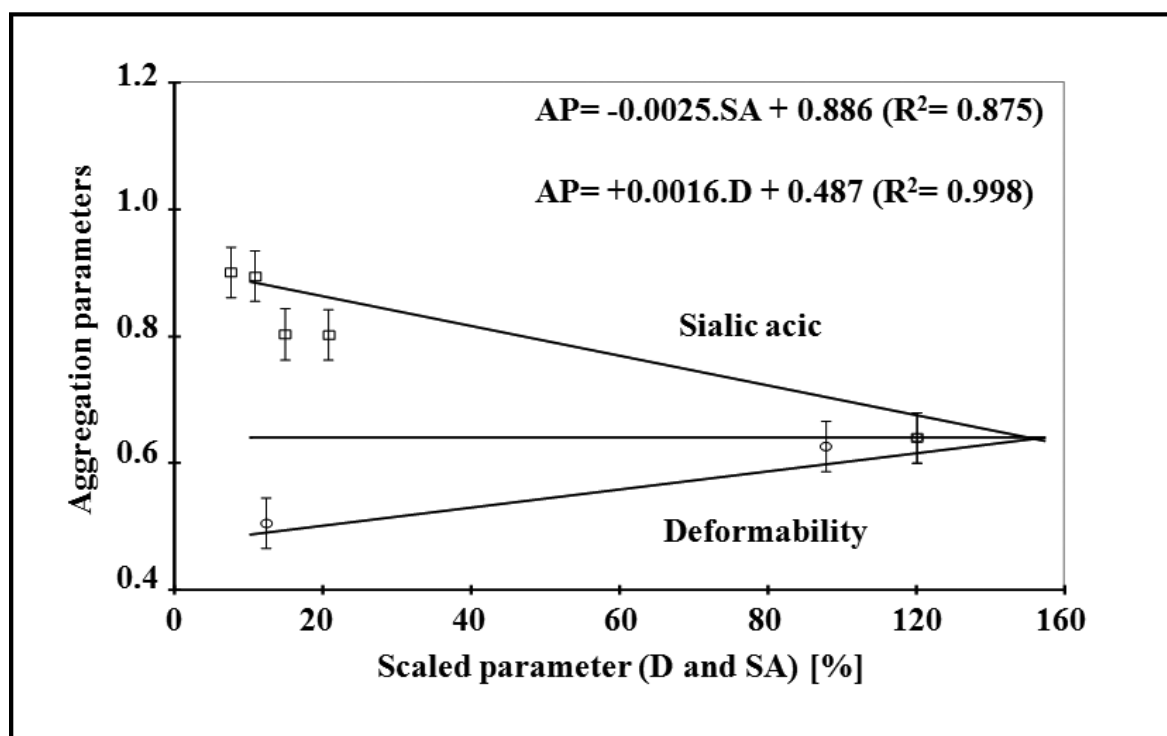
Фигура 20. Агрегация на еритроцити с намален повърхностен електричен заряд. Корелационна зависимост от съдържанието на сialова киселина в мембраната (SA, лявата графика) и електрофоретичната подвижност (EM, дясната графика). Като агрегационен индекс е използван наклонът на правата от фиг. 19 – зависимостта на ZSR (коригиран за вискозитет и отнесен към стойността в PBS) от концентрацията на Dx 70K.

Наклонът на линейната регресия (даващ увеличението на ZSR за g/dl декстран) може да се използва като интегрален параметър на агрегируемостта на клетките. Във фиг. 20 е показана корелационната зависимост на съдържанието на сialова киселина (SA) в мембраната и електрофоретичната подвижност на клетките (EM) спрямо този параметър. Връзката между агрегация и различните параметри свързани с електрическите характеристики на клетките е линейна. Ако стойностите на SA и EM се нормират с тази на контролните клетки, то наклонът на правите, пресечната точка с ординатата и агрегационния параметър, при намаляване на електричните характеристики с 50%, (AP) стават приблизително еднакви (табл. 3.). Този факт може да се интерпретира, че двете различни оценки на електричните свойства на повърхността на мембраната отразяват по сходен начин измененията в мембраните, засягащи агрегируемостта на клетките, след третиране с ензима.

Таблица 3. Сравняване на регресионните параметри на агрегационния индекс (AP, представен като изменение на нормализирания ZSR за g/dl Dx 70K) в зависимостта от нормализираните стойности на сиаловата киселина (SA), електрофоретичната подвижност (EM).

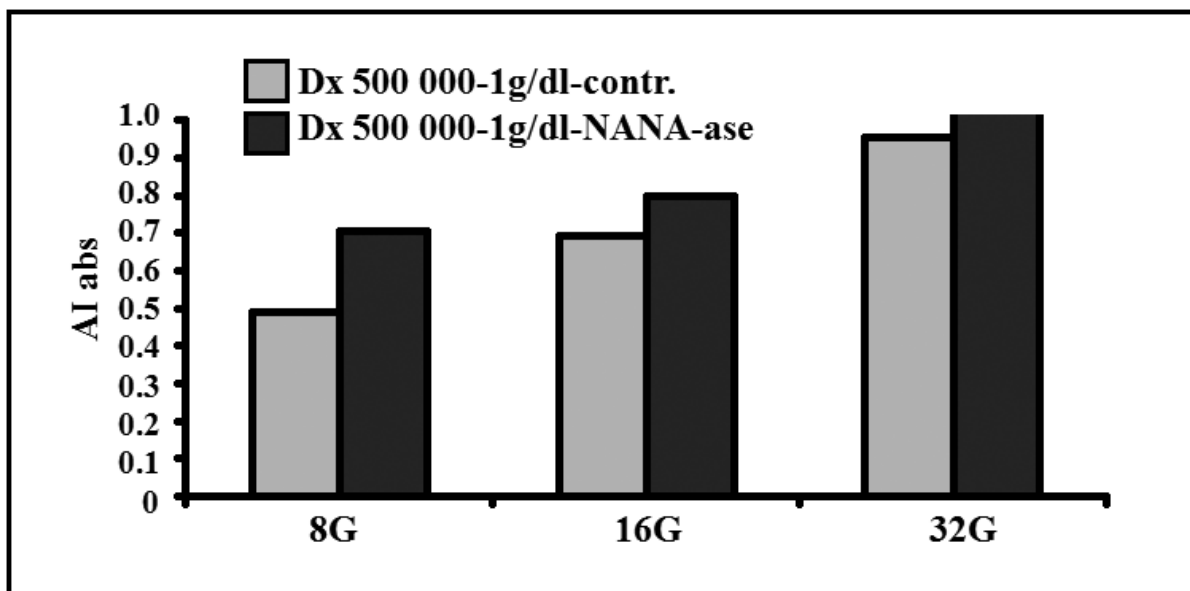
	Съдържание на сиалова киселина (SA)	Електрофоретична подвижност (EM)
наклон [10^{-3}]	- 2,52	- 2,43
пресечна точка с ординатата	0,886	0,904
AP за 50% намаление на SA, EM	0,760	0,782

На следващата фигура (фиг. 21) са сравнени, скалираните деформируемост (D) и сиалова киселина (SA), т.е. отнесените спрямо стойността на нетретирани клетки, като ефект върху агрегацията на човешки еритроцити.



Фигура 21. Влияние на скалираните деформируемост (D) съдържание на сиалова киселина (SA) в мембраната върху наклонът на правата от фиг. 5 – зависимостта на ZSR (коригиран за вискозитет и отнесен към стойността в PBS) от концентрацията на Dx 70K.

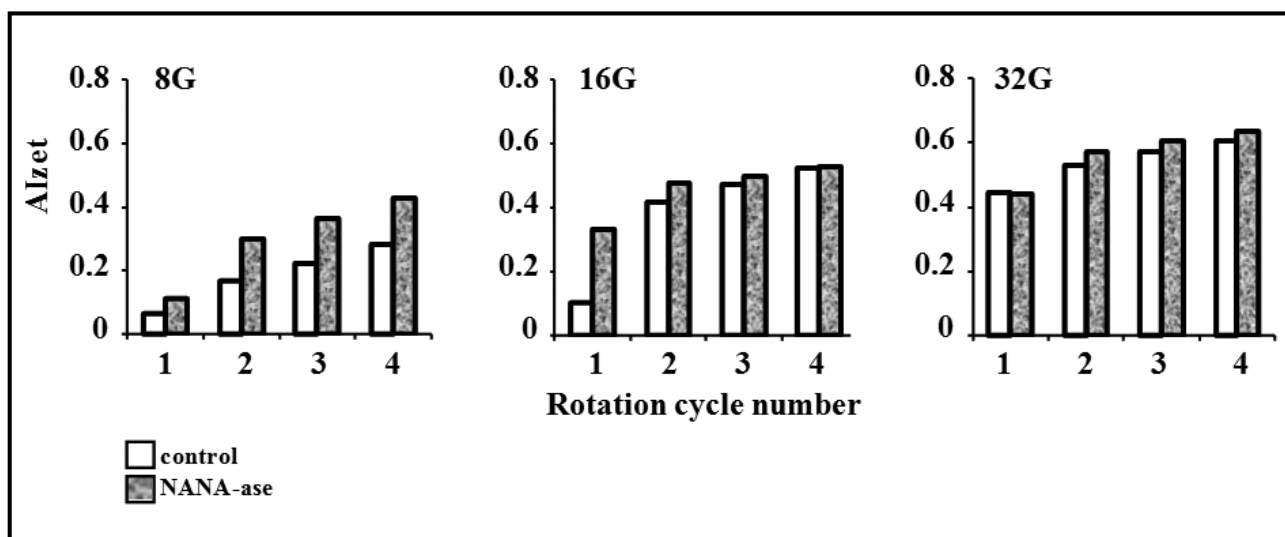
Наклоните от линейните регресии ясно показват, че електричната компонента във междуклетъчното взаимодействие има по-силно влияние от механичната.



Фигура 22. Зависимост на ZSRabs за контролни и третирани с невраминидаза еритроцитни проби при концентрация на Dx 500K (1 g/dl) за различните условия на механично притискане. Повърхностният заряд е намален с 72%, оценен на базата на електрофоретичната подвижност.

Фигура 22 представя влиянието на силата на механично притискане върху степента на агрегация в среда с Dx 500K. Прави впечатление, че ролята на клетъчния фактор отслабва при големи сили на центрофугиране (32G) и голям агрегационен потенциал на полимера.

В следващата фигура (фиг. 23) представяме някои резултати, описващи динамиката на дзета седиментацията. Измерванията са правени след всеки цикъл на въртене. Агрегационният индекс е изчислен само на базата на Zct, при фиксиран хематокрита, 0.40. И тук като при декстран Dx 500K комбинацията от мощен агрегиращ агент (PEG 200K) и големи сили на центрофугиране води до отслабване ролята на клетъчния фактор.

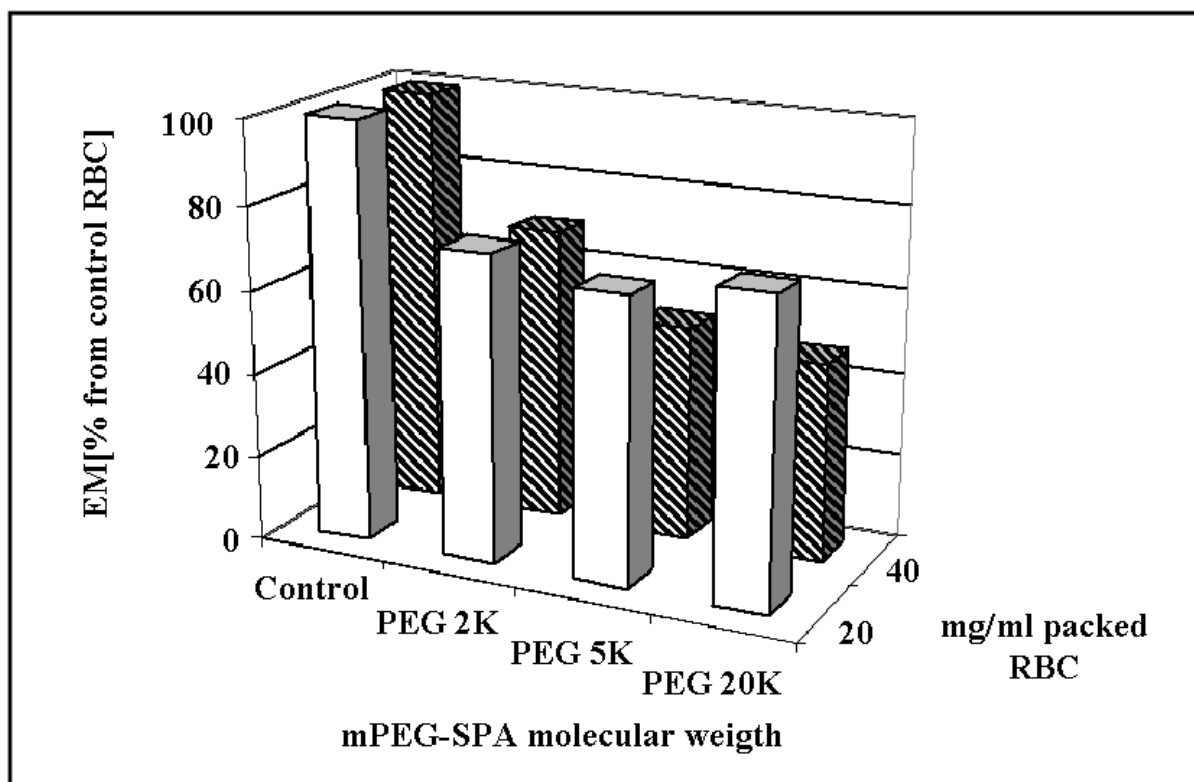


Фигура 23. Динамика на агрегацията на човешки еритроцити в PEG 200K, 0.3 g/dl, при различни сили на притискане към капилярната стена. Агрегационният индекс е изчислен само от Zct, без корекция за Hct. Повърхностният заряд е намален с 72%, оценен на базата на електрофоретичната подвижност.

