

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ФИЗИКА И БИОФИЗИКА



Гл. ас. Светослав Методиев Йовчев
докторант на самостоятелна подготовка

**МОДЕЛНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ АГРЕГАЦИОННОТО
ПОВЕДЕНИЕ НА ЕРИТРОЦИТИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на

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 ИФХ на БАН

Научно жури:

Председател: доц. Д. Михов, дх - становище

Членове: акад. Проф. Ал. Петров, дфзн - становище

доц. Н. Антонова, дб - рецензия

доц. Тр. Трайков, дх – рецензия

чл. кор. проф. С. Стоилов, дхн - становище

2011

Дисертационният труд е написан на 87 страници. Той съдържа: 7 таблици и 36 фигури. В библиографията са включени 110 литературни източника, от които 6 са на кирилица.

Изследванията от дисертационния труд са извършени основно в Катедрата по медицинска физика и биофизика на МФ на МУ - София.

Дисертацията е обсъдена и насочена за защита на разширено заседание на Катедрата по медицинска физика и биофизика на МФ на МУ - София, където докторантът работи като главен асистент.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 21.02.2012 г. в сградата на предклиничните катедри, ул. Здраве, № 2.

Материалите по защитата се намират в стая № , в сградата на предклиничните катедри, ул. Здраве, № 2, четвърти етаж, средния коридор.

Номерата на фигурите и таблиците не съвпадат с тези от дисертационния труд!

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 изявиите 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 настоящата 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. Когато се говори за **агрегация** на еритроцитите в кръвната плазмата се има предвид обратимото образуване на комплекси от клетки, прилепени една към друга с широките си страни (както е в ролките от монети). Основен компонент на плазмата, отговорен за това явление е фибриногенът. Други фракции протеини - като имуноглобулините – също имат отношение към този процес. Някои високомолекулни водно разтворими полимери, използвани в разтвори, заместители на кръвната плазма – декстран, полиетиленгликолу, поливинил пиролidon и др – също могат да предизвикват този тип обратима агрегация.

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 (Charité) 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. Наложихме 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 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

Приложение 8 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София, изисква „цел, задачи, материали и методи“ да са „идентични с оригинала“. На дисертационния труд. Това е изпълнено на следващите страници.

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 хидроген 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 хидроген 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 (pH – 7.40 ± 0.05 , π - 300 ± 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 на разтворите са с аналитична чистота от фирмите Fluka, Serva, Sigma, Valerus. 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.

B 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.

B 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 концентрацията 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 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 със стъклени капилляри (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 °C, 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 невраминидаза. 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 °C (Lerche, D. et al. 1984). Ковалентното свързване на mPEG-SPA към външната повърхност на червените кръвни клетки в PBS (HCT = 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 невраминидаза 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 настрана 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 сialова киселина в еритроцитните мембрани: Сialовата 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 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ мембранен белтък или като % от стойността на контролните (респ. нетретирани) клетки. Получените от нас стойности (около 0.140 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ мембранен белтък = 140 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 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 обло дънна колба се смесват разтворите на отделните липиди в хлороформ, в желаното моларно съотношение и разтворителят се изпарява. Следва диспергиране 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 петкратно екструзия на липозомната суспензия, се получават LUV. Размерът им е определен въз основата 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 pH-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 капилярен тип вискозиметър. Измервани са времената на изтичане (5-10 пъти) на определен обем от течностите през капилярката на вискозиметъра при 25 °C. 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 приносът 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):

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{specific}}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red} = k_1 + k_2c + \dots$$

$[\eta]$ 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):

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

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 липозомни

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: $\mathbf{v} = \frac{l}{t} \left[\frac{m}{s} \right]$, е скоростта на движение в електричното поле, $\mathbf{E} = \frac{I\rho}{S} \left[\frac{V}{m} \right]$ 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 прихлъзване, 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. $\mathbf{D}_r = \frac{1}{6\tau}$, 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:

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

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

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

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

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

Времето на релаксация се увеличава с намаляване на деформируемостта на еритроцитите с максимална стойност между 28-33 sec (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 ($D = 1-R$).