Вижда се обаче (16 G), че скоростта на дзета седиментация се различава много ясно в първите два цикъла на въртене. С подходящ модел би могло да се получи допълнителна характеристика на агрегационния процес.

в еритроцити ковалентно декорирани с PEG

В следващите фигури представяме резултати, които се отнасят към ролята на пространствената структура на външната повърхност на мембраната на червените кръвни клетки за тяхното взаимодействие и агрегация. За целта към еритроцитната повърхност ковалентно са свързани линейни вериги на неутралния полимер метокси полиетилен гликол сукцинимидил пропионат (methoxypolyethylene glycol succinimidyl propionate, който по-нататък ще се означава като mPEG-SPA). Те са с различна молекулна маса - 2000 (2K), 5000 (5K), 20000 (20K) далтона - и съответно с различна дължина. При третирането сме изменяли концентрация на полимера в инкубационната среда, за да се постигне различна степен на покриване на клетъчната повърхност – т.е. броят на местата на свързване за единица повърхност да варира. Резултатите от модифицирането сме изследвали с помощта на микроелектрофореза. Фиг. 24 показва данните от определянето на електрофоретичната подвижност на клетките (EM). Вижда се, че с удължаване на веригата на PEG, закачени за повърхността на клетките EM намалява. Увеличаване на концентрацията на третиращия агент от 20 на 40 mg/ml еритроцитен седимент води до по-нататъшно намаляване на този показател до под 50%.



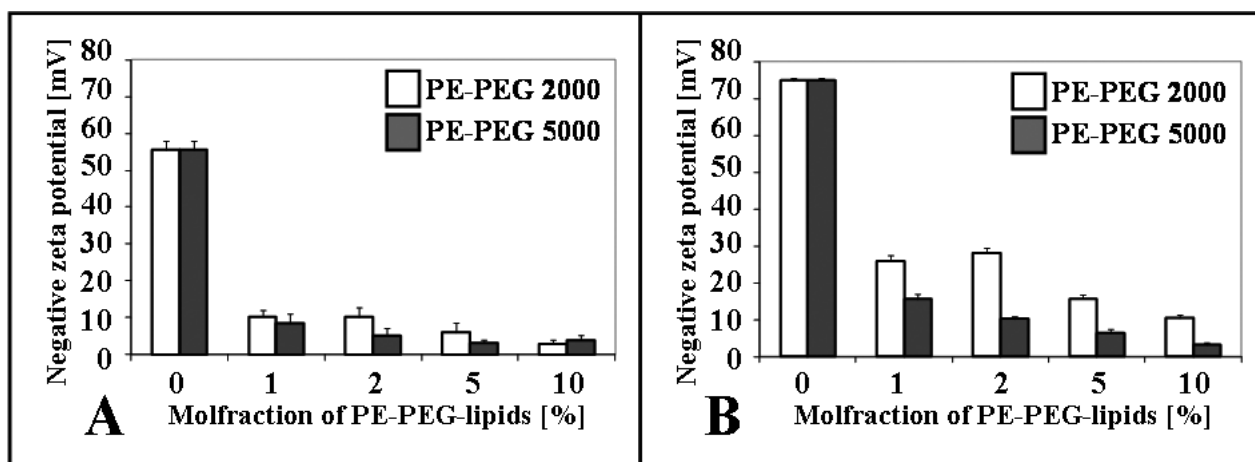
Фигура. 24. Електрофоретичната подвижност на еритроцити декорирани ковалентно с mPEG-SPA с различна дължина (2К, 5К и 20К), при различни условия на инкубация 20 и 40 mg/ml еритроцитен седимент).

Тези резултати потвърждават данните получени от други изследователски групи (Bradley, 2002, Neu, 2001, Neu, 2003, Sabolovic, 2000). Тъй като активирания PEG се закачва за мембраната чрез свързване с amino групи, се смята, че е малко вероятно намалението на EM да се дължи на изменение в повърхностната плътност на електричния заряд (Bradley, 2002, Neu, 2001, Neu, 2003, Sabolovic, 2000). За линейни полимери, които са ковалентно свързани за дадена повърхност, молекулната маса е определяща за дължината на веригата и с това и дебелината на образувания слой. Ако се приеме, че тези структурните преобразования в гликокаликса на еритроцитите отдалечават равнината на прихлъзване от повърхността, както се смята, то това би довело до намаляване на EM. Следователно намаляването на подвижността на клетките поради декорирането им с PEG би могло да се използва като оценка за дебелината на полимерния слой.

Концентрацията на активирания PEG в инкубационната среда пък детерминира гъстотата на свързване и с това повърхностната плътност на полимерните сегменти. Това вероятно променя вискозитета и/или диелектричната константа на примембрания слой, което допълнително намалява електрофоретичната подвижност.

- Електрофоретична подвижност на липозоми декорирани с PEG

За да проверим тази хипотези ние изследвахме липозоми, където при изготвянето можем да контролираме моларното съотношение на липидите, от които ги правим. На фигурата отдолу (фиг. 25) са показани резултатите от определената електрофоретична подвижност на липозоми декорирани с PEG, където моларната фракция на заредени липиди е поддържана постоянна.



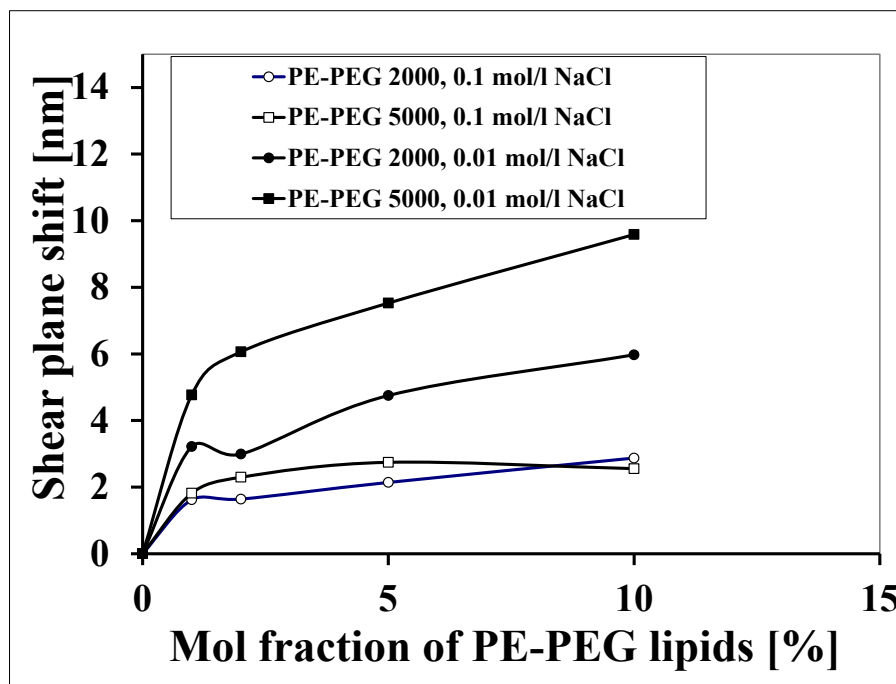
Фигура 25. Дзета потенциал на отрицателно заредени липозоми от EggPC/PS съдържащи различни молни фракции PE-PEG 2000 and PE-PEG 5000 в буферирен с HEPES (10 mmol/l, pH=7.4) при две различни йонни сили: А - NaCl 0.1 mol/l; В - NaCl 0.01 mol/l

Ние вградихме в мембраната на отрицателно заредени липозоми (LUV) полиетилен гликол с различна дължина на веригата (PEG 2000 and PEG 5000), като молната фракция на отрицателните заряди бе поддържана постоянна. Установихме рязко намаляване на електрокинетичния потенциал на частиците с увеличаване на молната фракция на PEG. При по-високата йонна сила (0.1 mol/l NaCl) двете доста различни по големина полимерни вериги не се различават драстично в своя ефект върху ЕМ. При по-ниската

(0.01 mol/l NaCl) - разликата е вече достоверна. Подобни експериментални находки са наблюдавани и от други изследователи преди нас (Janzen, et al. 1996; Cohen, et al. 2001). Предполага се, че изменението на дзета потенциала на липозомите се дължи на отдалечаване на равнината на приплъзване от повърхността на частиците, поради присъствието там на ковалентно свързаните молекули на PEG, а не на промяна на електричният заряд на мембраните (Woodle, et al. 1992). Тогава от определените експериментално дзета потенциали за „гладки“ и покрити с полимери липозоми може да се оцени отместването на равнината на приплъзване от повърхността на мембраната (χ^{PBS}) към вътрешността на разтвора (χ^{PEG}):

$$\chi^{PEG} - \chi^{PBS} = \frac{\ln \frac{\zeta^{PBS}}{\zeta^{PEG}}}{\kappa}$$

κ е параметърът на Дебай.



Фигура 26. Изчислено отместване на равнината на приплъзване за отрицателно заредени (EggPC/PS) големи моноламеларни липозоми (LUV), които съдържат различно количество фосфолипиди с ковалентно свързан PEG.

Резултатите от тези оценки са показани на фиг 26. В условията на по-висока йонна сила (0.1 mol/l NaCl) равнината на приплъзване е почни на едно и също място за двете доста различни по големина вериги PEG. При по-ниската йонна сила обаче (0.01 mol/l NaCl) отместването на равнината на приплъзване достига за декорираните с PEG 5000 стойност 9.6 nm, докато за PEG 2000 то е само 6.0 nm. Това отместване на практика

почти се преустановява след 5 mol % включване в мембраните на липозомите на пегилираните фофолипиди. Теоретични оценки и експериментални данни показват, че преминавайки 5 mol % съдържание в мембраните, води до изправяне на полимерите в конформация тип „четка“. Дължината на тези опънати вериги (L) за различни молекулни маси PEG (литературни данни) и изчисленото от нас отместване на равнината на приплъзване са изложени в таблица

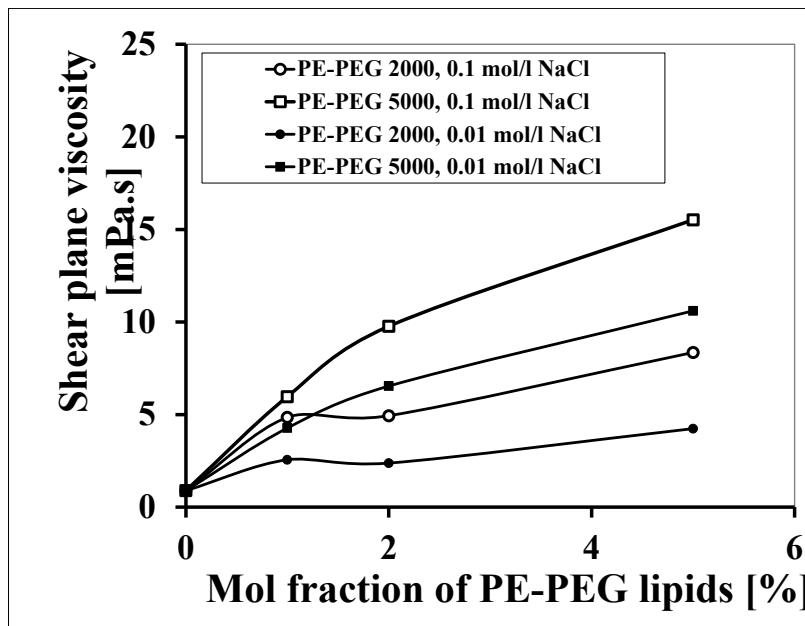
Дължината на тези опънати вериги (L) за различни молекулни маси PEG (литературни данни) и изчисленото от нас отместване на равнината на приплъзване са изложени в таблица от долу. Наблюдава се много добро съвпадение за размера на молекулите от литературата с данните от нашите електрофоретични измервания и спекулативни изчисление. Трябва да се отбележи, че тези числени оценки базират върху предположението, че вискозитетът в равнината на приплъзване е еднакъв с този в обема на разтвора.

Таблица 4.. Сравняване на размерите на PEG веригите (nm), получени от дифракция на рентгенови лъчи (McIntosh, et al.,), и отместването на равнината на приплъзване, поради присъствието в мембраните на PE-PEG липиди с различни по дължина вериги.

PEG-Lipid	PEG-Lipid Concentration [mol %]			Метод на определяне
	1	5	10	
PEG 2000	3.4 (1.5 mol %)	4.8	5.9	Данни от дифракция на рентгенови лъчи
	3.2	4.8	6.0	Изчислени от ЕМ
PEG 5000	4.2 (1.5 mol %)	7.3	8.8	Данни от дифракция на рентгенови лъчи
	4.8	7.5	9.6	Изчислени от ЕМ

Нашите резултати, от измервания върху пегилирани липозоми, дават основания да интерпретираме резултатите от експериментите с ковалентното декорираните с PEG еритроцити, по същият начин – увеличаване на дебелината на гликокаликса. Колкото по-дълги са веригите, толкова по широк е слоя от мембранни полизахариди.

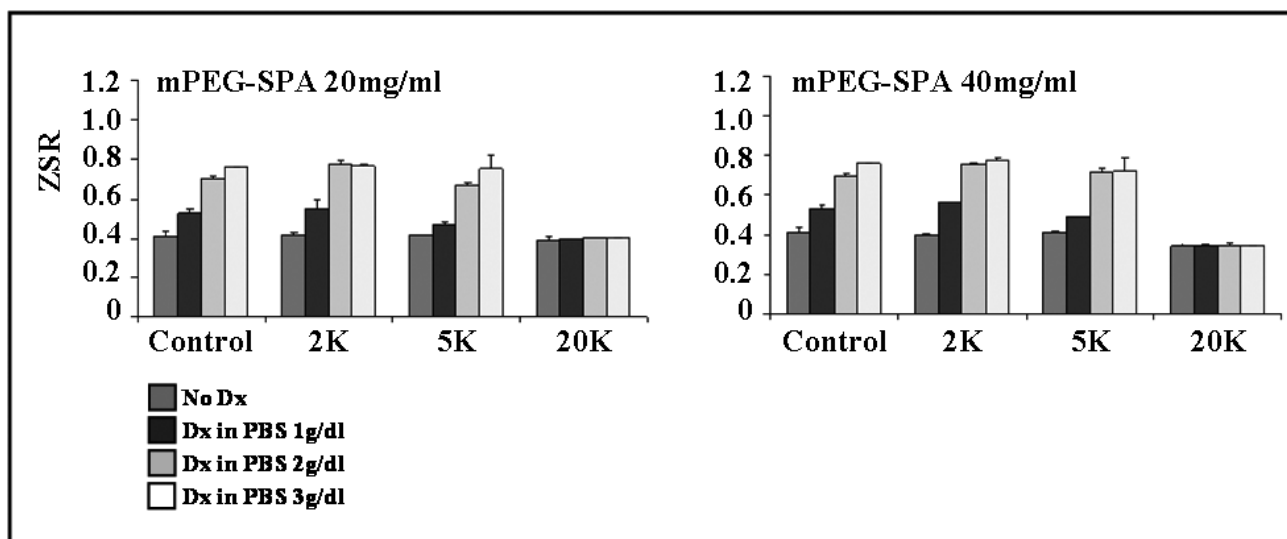
Как се отразява пегилирането на клетки върху агрегационното им поведение.



Фигура 27. Изчислен вискозитет в равнината на прехлъзване, при фиксирането ѝ на мястото, където е при „гладки“ липозоми. Приема се, че хидродинамичният поток свободно преминава през ковалентно закачените вериги на PEG. Повърхностната плътност на заряда върху липозомите се смята за еднаква, тъй като молната част на заредените фосфолипиди е еднаква и за четирите вида. Вижда се ясно, че вискозитетът в равнината на прехлъзване, се увеличава с нарастване на молекулната маса на ковалентно закачения PEG. Графиката показва още, че йонната сила на средата, при която са правени измерванията, е фактор за конкретните числени стойности на вискозитетите.

- Проучване ролята на стеричните особености на гликокаликса за агрегацията на еритроцити

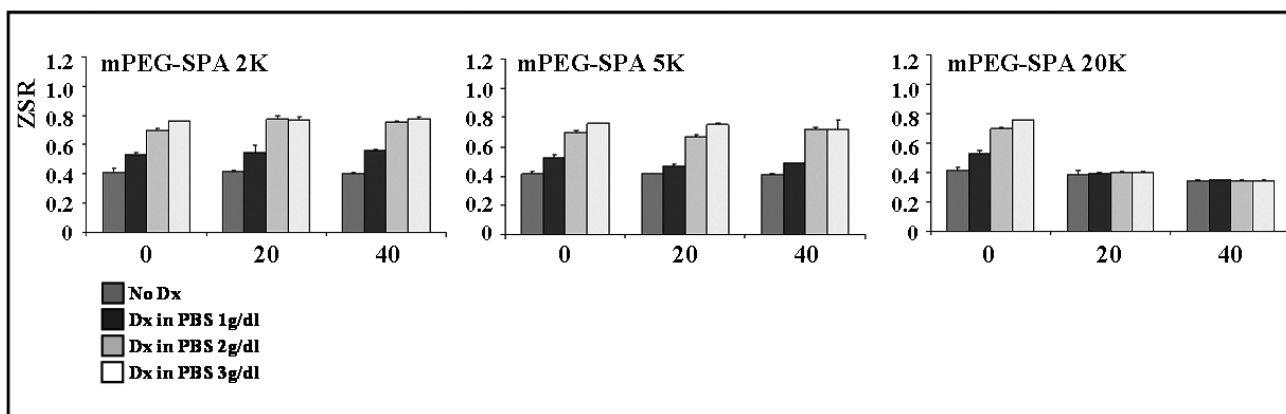
За изследване ролята на стеричните характеристики на мембрана за взаимодействието на клетките сме използвали дзета седиментационния метод. Като агрегиращ агент прилагаме Dx 70000 (Dx70K) в различни концентрации. Допълнително сме използвали различни по-големина сили на центрофугиране, с които да притискаме клетките една към друга и върху стената на тръбичката, за да оценим ефекта на стеричното пречене при взаимодействието между еритроцитите.



Фигура 28. Агрегационно поведение на еритроцити декорирани ковалентно с mPEG-SPA с различна дължина. Агрегиращ агент е Dx70K при различни концентрации. Относителната сила на центрофугиране е 8G.

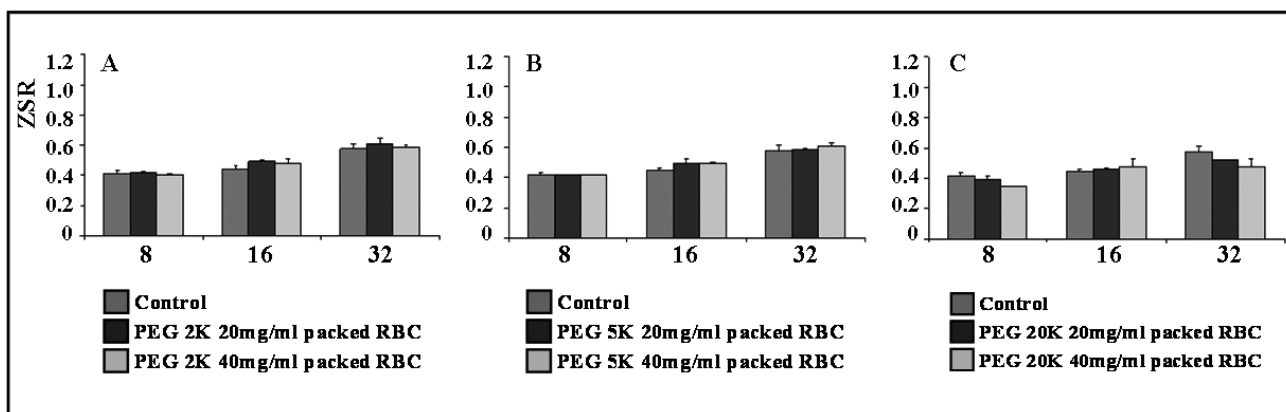
Увеличаване на концентрацията на декстран в средата засилва агрегацията на еритроцитите при всички суспензии с изключение на тези, където клетките са покрити с най-дългата верига mPEG-SPA. Модифицирането на повърхността на клетките с полимер води до намаляване на агрегационния индекс. Колкото по-дълга е веригата му, толкова по-силен е ефектът. В тази фигура са показани резултати, където механичната сила, с която клетките са притискани една към друга, е сравнително малка (8G) – затова в среда без декстран (най-лявото стълбче във всяка група) няма агрегация и седиментация не се наблюдава.

В следващата графика са показани резултатите относно ролята на степента на покриване с полимер на клетъчната повърхност и агрегационното поведение на еритроцитите. Вижда се, че ефектът на плътността на покриване с активиран PEG върху клетъчните взаимодействия е сравнително малък в условията на слабо механично притискане - 8G.



Фигура 29. Агрегационно поведение на еритроцити декорирани ковалентно с mPEG-SPA при различна концентрация по време на третиране - 20 и 40 mg/ml еритроцитен седимент. Агрегиращ агент е Dx70K при различни концентрации. Относителната сила на центрофугиране е 8G.

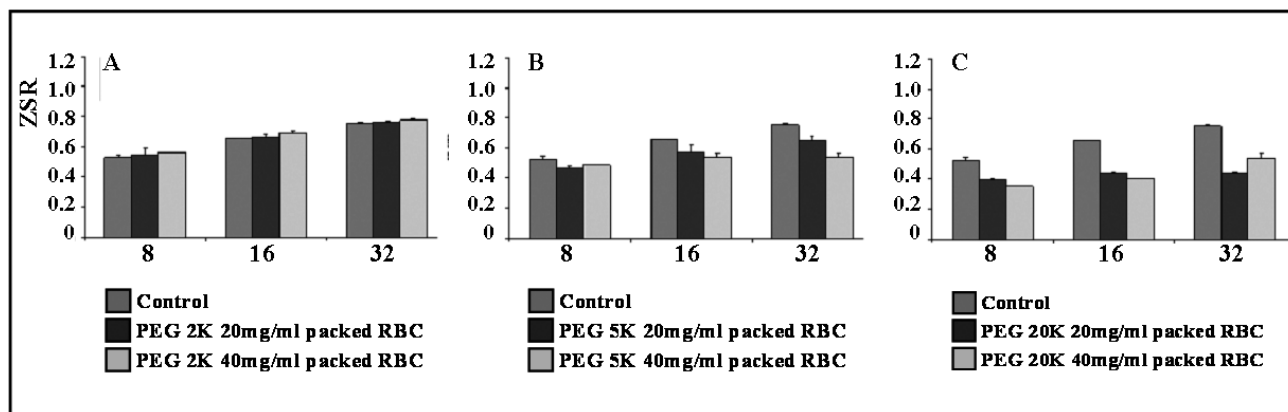
Забелязва се, че само най-дългата верига PEG (20K) предотвратява агрегацията и седиментацията, както е при суспензията от контролни клетки в отсъствието на свободен декстран.



Фигура 30. Седиментационно поведение на еритроцити декорирани ковалентно с mPEG-SPA при различни сили на центрофугиране – 8G, 16 G, 32 G. Лявото стълбче е контролата, в средата клетките инкубирани при концентрация - 20 mg/ml, а дясното стълбче - при 40 mg/ml еритроцитен седимент. mPEG-SPA : А – 2К; В - 5К; С - 20К. Суспензионната среда е без агрегиращ агент.

Във фосфатен буфер силата на центрофугиране е агрегиращият фактор, който притиска клетките една към друга и към вертикалната стената на капилярката. Увеличаването ѝ води до ускоряване на седиментацията на клетките. Стойностите на ZSR при 32G са от порядъка на тези в присъствието на около 1,5 g/dl Dx 70K при 8G. Дали се образуват временно неустойчиви агрегати от клетки, което води до по-високата скорост на утаяване, може да се спекулира.

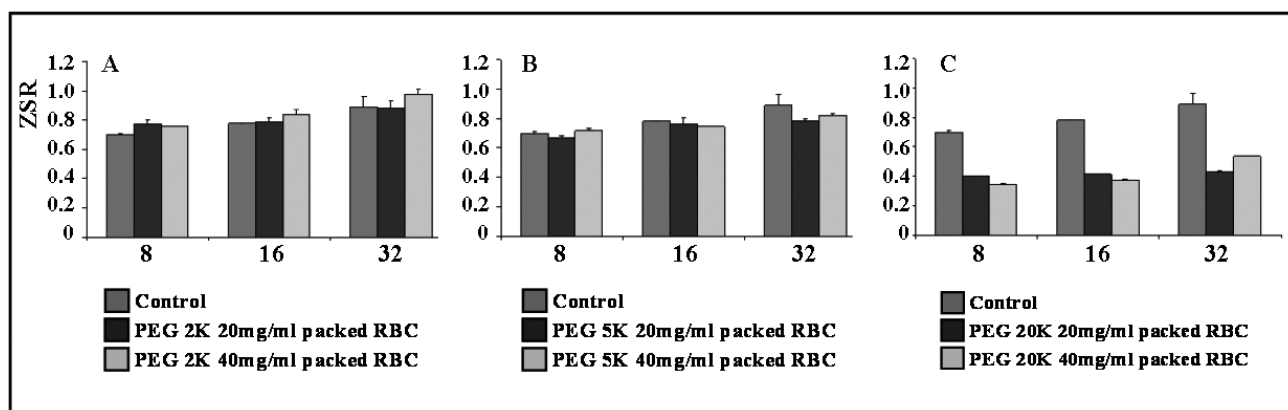
Дължината на полимерната верига и повърхностната плътност на сегментите ѝ са определящи за ефективността на стеричното „отблъскване“ между клетките. В това отношение (в горната графика последната група – С, Фиг.30) mPEG-SPA 20К, закрепен към повърхността на еритроцитите при концентрация 40 mg/ml клетъчен седимент, вероятно успява да попречи на създаване на контакт между клетките. Така се забавя и седиментацията при 32 G в сравнение с еритроцитите от другите суспензии.