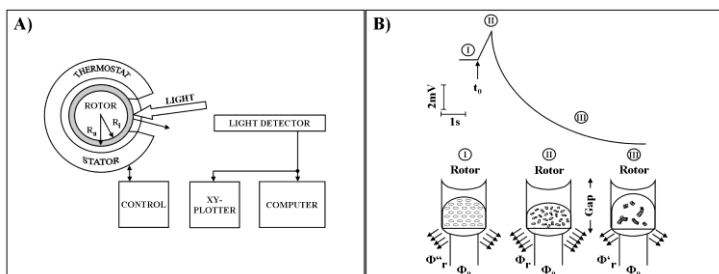
7. Изследване на агрегационното поведение на еритроцити

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. 1 са представени схематично апаратурата (А) и принципа на измерване (Б)



Фигура 1. Схема на апаратура (А) и принцип на измерване (В) 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, $\lambda_{\text{max}} = 960 \text{ nm}$, $\Phi_0 = 1058 \text{ mV}$, Метод агр. 1, А.) Интензитетът на отразената светлина от дезагрегираните, ориентираните и деформираните клетки се регистрира с фотопреобразовател (фаза I, фиг. XXX, 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. XXX, Б). Започващата сега агрегация на клетките води до намаляване на интензитета на светлинния сигнал (фаза III, фиг. XXX, Б). Дигитализираните стойности на интензитета на светлината във времето се описват със следното уравнение:

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

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 реструктуриране в такива с различна геометрична форма. Последният сумант представя интензитета на отразената светлина от агрегатите и останалите отделни клетки в крайното стационарно състояние. За характеризиране 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):

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

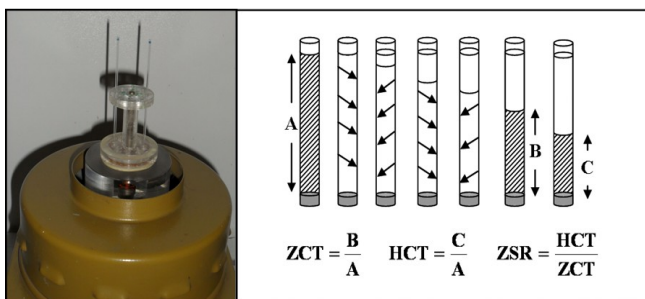
т.е. t_2 е времето, за което AI_S достига стойност 0.3. η_p е вискозитетът на средата в присъствие на полимер, респ. плазма, η_{PBS} е вискозитетът на PBS. Всички измервания са правени при $T = 25.0 + 0.2$ °C.

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.). Кръвните проби или еритроцитните суспензии се пълнят в стандартни тръбички с дължина 75 mm като се внимава стълбът течност да е непрекъснат и се запущват. 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– отгук



Фигура 2. 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 окупняват и с това ускоряват утаяването на клетките. Това се повтаря до общо 4 цикъла на въртене. Определя се обемната концентрация на еритроцитите, т.н. дзета крит (ZCT, фиг. 2) – т.е. обемът до който са опаковани и утаени клетките (измерван чрез височината на стълба клетъчна утайка в тръбичката – B) към общия обем на кръвната суспензия (измерван чрез височината на стълба суспензия (A). 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 дзета крит се определя като дзета седиментационно съотношение (ZSR). Дзета критът зависи от степента на утаяване на кръвните елементи. Кръвни проби, които агрегират бързо имат и висока скорост на утаяване и дават ниски стойности на дзета крита и оттам висок агрегационен индекс – ZSR. Обратно, неагрегиращите кръвни проби имат ниски нива на утаяване и поради това висок дзета крит и ниско дзета седиментационно съотношение.

Статистическата обработка е правена с MSEXcel, Instat и Prism Graph.