Фигура 31. Седиментационно поведение на еритроцити декорирани ковалентно с mPEG-SPA при различни сили на центрофугиране - 8G, 16G, 32G. Лявото стълбче е контролата, в средата концентрация по време на третиране - 20 и дясното стълбче - 40 mg/ml еритроцитен седимент. mPEG-SPA : А – 2К; В - 5К; С - 20К. Суспензионната среда съдържа 1 g/dl Dx70.

На фиг. 31 са представени резултатите от измерванията върху седиментационното поведение на декорираните с PEG еритроцити в присъствието на агрегиращ агент - Dx 70K, 1 g/dl, при различни сили на центрофугиране - 8G, 16 G, 32 G. Комбинирането на механичното притискане с агрегационния потенциал на свободния полимер води до увеличаване на агрегацията и седиментацията на контролите и покритите с PEG– 2К клетки (Фиг. 31А). Увеличаване на дължината на полимерната верига (PEG– 5К), закачена за повърхността на еритроцитите, води до снижаване на този ефект при двете по-големи стойности на механично притискане 16 G, 32 G. Резултатът зависи и от степента на покриване на еритроцитната повърхност с полимера (концентрация в инкубационната среда: 20 и 40 mg/ml еритроцитен седимент) – вероятно агрегацията намалява с увеличаване броя на свързаните за повърхността вериги. Тази тенденция се запазва и при по-дългата верига (PEG– 20К), при стойности на силата на центрофугиране 8G, 16 G и концентрации в инкубационната среда - 20 и 40 mg/ml еритроцитен седимент, където клетките не агрегират. При 32 G обаче картината се променя. Еритроцитите покрити с най-дългите вериги PEG, при по-голямата концентрация (40 mg/ml еритроцитен седимент) седиментират в по-голяма степен, сравнено с тези третираны в среда с 20 mg/ml еритроцитен седимент, но по малко от

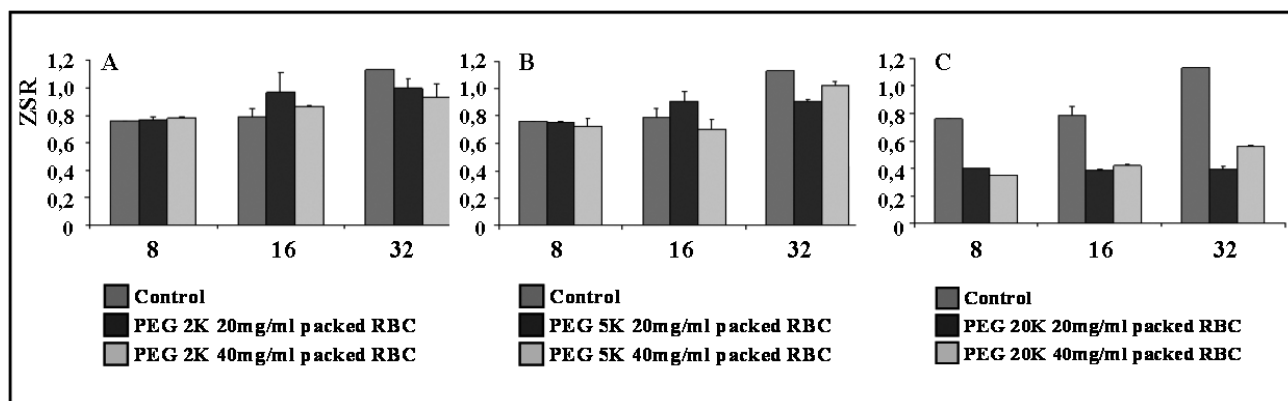
нетретираните клетки и тези покрити с по-късите вериги PEG (2К и 5К). Този факт може да се интерпретира като поява на агрегационна компонента в енергийния баланс на взаимодействие от присъствието на дълги вериги PEG на повърхността. Този фактор вероятно е свързан с увеличаване на пространствената плътност на PEG сегментите в непосредствена близост до мембранната повърхност, защото не се наблюдава при клетки третирани при ниската концентрация на PEG (20 mg/ml еритроцитен седимент). Във фиг. 32 са представени резултатите, където концентрацията на своден полимер е 2 g/dl Dx, с което агрегационният потенциал на суспензионната среда нараства. При тези условия увеличаването на механичното притискане между клетките води до продължаващо нарастване на стойностите на ZSR за нетретираните клетки и тези покрити с PEG 2К. При еритроцитите декорирани с PEG 5К агрегацията е по слаба в сравнение с контролните клетки и тези покрити с PEG 2К. Ролята на степента на свързване на PEG с повърхността е по-слабо изразена. При 32 G (Фиг. 315В) изглежда да се появява тенденцията стеричното пречене да намалява, както е за клетките декорирани с PEG 20К (Фиг. 31С и 32С). И тук засилването на агрегационната компонента присъства само при концентрации 40 mg/ml еритроцитен седимент в инкубационната среда.



Фигура 32. Седиментационно поведение на еритроцити декорирани ковалентно с mPEG-SPA при различни сили на центрофугиране - 8G, 16G, 32G. Лявото стълбче е контролата, в средата концентрация по време на третиране - 20 и дясното стълбче - 40 mg/ml еритроцитен седимент. mPEG-SPA : А – 2К; В - 5К; С - 20К. Суспензионната среда съдържа 2 g/dl Dx70.

На следващата фигура (Фиг. 33) са представени резултатите, където концентрацията на Dx70 е увеличена до 3g/dl. Сега намаляване на ZSR се наблюдава и за най-късата верига (PEG 2К), при голямата концентрация на полимер - 40 mg/ml еритроцитен седимент в инкубационната среда, и големите сили на притискане (32G). Следователно стеричното

пречене се включва в баланса на силите на взаимодействие и образуването на агрегати от еритроцити.



Фигура 33. Седиментационно поведение на еритроцити декорирани ковалентно с mPEG-SPA при различни сили на центрофугиране - 8G, 16G, 32G. Лявото стълбче е контролата, в средата концентрация по време на третиране - 20 и дясното стълбче - 40 mg/ml еритроцитен седимент. mPEG-SPA : А - 2К; В - 5К; С - 20К. Суспензионната среда съдържа 3 g/dl Dx70.

При клетките покрити с PEG 5K и сила на центрофугиране от 32G появилата се агрегационна компонента (при 2 g/dl, фиг. 32B) се засилва, при по-високата степен на покриване на повърхността (концентрация 40 mg/ml еритроцитен седимент в инкубационната среда). При най-дългата верига (PEG 20K) тя сякаш се появява и при сила на центрофугиране 16G.

II Изследвания, имащи отношение към механизма на агрегация, предизвикана от полимери

1. Модели за обясняване на агрегацията на еритроцити

На базата на структурата на еритроцитната повърхност и особеностите на взаимодействие на макромолекулите от средата с нея са развити два модела, които обясняват механизма на обратимата еритроцитна агрегация моделът на омреждане (cross-bridging model) и моделът на обеднения на макромолекули слой (depletion model, ОМС).

В първия модел се постулира, че макромолекулата, (напр. декстранът (DX) - изграден от глюкозни единици, свързани с 1,6-α връзки или 1,3 и 1,4 връзки) или полиетиленгликола (PEG, изграден от етиленоксидни остатъци) са линейни, верижно подобни структури,

който не абсорбират върху гликокаликса с цялата си дължина, а само в специфични абсорбционни места. В такъв случай свободните брънки и несвързаните крайни участъци на веригите могат да взаимодействат с повърхността на съседни близко разположени клетки и да формират двуклетъчен агрегат (Brooks, 1973).

Силите на взаимодействие между съседни клетъчни повърхности изцяло водят началото си от молекули, едновременно абсорбирани на две срещуположни клетъчни повърхности. Енергията на омреждане за единица взаимодействаща мембранна повърхност е равна на производението на свързващата енергия за връзка, броя на връзките, осъществявани от всяка молекула с повърхността на еритроцита и броя на свързаните молекули за единица взаимодействаща площ.

Повишаването на агрегацията на еритроцитите с увеличаването на декстрановата концентрация в областта от 0-4 g/dl показва повишаване на свързващата енергията с увеличаване на броя свързани молекули, абсорбирани върху двете клетъчни повърхности. Еритроцитната агрегация по този механизъм се явява в случаите, когато свързващите сили, дължащи на абсорбция на макромолекули върху съседни клетъчни повърхности, надвишават по големина силите на дезагрегация, дължащи се на електростатично отблъскване, мембранно напрежение и механично приплъзване.

Моделът на обеднения на макромолекули слой (ОМС)

Според него еритроцитната агрегация е резултат от намалената локална концентрация на макромолекули (протеини или полимери) в близост до клетъчната повърхност в сравнение с концентрацията им в суспензионната среда далече от мембраната. Основната теория на ОМС - взаимодействието и нейното приложение в колоидните системи е предложени от de Gennes и van Oss, а приложена за агрегацията на еритроцити - от Evans and coworkers и van Oss et all (Evans, 1988, van Oss, 1988, 1990).

Ако клетъчната повърхност е в контакт с полимерен разтвор и загубата на конфигурационна ентропия на полимера не е уравновесена от абсорбционната енергия се развива ОМС в близост до клетъчната повърхност, като полимерната концентрация в този слой е по-малка от концентрацията на полимера във обемната фаза. Така при доближаването на два еритроцита, разликата в химичния потенциал на разтворителя (т.е. разликата в осмотичното налягане на областта между клетките и обемната фаза) води до преразпределение на разтворителя по посока на обемната фаза и по тази причина клетките формират агрегат. Често при това взаимодействие се формират сили

на привличане, които се стремят да намалят до минимум свободното от полимер пространство между клетките.

Процесът на еритроцитна агрегация може да бъде определен като резултат от баланса между агрегационните и дезагрегационните сили, като силите на дезагрегация включват механичните сили на прихлъзване, електростатичното отблъскване между клетките, стеричната компонента от гликокаликса като полимерен слой и еластичната енергия на клетъчната мембрана при деформация. Агрегиращата компонента се определя от дебелината на слоя беден на полимер (1.4 пъти инерционният радиус на макромолекулата) и разликата в осмотичното налягане на между този слой и обема на разтвор. Става ясно, че размера на полимерите, и концентрацията на молекули ще определят големината на агрегиращата компонента между съседни клетки. От изложеното за двата модела се вижда, че в единия случай, вискозитетът близо до повърхността ще е по-голям от този на окръжаващия разтвор, в другия – по-малък.

А Електрофоретични измервания, във връзка с проверката на съществуването на слой с намалена концентрация на полимери, в близост до биологични повърхности.

За да се изчисли потенциалът на повърхността (ψ_0) от дзета потенциалът (ζ) обикновено се правят две предположения:

- Хидродинамичната равнина на приплъзване се намира на 0.2 nm от повърхността на гладката липозома (Eisenberg, et al., 1979)
- Профилът на потенциала във водната фаза може да се опише с класическата теория на двойния електричен слой (Bentz, et al., 1980). За да се изчисли дзета потенциалът с уравнението на Смолуховски е необходим вискозитетът в равнината на приплъзване. Поради наличието на полимер в суспензионната среда, той се различава от този на чистия разтворител (η_0). В случай на изключване (depletion) на полимера от пространството близо до повърхността обаче, вискозитетът в равнината на приплъзване е различен и от този във вътрешността на разтвора. Това означава, че имаме градиент на вискозитета с приближаване от вътрешността на разтвора към повърхността на мембраната.

$$\zeta = \frac{\eta \times EM}{\epsilon \times \epsilon_0} [V]$$

Ако означим разстоянието от равнината на приплъзване до повърхността на липозомата с x_S то потенциалът в тази равнина, ще отговаря на „истинския“ дзета потенциал $\psi(x_S)$.

Приемайки, че електричният потенциал на повърхността на частицата не се променя от присъствието на PEG (Arnold, et al., 1990) то $\psi(x_S)$ може да се изчисли от електрофоретичната подвижност в чист разтворител. Ако изчисляваме формално дзета потенциала (т.н. ζ_{app}) като използваме стойността на вискозитета за полимерния разтвор далече от повърхността (η_∞) и се докаже експериментално, че зависимостта на ζ_{app} от η_∞ като функция е линейна:

$$\zeta_{app} = A + B\eta_\infty$$

То от наклона на правата B може да се оцени дебелината на слоя (d), където вискозитетът е намален, т.е. полимерът е изключен:

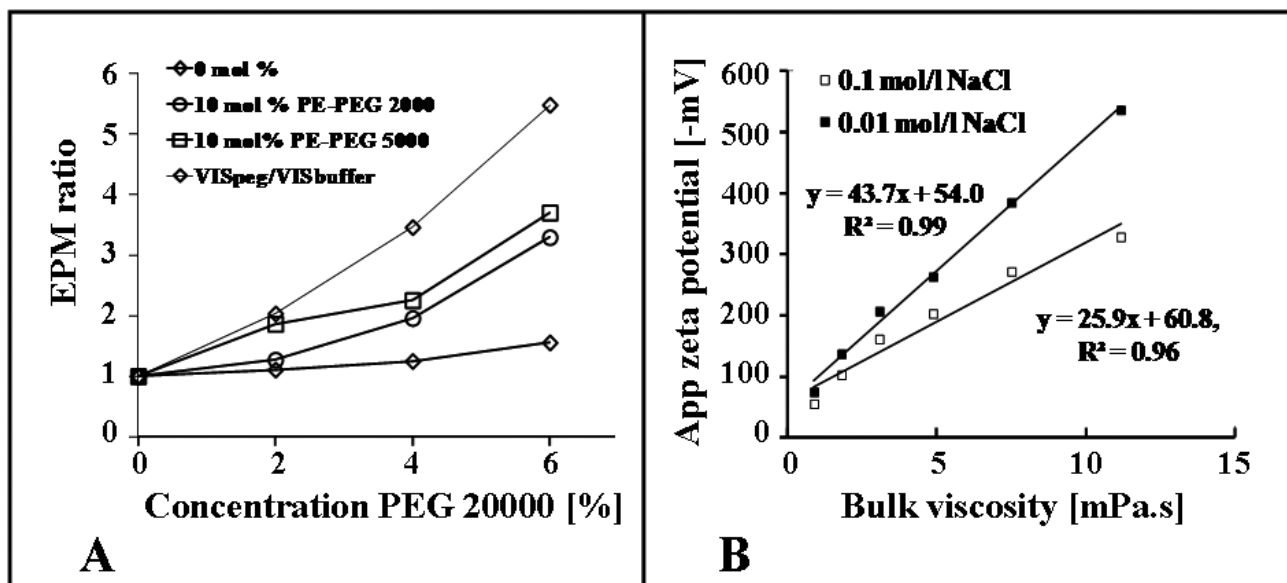
$$\zeta_{app} = \psi(x_S) \times \left[1 + \left(\frac{\eta_\infty}{\eta_0} - 1 \right) \times \left(1 + \frac{1}{\kappa d} \right)^{-1} \right]$$

и d може да се изчисли от наклона на правата (B):

$$B = \frac{\psi(x_S)}{\eta_0} \times \frac{1}{1 + \frac{1}{\kappa d}}$$

На **фигура 34 А** се вижда отчетливо, че електрофоретичната подвижност на гладките липозоми намалява доста по-слабо, отколкото може да се очаква на базата на съотношението на вискозитетите на разтворите, съдържащи свободен полимер, спрямо този само на електролита (10 mM HEPES buffer, 10 mM NaCl, pH=7.4). Това се смята за доказателство, че в равнината на приплъзване, близо до повърхността на частиците, концентрацията на свободен полимер е намалена – т.е. съществува обеднен на макромолекули слой (ОМС).

Той се „усеща“ не само от „гладките“ липозоми, но и от декорираните с PEG, макар и в по-малка степен. Липозомите с по-дългите вериги при ниски концентрации на свободен полимер, почти не „усещат“ ОМС. При по-големи концентрации PEG 20000, обаче този слой се „чувства“ и от декорираните липозоми. На фигурата (В) е показана зависимостта на дзета потенциалите на „гладки“ LUV (ζ_{app}) от η_∞ на PEG 20000 в обема на разтвора, при 2 различни йонни сили. С резултатите от линейната регресия за дебелината на този слой d се получават 0.68 nm (0.1 mol/l NaCl) и 3.27 nm (0.01 mol/l NaCl).



Фигура 34. А: Съотношение на електрофоретичните подвижности (EPM_{buffer}/EPM_{PEG}) на „гладки“ (LUV, PC/PS, 1:1) и декорирани с PEG (10 mol%) липозоми (PC/PS/PE-PEG 2000, PC/PS/PE-PEG 5000) представени в зависимост от концентрацията на свободен полимер (PEG 20000) в средата (10 mM HEPES buffer, 10 mM NaCl, pH=7.4). За сравнение е дадено съотношението на вискозитети на разтворите на свободния полимер (PEG 20000) спрямо този на буферния разтвор без полимер. Б – определяне на дебелината на слоя, където концентрацията на макромолекули е намалена (depletion layer thickness). На ординатата са нанесени дзета потенциалите на „гладки“ LUV (EggPC/PS, 1:1), изчислени с вискозитета на разтворите, определени отделно.

Б Електрооптични изследвания върху полимери на повърхности

В тази глава представяме някои изследвания, свързани с присъствието на полимери близо до повърхности в контекста на връзката с агрегационното поведение на частиците. На базата на структурата на еритроцитната повърхност и особеностите на взаимодействие на макромолекулите от средата с нея са развити два модела, които обясняват механизма на обратимата еритроцитна агрегация: моделът на омрежване (cross-bridging model) и моделът на обеднения на макромолекули слой (depletion model, ОМС). Първият постулира абсорбцията на полимера едновременно на повърхностите на близки една до друга клетки, вторият – обратното, че близо до повърхността се създава слой, където концентрацията на полимера е по-ниска сравнение с обема на разтвора. Ние използвахме електрооптична методика, която използва светоразсейване за оценка на топлинното ротационно движение на частиците. Първо се прилага външно електрично поле за тяхната ориентация (Stoylov, 1991). След изключването му частиците се дезориентират, което се следи по изменение на разсеяната от суспензията светлина. Релаксационното време зависи от вискозитета в хидродинамичната равнина на прихлъзване близо до повърхността на частицата, с което носи информация за присъствието или отсъствието на полимера (Jovtchev, 2002).

От релаксационното време се изчислява вискозитетът (η) в близост до повърхността на частицата:

$$\eta = \frac{9 k_B T \tau}{2 B^3} [Pa \cdot s] \text{ за } 25^\circ C: \eta = 1.851 \times 10^{-20} \frac{\tau}{B^3} \text{ с } B^3 = (6.89 \times 10^{-6} \text{ m})^3$$

$$\eta = 5.669 \times 10^{-5} \tau$$

Ако се знаят диаметърът и вискозитета, може да се прогнозира времето на релаксация.

$$\tau = \frac{2 B^3 \eta}{9 k_B T} [s] \text{ за } 25^\circ C \tau = 5.40 \times 10^{19} B^3 \eta [s] \text{ и с данните отгоре:}$$

$$\tau = 17641 \times \eta [s]$$

В таблица 5 по долу са представени релаксационните времена за еритроцити, фиксирани с GA за различни концентрации на декстран в разтвора, и вискозитетите, изчислени от релаксационните времена. За сравнение са дадени вискозитетите на разтворите, определени експериментално. Вижда се ясно, че вискозитетът в хидродинамичната равнина, който „усещат“ клетките при дезориентация е по-малък от този в обема на разтвора. методика (Baumler, et al., 1999, 389)

Таблица 5. Релаксационните времена (τ) за еритроцити, фиксирани с GA (GA – PBS), за различни концентрации на декстран в разтвора на Dx 75K, вискозитетите, измерените за обема на разтвора, и вискозитети, изчислени от релаксационните времена.

Concentration [g/dl]	Decay relaxation time τ [s]	Viscosity [mPa.s]	
		Bulk solution	Calculated
	GA - RBC		GA - RBC
0	15.7 ± 0.5	0.89	0.89
2	17.7 ± 0.7	1.54	1.13
4	23.0 ± 0.7	2.35	1.47

Таблица 6. Определени електро-оптично релаксационни времена (τ) за човешки еритроцити фиксирани напълно с глутаров алдехид в разтвори на различни полимери (в концентрация 3 g/dl). За съпоставка са показани изчислени (τ_{cal}) с вискозитетите на разтворите и диаметра на еритроцитите в PBS.

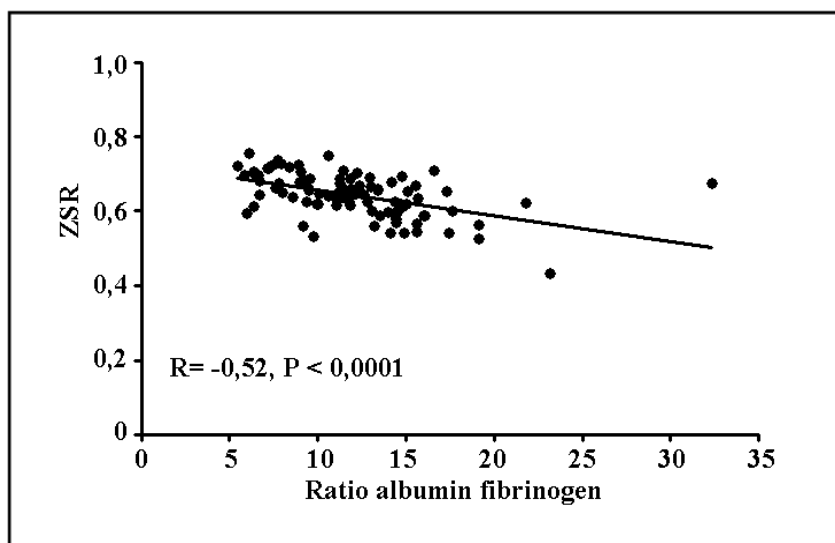
Вещество	Вискозитет на разтвора [mPa.s]	Релаксационно време [s]	
		Измерено (τ)	Изчислено (τ_{cal})
H ₂ O	0.89	15.7 ± 0.5	15.8
захароза	1.412	23.4 ± 1.9	25.1
Dx 60K	1.723	28.3 ± 1.2	30.6
Dx 500K	3.128	47.3 ± 1.9	55.5
PEG 20K	1.769	20.9 ± 1.2	31.4

Сумирайки данните от електро-оптичните данни за клетки и електрофоретичните измервания на липозоми можем да направим извод, че за случаите на декстран и полиетилен гликол съществува област близо до повърхността на частиците, с намалена концентрация на полимер. Те са потвърдителни, защото с помощта на електрофореза, електроротация и др. за тези два полимера такъв слой се смята за доказано, че съществува. Следователно може да се ползва моделът на „обеднения на полимери слой“ за тълкуване на резултатите от агрегацията на еритроцити, когато са в тези среди.

III Изследвания в цялостна кръв и съпоставката им с измерванията в моделни условия

1. Фактори от кръвната плазма, корелиращи с агрегационното поведение на еритроцити

Чувствителността на нашата методика към фактори от кръвната плазма бе тествана за: фибриноген, албумин и тяхното отношение. За изследваната от нас досега група индивиди е показана връзката ZSR_{rel} отношение албумин/фибриноген.



Фигура 35. Корелационна връзка между ZSR и съотношението на концентрацията на албумина спрямо тази на фибриногена.

На фигурата отгоре е представена корелационната връзка между агрегацията на еритроцити и плазмени фактори – съотношението албумин/фибриноген. Статистически достоверно ZSR намалява с увеличаване на антиагрегиращото действие на албумина спрямо проагрегиращото на фибриногена. Това напълно съответства на резултати получени от други изследователски групи с други методи за оценка на агрегацията (Kitamura, et al., 1997; Maeda and Shiga, 1986). За ново дефинираните от нас параметри -

ZSR_{rel} (коригираната стойност с вискозитета на плазмата и отнесена към стойността на параметъра в PBS) зависи достоверно от концентрацията на фибриноген (Pearson R = +0.419), от концентрацията на албумин (Pearson R = -0.408).

Чувствителността за установяване на достоверни разлики между здрави и болни е тествана за болни от хипертония с различен произход (N = 61) спрямо здрави индивиди (N = 38).

Таблица 7. Различни индекси за оценка на агрегацията на еритроцити от болни от хипертония с различен произход (N = 61) спрямо здрави индивиди (N = 38).

ZSR_{blood}, ZSR_{bl-40}, ZSR_{bl-rel} – са: първият е оригинално дефинираният е параметър; вторият е – за проба с хематокрит 0.40; третият – с допълнителна корекция за вискозитета на кръвната плазма и отнесен към стойността на ZSR в

Parameter:	ZSR-con-blood	ZSR-Hyp-t
Mean:	0.6140	0.6440
# of points:	61	38
Std deviation:	0.05000	0.08000

The two-tailed P value is 0.0429, considered significant.

Parameter:	ZSR-Con-	ZSR-Hyp-bl-40	Normal
Mean:	0.6160	0.6520	
# of points:	61	34	
Std deviation:	0.05000	0.07100	

The two-tailed P value is 0.0116, considered significant.

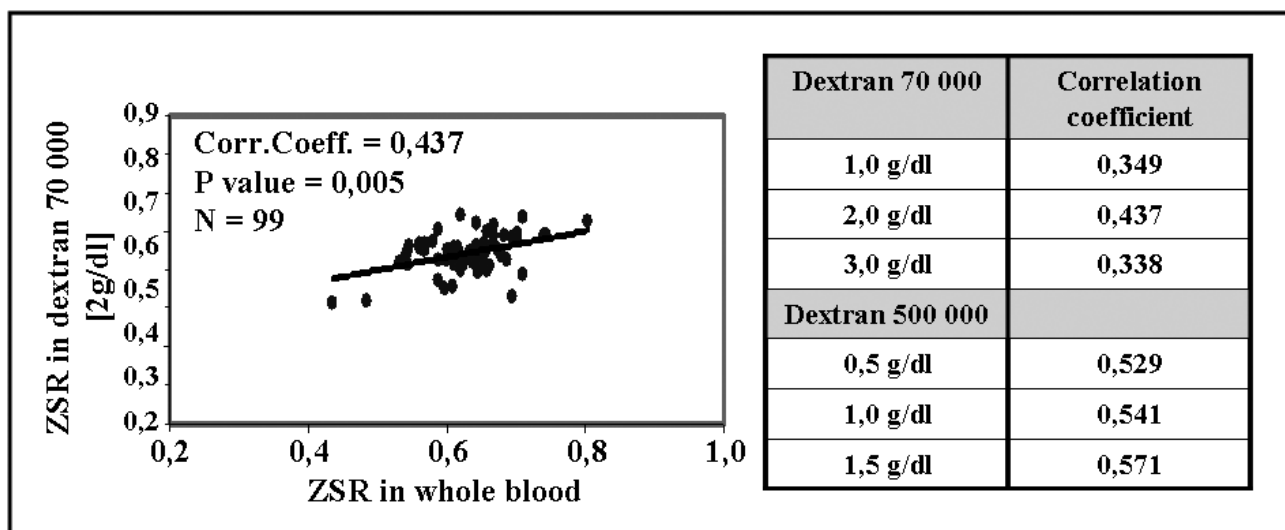
Parameter:	ZSR-Con-bl-rel	ZSR-Hyp-bl-rel
Mean:	1.427	1.752
# of points:	61	24
Std deviation:	0.2800	0.4930

The two-tailed P value is 0.0049, considered very significant.

Вижда се ясно, че в случая с болни от хипертония, ново дефинирания индекс показва по-добри възможности.

2. Възможности на дефинираните агрегационни показатели в медико-биологични изследвания

На следващата фигура сме оценили връзката между агрегацията в плазма и агрегацията в декстран. Смята се, че съществуването на такава е доказателство за чувствителността на методиката към клетъчни фактори. Резултатът от долната фигура и таблица дава положителен отговор. Действително съществува връзка за агрегацията в кръвните проби и полимерните разтвори. нашата извадка от изследвани индивиди



Фигура 36. Корелационна връзка между агрегация в оригинална кръвна проба и отмитите клетки в разтвори на декстрана различна молекулна маса.

Тъй като тази група индивиди не е разделяна по патологии, изглежда стратегията да се сравняват двете ситуации, като база да се изяви ролята на клетъчния фактор за агрегацията на еритроцити – е обещаваща. Има и данни, за изключения от това правило. Следователно трябва да се продължат и задълбочат изследванията, касаещи взаимодействието на полимерите с повърхността на клетките. Особено обещаващи са електрофоретичната и електро-оптичната методики с техните възможности да осветляват свойствата на повърхността на частици.

За разделяне влиянието на клетъчни от плазмени фактори е предложен индекс – плазмени фактори (Ami, et al.2001).

Ние го формулирахме за нашата методика:

$$PF = \frac{\Delta AI_{pl} - \Delta AI_{polymer}}{\Delta AI_{pl}}$$

$$PF = \frac{\Delta AI_{pl} - \Delta AI_{Dx70}}{\Delta AI_{pl}}$$

$$\Delta AI_{pl} = |AI_{pl}^{test\ group} - AI_{pl}^{Control}|$$

$$\Delta AI_{polymer} = |AI_{polymer}^{test\ group} - AI_{polymer}^{Control}|$$

$$\Delta AI_{Dx70} = |AI_{Dx70}^{test\ group} - AI_{Dx70}^{Control}|$$

Съгласно тези дефиниции, $0 \leq PF \leq 1$. Когато $PF=0$, няма плазмени приноси за агрегацията; когато $PF = 1$ измененията се дължат на плазмени фактори. За изследваната от нас група PF изчислихме на базата на нормираните за хематокрит стойности на ZSR_{vis} цялостна кръв и ZSR_{vis} за $2 \text{ g/dl Dx } 70K: 0.50$. Това означава, че и двата фактора участват по-равно. Ние установихме достоверна разлика за фибриногена – по-високо ниво у болните с хипертония и леко намалена електрофоретична подвижност, което удостоверява полезността на предложения параметър.

Тези факти удостоверяват добрите характеристики на апаратурата, внедрена от нас в Катедра по медицинска физика и биофизика и съпоставимостта на получените с нея резултати в медико-биологичен аспект и във фундаментален план.

Глава 5. ИЗВОДИ

1. По възпроизводимост и чувствителност въведеният от нас дзета седиментационен метод е съпоставим с използваните понастоящем и в миналото методи за оценка на еритроцитната агрегация
2. Получените резултати от изследванията върху агрегацията на еритроцити, предизвикана от полимерите декстран и полиетилен гликол, са в съгласие с публикуваните досега студии. Агрегационният потенциал на полимера зависи от химичната му природа и от молекулната маса – полиетилен гликол е по-мощния агрегиращ агент от двата полимера и неговия агрегационен потенциал (PEG 200K) е от порядъка на този на фибриногена.
3. Понижаване на йонната сила на средата намалява агрегацията на еритроцити. Това дава възможност да се съпоставят агрегационните потенциали на полимерите с дезагрегационния на йонната сила.
4. Механичното притискане на клетките една спрямо друга, което при този метод на оценка на агрегацията е уникално, може да влияе драстично на агрегационното поведение на клетките. Когато агрегационните сили, тези генерирани от полимера и тези от механичното притискане надхвърлят определена стойност ролята на клетъчния фактор става второстепенна.
5. Намаляване на повърхностния електричен заряд на RBC с невраминидаза води до увеличаване на степента и ускоряване на процеса на агрегацията. Разликите между третирани и контролни клетки се заличава, когато агрегационната енергия от полимера и механичното притискане надхвърлят определена стойност.
6. Декорирането на клетките с PEG променя електрофоретичната подвижност на клетките в зависимост от тяхната дължина и може да се използва за тестване на ефективността на процедурата на покриване на повърхността
7. Ковалентното свързване на полимера за повърхността намалява агрегацията, предизвикана от декстран и засилена от механичното притискане – дължината на веригата е от значение. При надхвърляне на определена стойност на агрегиращата

компонента във взаимодействието на клетки, пречещият ефект на полимерните вериги отслабва

8. Динамиката на седиментация се влияе както от фактори на среда – вид и концентрация на макромолекули, йонна сила на средата, условията на механично притискане, но и от клетъчни фактори – като повърхностния електричен товар.
9. Ново формулираните от нас агрегационни параметри показват по-добри възможности от оригиналния за методиката ZSR при установяване връзките на агрегацията на еритроцити с плазмени и клетъчни фактори

Глава 6. Приноси

1. Научни приноси

- 1.1. Предложен е подход за изследване на агрегационното поведение на еритроцити, основан на увеличаване на механичното притискане на клетките една спрямо и са получени експериментални резултати, които доказват информативността му при изследване на клетъчните фактори, определящи агрегационното поведение на клетките

2. Научно-приложни приноси

- 2.1. Оценени са възможностите и приложимостта на въведения от нас метод за определяне на агрегация на еритроцити в цялостна кръв и моделни условия
- 2.2. Оценени са агрегационните потенциали на декстран и полиетилен гликол и концентрационните режими за работа в контекста на сравняване резултатите с тези в цялостна кръв
- 2.3. Въведени са нови индекси за оценяване на агрегационното поведение с дзета седиментационния метод и са тествани техните възможности за разделяне на клетъчните от извънклетъчните фактори, влияещи на агрегацията
- 2.4. С потвърди телен характер са електрофоретичните и електрооптични резултати, касаещи намалената концентрация на полимери в близост до повърхности (depletion layer)

Глава 7. Библиография

1. Василева А., Стоев С. Апаратура за изследване на електрофоретичните свойства на клетки. – Мед. техника, 1980, 1.
 2. Джанев И., С. Стоев, С. Йовчев, М. Методиева. Апарат за определяне на агрегацията на еритроцити. Авторско свидетелство № 6703 от 09.04.1991 г.
 3. Джанев, И., Петрова, Р., Стоилов, С., Авторско свидетелство № 38599, 1987, МПК G 01 N 33/48: Метод за определяне на деформируемостта на еритроцити. Изобретения, търговски марки, промишлени образци, бр. 1, 1986, Институт за изобретения и рационализации, София, стр.27.
 4. Димитров, Д., Стоев, С., Василева, А., Х. Дерменджиев. Неполаризуема електродна система за микроелектрофоретична апаратура. Бюл. изобр. и рационал., 1982, XVI, No. 2.
 5. Панайотов, И., С. Факиров, Химия и физика на полимерите, Университетско издателство „Св. Климент Охридски”, София, 2005 г., 610 стр.
 6. Стоев, С., Василева, А. Неполаризуема електродна система за микроелектрофоретична апаратура. – Изобр. и рационализ. в мед., 13, 1979, 6, 12.
-
1. American Heart Association. 2002 Heart and Stroke Statistical Update. Dallas, Texas: American Heart Association, 2001
 2. Ami RB, Barshtein G, Zeltser D, Goldberg Y, Shapira I, Roth A, Keren G, Miller H, Prochorov V, Eldor A, Berliner S, Yedgar S, Parameters of red blood cell aggregation as correlates of the inflammatory state. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280, 2001, H1982-1988.
 3. Antonova, N. P. Riha, I. Ivanov, Experimental evaluation of mechanical and electrical properties of RBC suspensions under flow. Role of RBC aggregating agent, *J. Clinical Hemorheology and Microcirculation*, Volume 45, Number 2-4 / 2010, Pages 253-261.
 4. Armstrong, J. K., Meiselman, H. J., Fisher, T. C. Covalent binding of poly(ethylene glycol) to the surface of red blood cells inhibits aggregation and reduces low-shear blood viscosity. *Am. J. Hematol.* 56, 1997, p. 26-28.
 5. Armstrong, J. K., Wenby, R. B., Meiselman, H. J. and Fisher, T. C., The Hydrodynamic Radii of Macromolecules and Their Effect on Red Blood Cell Aggregation, *Biophysical Journal* Volume 87, 2004, 4259–4270.
 6. Arnold, et al., K., Zschörnig, O., Barthel, D., and Herold, W. Exclusion of poly(ethylene glycol) from liposome surfaces. *Biochim.Biophys.Acta* 1022, 3, 1990, 303-310.

7. Bangham, A.D., Hill, M.W., Miller, N.G.A., Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. *Methods Membr. Biol.*, 1 1974, 1-68.
8. Baskurt O., H. Meiselman. *Blood Rheology and Hemodynamics. Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 29, 5, 2003, 435-450.
9. Başkurt O.K., Bor-Küçükataş, M., Yalçın, Ö., Meiselman, H.J., Armstrong, J.K. Standard aggregating media to test the “aggregability” of rat red blood cells. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 22, 2000, 161-166.
10. Baskurt O.K., Boynard, M., Cokelet G.C., Connes P, Cooke BM, Forconi S, Fulong L, Hardeman MR, Jung F, Meiselman HJ, Nash G, Nemeth N, Neu B, Sandhagen B, Shin S, Thurston G, Wautier J-L: New Guidelines for Hemorheological Laboratory Techniques. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 42, 2009, 75-97(b).
11. Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S, Fulong L, Hardeman MR, Jung F, Meiselman HJ, Nash G, Nemeth N, Neu B, Sandhagen B, Shin S, Thurston G, Wautier J-L: New Guidelines for Hemorheological Laboratory Techniques. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 42, 2009, 75-97.
12. Baskurt OK, Meiselman HJ: Red blood cell “aggregability”. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 43, 2009, 353-354.
13. Baskurt OK, Neu B, Meiselman HJ: *Red Blood Cell Aggregation (b)*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2011; 300 p.
14. Baskurt, O., Uyuklu, M., Ozdem, S. and Meiselman, H. Measurement of red blood cell aggregation in disposable capillary tubes. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 47, 2011, 295–305.
15. Baskurt, O.K., Farley, R.A., Meiselman, H.J. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study. *Am J Physiol* 273, 1997, H2604–2612.
16. Baskurt, O.K., Hardeman, M.R., Rampling, M.W., Meiselman, H.J. (Eds.): *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. Amsterdam • Berlin • Oxford • Tokyo • Washington, DC: IOS Press; 2007; 456 p
17. Başkurt, O.K., Tuğral, E., Neu, B., Meiselman, H.J. Particle electrophoresis as a tool to understand the aggregation behavior of red blood cells. *Electrophoresis* 23, 2002, 2103-2109.
18. Bäumlér H., B. Neu, E. Donath, H. Kiesewetter. Basic phenomena of red blood cell rouleaux formation. *Biorheology*, 1999, 439-442
19. Bäumlér, H., B. Neu, S. Iovtchev, A. Budde, H. Kiesewetter, R. Latza, E. Donath. Electroosmosis and polymer depletion layers near surface conducting particles are

- detectable by low frequency electrorotation. *Colloids and Surfaces, A*, 149: 1999; 389-396.
20. Bäumlér, H., I. Dzhenév, S. Iovtchev, R. Petrova, D. Lerche. Polarizability of human red blood cells and conformational state of glycocalyx. *Studia biophysica*, 125, 1988, 45-51.
 21. Bäumlér, H., Lerche, D., Paulitschke, M., Meier, W. Aggregation of red blood cells in hypotonic and hypertonic salt solutions determined by light back scattering technique. *Studia biophysica*, 115, 5, 1986, 5-16.
 22. Bäumlér, H., Makromolekül-induzierte Aggregation menschlicher Erythrozyten unter besonderer Berücksichtigung der Fließeigenschaften des Blutes und der Wirkung von Pharmaka. Dissertation B, Humboldt Universität, Berlin, 1988, pp. 220.
 23. Bentz, J., Nir, S. Title. *Bull. Math. Biol.*, 42, 1980, 191-220.
 24. Bishop, J.J., Popel, A.S., Intaglietta, M., Johnson, P.C. Rheological effects of red blood cell aggregation in the venous network: a review of recent studies. *Biorheology*, 38, 2001, 263-274.
 25. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 1976, 248-254.
 26. Bradley, A. J., Murad, K. L., Regan, K. L., Scott, M. D. Biophysical consequences of linker chemistry and polymer size on stealth erythrocytes: size does matter. *Biochimica et Biophysica Acta* 1561, 2002, p. 147-158.
 27. Brooks, D., Goodwin, J., Seaman, G. Rheology of erythrocyte suspensions: Electrostatic factors in the dextran-mediated aggregation of erythrocytes. *Biorheology* 11, 1974, p. 66-77.
 28. Bull, B., Brailsford, J. The Zeta sedimentation ratio. *Blood* 40, 1972, p. 550-559.
 29. C. van Oss, *Cell Biophysics*, 13 (1988) 141.
 30. C. van Oss, K. Arnold and W. Coakley, *Cell Biophysics*, 17 (1990) 1.
 31. Chien, S. Biophysical behavior of red cells in suspensions. In: Surgenor DM (ed) *The Red Blood Cell*. Academic Press. New York, 1975, pp 1031–1133.
 32. Chien, S., Jan, K-M. Ultrastructural basis of the mechanism of rouleaux formation. *Microvasc. Res.* 5, 1973, p. 155-166.
 33. Chien, S., Simchon, S., Abbot R.E., Jan, K.M. Surface adsorption of dextrans on human red cell membrane. *J. Colloid Interface Sci.* 62, 1977, 461–470.
 34. Chien, S., Sung, L. Physicochemical basis and clinical implications of red cell aggregation. *Clin. Hemorheology* 7, 1987, p. 71-91.

35. Chien, S., Sung, I., Simchon, S., Lee, M., Jan, K.-M., Skalak, R. Energy balance in red cell interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 416, 1984, p. 190-206.
36. Chien, S., Sung, L.A. Physicochemical basis and clinical implication of red blood cell aggregation. *Clinical Hemorheology*, 1987, 71-91.
37. Chien, S., *Thrombosis Research*, Electrochemical interactions between erythrocyte surfaces. *Suppl. II*, 8, 1976, 189-202.
38. Cohen J. A. and Khorosheva, V. A. Electrokinetic measurement of hydrodynamic properties of grafted polymer layers on liposome surfaces. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 195, 113-128.
39. Corry, W.D., Jackson L.J., Seaman, G.V. Action of hydroxyethyl starch on the flow properties of human erythrocyte suspensions. *Biorheology*, 20, 5, 1983, 705-717.
40. D. Brooks, *J. Colloid Interface Sci.*, 43 (1973) 714.
41. Dintenfass, L., *Rheology of Blood in Diagnostic and Preventive Medicine. An Introduction to Clinical Haemorheology*, Bittersworths, London, 1976, pp. 396. (на страница 59-60)
42. Düzgünes, N., Wilshut, J., Hung, K., Fraley, R., Perry, C., Friend, D.S., James, T.L., Papahadjopoulos, D. Physicochemical characterization of large unilamellar phospholipid vesicles prepared by reverse-phase evaporation, *BBA*, 732, 1983, 289-299.
43. Dzhenev, I., Petrova, R., Stoylov, A possible correlation of electro-optic changes with the deformability of erythrocytes. *Cell biophysics*, 1990, 16, 3, 160-168.
44. Dzhenev, I., Petrova, R., Stoylov, S. A possible correlation of electro-optic changes with the deformability of erythrocytes. *Cell biophysics*, 1990, 16, 3, 160-168.
45. E. Evans and D. Needham, *Macromolecules*, 21 (1988) 1822.
46. Eisenberg, M., Gresalfi, T., Ricchio, T., and McLaughlin, S. *Title Biochemistry*, 18, 1979, 5213-5223.
47. Evans, E.A., V.A. Parsegian, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 416, 1983,
48. Friedman, M.H., Bargeron, C.B., Deters, O.J., et al. Correlation between wall shear and intimal thickness at a coronary artery branch, *Atherosclerosis*, 68, 1-2, 1987, 27-33.
49. H. Bäumlér, *Promotion B*, Humbolt University, Berlin, 1988.
50. H. Bäumlér, R. Georgieva, B. Neu, V. Shilov, E. Knippel and E. Donath, *Elektrokinetic phenomena '96, Theory and Applications. International Symposium*, 30 September - 4 October 1996. Rome, Italy.
51. Ilieva, R., Marinov, M., Stoylov, S., Jovtchev, S., Model investigations on red blood cell aggregation with the zeta sedimentation approach – role of medium ionic strength and shearing conditions, *постер показан, X Юбилейна научна сесия по случай на 40*

- години Биологически факултет, 20-23 ноември 2003, София, България, Софийски университет “Свети Климент Охридски”, Програма и резюмета, Булвест 2000, София, стр. 184.
52. International Committee for Standardization in Hematology, ICSH (Expert panel on blood rheology), Guidelines on selection of laboratory tests for monitoring the acute phase response, *J. Clin. Pathol.* 41 (1988), 1203-1212.
 53. Jan, K.-M., Chien, S. Influence of the Ionic Composition of Fluid Medium on Red Cell Aggregation. *J. Gen. Physiol.* 61, 1973, 655-668.
 54. Jan, K.-M., S. Chien. Role of surface electric charge in red blood cell interaction. *J. Gen. Physiol.* 61, 1973, 638-654.
 55. Janzen, J., Song, X., and Brooks, D.E. Interfacial thickness of liposomes containing poly(ethylene glycol)-cholesterol from electrophoresis. *Biophys.J.* 70, 1, 1996, 313-320.
 56. Jay, A.W.L., Canham, P.B.J. Sedimentation of single human red blood cells. Differences between normal and glutaraldehyde fixed cells. *J. Cell. Physiol.* 80, 1972, 367-372.
 57. Jay, A.W.L., Canham, P.B.J., Tilsworth E., The rate of sedimentation of individual human red blood cells, *J. Cell. Physiol.* 78, 1971, 319-332.
 58. Jovtchev S., I. Dzhenev, St. Stoev, S. Stoylov. Role of electrical and mechanical properties of red blood cells for their aggregation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 164, 2000, 2-3, 95-104.
 59. Jovtchev, S., N. Hristova, S. Stoeff, T. Galabova and S. Stoylov, Investigations on the polymer induced aggregation of red blood cells, *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 23, 2009, 581-584.
 60. Jovtchev, S., Dzhenev, I., Stoeff, S. Model investigations on red blood aggregation with the zeta sedimentation approach – role of cell deformability and albumin. *Proceedings of the Eighth National Conference on Biomedical Physics and Engineering (with international participation)*, 2000, Sofia, Bulgaria, 12-14 October 74-77.
 61. Jovtchev, S., Hristova, N., Stoeff, S., Galabova, T. and Stoylov, S., Investigations on the polymer induced aggregation of red blood cells, *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 23, 2009, 581-584.
 62. Jovtchev, S., I. Dzhenev, H. Bäumlner, S. Stoeff, M. Marinov, S. Stoylov. Factors determining the electro-optical behaviour of red blood cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. and Eng.Aspects*, 209, 2002, 257–265.
 63. Jovtchev, S., Stoeff, S., Arnold, K., Zschörnig, O. Studies on the aggregation behavior of pegylated human red blood cells with the Zeta sedimentation technique, *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 39, 1-4, 2008, 229-233.

64. Jovtchev, S., Stoeff, S., Dzhenev, I. Model investigations on erythrocyte aggregation with the zeta sedimentation approach - role of concentration of aggregating substances in the medium and cell surface charge. Proceedings of the 7th national conference of biomedical physics and engineering (with international participation), Sofia, Bulgaria, 17-19 October, 1996, 95-97.
65. Kitamura, H. and Kawasaki, S. Detection and clinical significance of red cell aggregation in the human subcutaneous vein using a high-frequency transducer (10 MHz): A preliminary report. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 23, 1997, 933-938.
66. Knox, R., Nordt, F., Seaman G., Brooks, D. Rheology of erythrocyte suspensions, Dextran-mediated aggregation of deformable and nondeformable erythrocytes. *Biorheology* 14, 1977, p. 75-84.
67. Lerche D., H. Bäuml, G. Mills, G. Pöhlmann, Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung rheologischer Parameter. Wirtschaftspatent, DD 216104A1, 31.03.1983.
68. Lerche, D. Spontaneous aggregation of washed human erythrocytes in isotonic media of reduced ionic strength. Conclusions about the spatial arrangement of the n-terminal part of the glycophorins. *Biorheology* 19, 1982, 587-598.
69. Lerche, D., (*) Theoretical aspects of RBC aggregation and methods of experimental quantification
70. Lerche, D., Bäuml, H. Moderate heat treatment of only red blood cells (RBC) slows down the rate of RBC-RBC aggregation in plasma. *Biorheology*, 21, 1984, 393-403.
71. Lerche, D., Bäuml, H. Moderate heat treatment of only red blood cells (RBC) slows down the rate of RBC-RBC aggregation in plasma. *Biorheology*, 21, 1984, 393-403.
72. Lim., B., Bascom, P.A.J., and Cobbold, R.S.C. Simulation of red blood cell aggregation in shear flow. *Biorheology* 34, 1997, 423-441.
73. Maeda, N. and Shiga, T. Opposite effect of albumin on the erythrocyte aggregation induced by immunoglobulin G and fibrinogen. *Biochim.Biophys.Acta* 855:127-135, 1986.
74. McIntosh, T.J., Kenworthy A.K. and Needham, D. In: Chapter 7, Measurement of the range and magnitude of the repulsive pressure between PEG-coated liposomes, p. 63-71.
75. Meiselman, H., Red blood cell aggregation: 45 years being curious. *Biorheology* 46, 2009, 1-19
76. Meiselman, H.J., Baskurt, O.K., Sowemimo-Coker, S.O., Wenby, R.B., Cell electrophoresis studies relevant to red blood cell aggregation. *Biorheology* 36, 1999, 427-432.

77. Meiselman, H.J., Red Blood Cell Role in RBC aggregation 1963-1993 and beyond, *Clin. Hemorheol.* 13, 1993, 575-592.
78. Mills, P., D. Quemada, J. Dufaux. Etude de la cinetique d'agregation erythrocytaire dans en encoulement de Couette. *Rev. Phys. Appl.*, 15, 1980, 1357-1366.
79. Mills, P., Quemada, D., Dufaux, J., . Etude de la cinetique d'agregation erythrocytaire dans en encoulement de Couette. *Rev. Phys. Appl.*, 15, 1980, 1357-1366.
80. Neu B., Meiselmann, H. Depletion mediated red blood cell aggregation in polymer solutions. *Biorphysical Journal*, 2002, 2482-2490.
81. Neu, J.K. Armstrong, T.C. Fisher and H.J. Meiselman, Surface characterization of poly (ethylene glycol) coated human red blood cells by particle electrophoresis. *Biorheology*, 40(4), 477-487, 2003
82. Neu, J.K. Armstrong, T.C. Fisher, H. Bäumlér and H.J. Meiselman. Electrophoretic mobility of human red blood cells coated with poly(ethylene) glycol. *Biorheology*, 38(5/6), 2001, 389-403.
83. Pearson, M.J., Lipowsky, H.H., Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary venules of rat mesentery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279, 2000, H1460-1467.
84. Pribush,A., Meiselman, H,J., Meyerstein, D and Meyerstein, N. Dielectric approach to the investigation of erythrocyte aggregation. II. Kinetics of erythrocyte aggregation and disaggregation in quiescent and flowing blood. *Biorheology*,37, 2000, 429-441.
85. Rad, S., Gao, J., Baskurt, O.K., Meiselman, H.J., Neu, B., Depletion of high molecular weight dextran from the red cell surface measured by particle electrophoresis. *Electrophoresis* 30: 450-456, 2009
86. Reznikova, M. B., Adler, A. M., Postnov, Yu. V. Erythrocyte membrane sialic acids in primary and secondary hypertension in man and rat. *European Journal of Clinical Investigation*, 14, 2, 1984, 87–89.
87. S. Chien and K-M. Jan, *Microvasc. Res.* 5 (1973) 155.
88. Sabolovic, D., Sestier, C., Perrotin, P., Guillet, R., Tefit, M., Boynard, M. Covalent binding of polyethylene glycol to the surface of red blood cells as detected and followed up by cell electrophoresis and rheological methods. *Electrophoresis* 21, 2000, p. 301-306.
89. Sawchuk, A.P., Unthank, J.L., Dalsing M.C. Drag reducing polymers may decrease atherosclerosis by increasing shear in areas normally exposed to low shear stress *J Vasc Surg*, 30(4), 1999, 761-764.
90. Shiga, T., Maeda, N., Kon, K. Erythrocyte rheology. *Crit Rev Oncol Hematol*, 10,1990, 9-48.

91. Shu Chien, Laping A. Sung. Phisicochemical basis and clinical implication of red blood cell aggregation. *Clinical Hemorheology*, 1987, 71-91.
92. Smith S.C.Jr., Risk-reduction therapy: the challenge to change. *Circulation*, 93, 12, 1996, 2205-2211.
93. Snabre, P., Bäumlner, H., Mills, P. Aggregation of human red blood cells after moderate heat treatment. *Biorheology*, 22, 1985, 185-195.
94. Soutani, M., Suzuki, Y., Tateishi, N., and Maeda, N. Quantitative evaluation of flow dynamics of erythrocytes in microvessels: influence of erythrocyte aggregation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 268, 1995, H1959–H1965.
95. Stoylov, S.P., Colloid electro-optics: theory, techniques, applications, In series of monographs: Ottewill, R.H., Rowell, R.L. (Eds.), *Colloid Science*, vol. 5, Academic Press, London, 1991, p. 280.
96. Tateishi, N., Suzuki, Y., Cicha, I., Maeda, N. O₂ release from erythrocytes flowing in a narrow O₂-permeable tube: effects of erythrocyte aggregation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, 2001, H448-456.
97. Uematsu M, Kitabatake A, Tanouchi J, et al Reduction of endothelial microfilament bundles in the low-shear region of the canine aorta. Association with intimal plaque formation in hypercholesterolemia *Arterioscler Thromb* 11, 1, 1991, 107-115.
98. Van der Plaats, A., The Groningen Hypothermic Liver Perfusion System for Improved Preservation in Organ Transplantation, PhD-thesis University of Groningen, 2005, pp. 176.
99. van Oss, C.J., *Interfacial Forces in Aqueous Media*, 2nd Ed. CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 2006.
100. van Oss, C.J., *The Properties of Water and their Role in Colloidal and Biological Systems*, Series Editor Hubbard, A., *INTERFACE SCIENCE AND TECHNOLOGY*, Volume 16, Amsterdam, London, New York, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2008, pp. 224.
101. Warren, L. The thiobarbituric acid assay of sialic acid, *Biol. Chem.*, 234, 1959, 1971-1975.
102. Warren, L. Thiobarbituric acid assay of sialic acids, *Methods in Enzymology*, 6, 1963, 463-465.
103. Woodle, M.C., Collins, L.R., Sponsler, E., Kossovsky, N., Papahadjopoulos, D., and Martin, F.J. Sterically stabilized liposomes. Reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. *Biophys J.* 61(4), 1992, 902-910.

104. Yarnell, J.W.G., Baker, I.A., Sweetnam P.M., et al Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies *Circulation* 1991;83:836-844.

СПИСЪК

на публикации, участия на научни прояви, рационализации във връзка с дисертациония труд

на **СВЕТОСЛАВ МЕТОДИЕВ ЙОВЧЕВ**

главен асистент по биофизика

в Катедрата по медицинска физика и биофизика

на Медицинския факултет, МУ – София

на тема: **“МОДЕЛНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ АГРЕГАЦИОННОТО ПОВЕДЕНИЕ НА ЕРИТРОЦИТИ”**

А Публикации

1. **Jovtchev, S.**, Bäumler, H., Meier, W., Lerche, D., Petrova, R. Influence of ionic strength on the aggregability and deformability of human erythrocytes. *Studia biophysica*, 139, 2, 1991, 123-130. (Citation index = 0.494)
2. **Jovtchev, S.**, Stoeff, S., Dzhenev, I. Model investigations on erythrocyte aggregation with the zeta sedimentation approach - role of concentration of aggregating substances in the medium and cell surface charge. *Proceedings of the 7th national conference of biomedical physics and engineering (with international participation)*, Sofia, Bulgaria, 17-19 October, 1996, pp 95-97.
3. **Jovtchev, S.**, Djenev, I., Stoeff, S., Stoylov, S. Role of electrical and mechanical properties of red blood cells for their aggregation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 164, 2000, 2-3, 95-104. (Impact factor 2000 - 0.869; 2006 - 1.611; цитирана в 16 работи)
4. **Jovtchev, S.**, Dzhenev, I., Stoeff, S. Model investigations on red blood aggregation with the zeta sedimentation approach – role of cell deformability and albumin. *Proceedings of the Eighth National Conference on Biomedical Physics and Engineering (with international participation)*, 2000, Sofia, Bulgaria, 12-14 October 74-77.
5. **Jovtchev, S.**, Stoeff, S., Arnold, K., Zschörnig, O. Studies on the aggregation behavior of pegylated human red blood cells with the Zeta sedimentation technique, *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 39, 1-4, 2008, 229-233. (2006 – Impact factor - 1,242; цитирана в 6 работи)
6. **Jovtchev, S.**, Hristova, N., Stoeff, S., Galabova, T. and Stoylov, S., Investigations on the polymer induced aggregation of red blood cells, *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 23, 2009, 581-584.

Б. Участия на научни прояви

1. Bäumler, H., Dzhenev, I., **Jovtchev, S.**, Petrova, R., Lerche, D. Orientation and relaxation of red blood cells in the electrical field - an electrooptical study. *V-th International Symposium “Biophysics of Cell Surface”*, Poster, Kühlungsborn, GDR, 29 September - 03 October, 1988.

2. **Jovtchev, S.** and Stoeff, St. Human red blood cell aggregation in plasma and dextran containing suspending media – comparison of three method of measurement. 10th International Congress of Biorheology and 3rd International Conference on Clinical Hemorheology, Pécs, Hungary, July 18 - 22, 1999, Biorheology, vol. 36, 1-2, 1999, 106-107.
3. **Jovtchev, S.**, Arnold, K., Marinov, M. and Zschörnig, O. Electrophoretic Studies on Polyethylenglycol Grafted Liposomes. Vth National Congress on Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology (International participation and industrial exhibition incl.), 29-31 March 2001, Sofia, Bulgaria, Proceedings, p 154.
4. **Jovtchev, S.**, Stoeff, S., Dzhenev, I., Dikov, I., Hadjieva, S., Vretenarska, M., Trifonova, N., Tsaneva, M., Traykov, L., Marinov, M., Penev, M., The zeta sedimentation technique – a powerfull method to investigate red blood cell aggregation. Lecture read at 12th European Conference on Clinical Hemorheology, Sofia, Bulgaria, 22nd - 26th June, 2003; Program and book of abstracts, Sofia 2003, p.63.
5. Ilieva, R., Marinov, M., Stoylov, **S., Jovtchev, S.**, Model investigations on red blood cell aggregation with the zeta sedimentation approach – role of medium ionic strength and shearing conditions, постер показан, X Юбилейна научна сесия по случай на 40 години Биологически факултет, 20-23 ноември 2003, София, България, Софийски университет “Свети Климент Охридски”, Програма и резюмета, Булвест 2000, София, стр. 184.

В Рационализации

1. Дженев И., Стоев, С., **Йовчев, С.**, Методиева, М. Апарат за определяне на агрегацията на еритроцити. Авторско свидетелство № 6703 от 09.04.1991 г.

29.12.2011

Подпис:

(гл. ас. Светослав Методиев Йовчев)

за цитиранията на публикациите във връзка с дисертацията

на **СВЕТΟΣЛАВ МЕТОДИЕВ ЙОВЧЕВ**

главен асистент по биофизика

в Катедрата по медицинска физика и биофизика

на Медицинския факултет, МУ – София

на тема: **“МОДЕЛНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ АГРЕГАЦИОННОТО
ПОВЕДЕНИЕ НА ЕРИТРОЦИТИ”**

1. **Jovtchev, S.**, Djenev, I., Stoeff, S., Stoylov, S. Role of electrical and mechanical properties of red blood cells for their aggregation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 164, 2000, 2-3, 95-104. (2000 -IF - 0.869; 2006 - 1.611)

Цитирана в 16 работи от:

1. Markx, G.H., Alp, B., McGilchrist, A. Electro-orientation of *Schizosaccharomyces pombe* in high conductivity media. *Journal of Microbiological Methods* 50 (1), 2002, 55-62.
2. Xu, X.Q., Wang, R.K., Elder, J.B., et al. Effect of dextran-induced changes in refractive index and aggregation on optical properties of whole blood. *Physics in Medicine and Biology* 48 (9), 2003, 1205-1221.
3. Wang, R.K., Xu, X., Elder, J.B., Tuchin, V.V. Possible mechanisms for optical clearing of whole blood by dextrans. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* 4965, 2003, 84-94.
4. Li, J., Huang, Y.X., Ji, T., et al. Non-invasive in situ simultaneous measurement of multi-parameter mechanical properties of red blood cell membrane. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37 (6), 2005, 391-395.
5. Sangeetha, P., Balu, M., Haripriya, D., et al. Age associated changes in erythrocyte membrane surface charge: Modulatory role of grape seed proanthocyanidins. *Experimental Gerontology* 40 (10), 2005, 820-828.
6. Yang, M., Lim, C.C., Liao, R.L., et al. Oriented and vectorial patterning of cardiac myocytes using a microfluidic dielectrophoresis chip - Towards engineered cardiac tissue with controlled macroscopic anisotropy. *Journal of Microelectromechanical Systems* 15 (6), 2006, 1483-1491.
7. Wilk, A., Roskowiec, K., Korohoda, W. A new method for the preparative and analytical electrophoresis of cells. *Cellular & Molecular Biology Letters* 11 (4), 2006, 579-593.
8. Yun, Z., Tan, J.P., Xu, X.D. Study and Simulation Analysis on the Hurt Principle of the RBC Impact. *Journal of Biomedical Engineering Research*, 2006, 01
9. Yun, Z., Luo, J.W., Tan, J.P., Yang, Y.F. Experiment Study on the Impacting Hurt Between RBC and Solid Surface. *Journal of Biomedical Engineering Research* 25, 2006, 124-27.
10. Miao, X., Lin, L.Y. Opto-plasmonic tweezers for manipulation and rotation of micro/nano objects. *UWEE Tech Report Series, UWEETR-2006-0009*, 1-75.
11. Yang, M., Lim, C.C., Liao, R., Zhang, X. Oriented and vectorial patterning of cardiac myocytes using a microfluidic dielectrophoresis chip - Towards engineered cardiac tissue with controlled macroscopic anisotropy. *Journal of Microelectromechanical Systems* 15 (6), 2006, 1483-1491.
12. Yang, M., Zhang, X. Electrical assisted patterning of cardiac myocytes with controlled macroscopic anisotropy using a microfluidic dielectrophoresis chip. *Sensors and Actuators A-Physical* 135 (1), 2007, 73-79.
13. Kaliviotis, E., Yianneskis, M. On the effect of dynamic flow conditions on blood microstructure investigated with optical shearing microscopy and rheometry. *Proceedings of*

the Institution of Mechanical Engineers Part H-Journal of Engineering in Medicine 221 (H8), 2007, 887-897.

14. Korohoda, W., Wilk, A. Cell electrophoresis - A method for cell separation and research into cell surface properties. Cellular & Molecular Biology Letters 13 (2), 2008, 312-326.

15. Waligórska, A., Wianecka-Skoczeń, M., Korohoda, W. Reversible inhibition of movement in the amoebae Dictyostelium discoideum and its effect on chemoattractant recognition. Folia Biologica, Volume 56, Issue 3-4, 2008, Pages 123-151.

16. Masuda, M., Murata, K., Itoh, K., Naruto, S., Uwaya, A., Isami, F., Matsuda, H. Effect of Morinda citrifolia extract and its constituents on blood fluidity. Journal of Traditional Medicines 28 (2), 2011, 47-54.

2. **Jovtchev, S.**, Stoeff, S., Arnold, K., Zschörnig, O. Studies on the aggregation behavior of pegylated human red blood cells with the Zeta sedimentation technique, Clinical Hemorheology and Microcirculation, 39, 1-4, 2008, 229-233. (2006 - IF - 1,242)

Цитирана в 6 работи от:

1. Zhou Y, Liu J, Wang J, Wang Y, Sun P. Measurement of electrophoretic mobility of cardiomyocytes. Electrophoresis, 30(21), 2009, 3701-6.

2. Yang, G., Tang, S.-Q., Wang, J.-W. Modification with methoxy polyethylene glycol to grafts alleviates acute graft versus host disease severity in mice following haploidentical bone marrow transplantation, Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research , Volume 13, Issue 14, 2 April 2009, Pages 2783-2786

3. Antonova, N., Quantification and techniques of measurement of RBC aggregation and deformability, Boletim da SPHM Vol. 24 (2), 2009, 5-17. (Boletim of the Portuguese Society on Clinical Hemorheology and Microcirculation, vol.24(2), 2009, 5-17 ISSN 0872-4938)

4. Antonova N, Riha P, Ivanov I. Experimental evaluation of mechanical and electrical properties of RBC suspensions under flow. Role of RBC aggregating agent. Clin Hemorheol Microcirc, 45(2-4), 2010, 253-261.

5. Muzykantov V.R. Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by Mother Nature. Expert Opin Drug Deliv. 7(4), 2010, 403-27.

6. Bagnis, C., Chiaroni, J., Bailly, P., Elimination of blood group antigens: Hope and reality, British Journal of Haematology, Volume 152, Issue 4, February 2011, Pages 392-400.

Изказвам голямата си благодарност на Ръководителя ми чл. кор. проф. д-р Стоил Пешев Стоилов за неговата подкрепа, грижовност и безкрайно търпение по време на нашата съвместна работа.

Благодаря на Колегите от Катедрата по медицинска физика и биофизика за оказаната помощ и съдействие по време на нашата работа.

Благодаря на съпругата ми Габриеле Йовчев за подкрепата, обичта, търпението и стоицизма, с които ми помогна за написването на този труд.