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. Разработена бе методика, като използвахме чужд опит. Резултатът е апаратурата , която ползваме и до днес (Дженев и съавт. 1991). Най-напред използвахме 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 (Ilieva, 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).

A Характеристики на метода:

1. Измервания в цялостна кръв

Оригиналният агрегационен индекс, който авторите на метода въвеждат е дзета седиментационното отношение (ZSR). Инструменталната прецизност на реологичните прибори обикновено се изчислява като коефициент на вариация (CV %). 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). Биологичната вариация се подразделя на интраиндивидуална и интериндивидуална. Първата се оценява с CV от няколкократно измервания на проба от един индивид. В рамките на 8 часа CV - е от порядъка на 5%, което е сравнимо с възможностите на оригиналната методика (Bull and Brailsford, 1972).

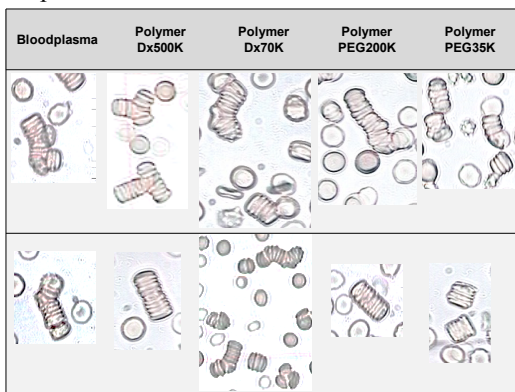
Биологичната интериндивидуална вариация на ZSR се оценява с коефициента на вариация от измерване на определен брой индивиди в рамките на една група: за четирикратно измерени оригинални кръвни проби от 61 здрави индивиди CV е 8.2 %. За същите проби скоростта на утаяване на еритроцити (ESR), методът използван рутинно в клиничните лаборатории и до днес, CV е около 60%. За сравнение, интериндивидуална вариация за един от широко използваните агрегатометри в миналото и сега на фирмата Murenne 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 за дзета седиментационния метод. Корелационната връзка 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. 2) $R^2 = 0.27$, а наклонът доста по стръмен. Тези резултати показват предимствата на нашата методика спрямо рутинно използваната в клиничните лаборатории.

Корелационната зависимост между стойностите ZSR без и с корекция за Hct е много достоверна ($R = 0.79$, $P=0.0001$, $N=280$) 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.

2. Измервания в среди с полимери

Основната част от резултатите, представени в тази работа, са от изследвания на агрегационното поведение на еритроцитите, суспендирани в разтвори на неутралните 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 („steth” липозоми, „steth” 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.



Фигура 3. 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.

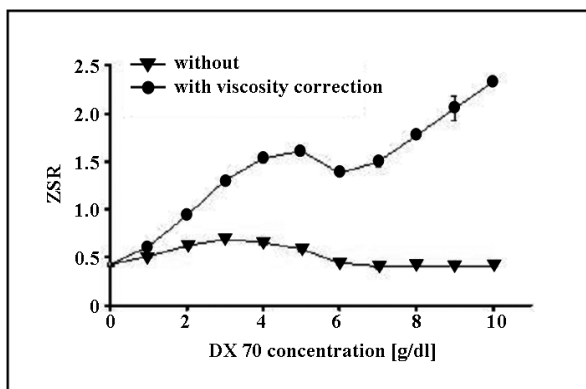
На микроскопските фотографии в горната фигура са представени типични агрегати от човешки еритроцити в различни среди. Вижда се типичният начин на свързване – с плоските страни.

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 скоростта на седиментация зависи принципно:

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

v – скорост на утаяване, g – земното ускорение, r – 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. 4) е представена зависимостта на ZSR, без и с корекцията за вискозитета на разтвори на Dx70K.



Фигура 4. Зависимост на ZSR от концентрацията на Dx70K – без (долната крива) и с 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 (hydroxyethyl starch) получени с оригиналната апаратура за мерене на ZSR (Corry et al. 1983). Затова по-нататък в нашите изследвания, корекция за вискозитета е правена само за концентрации на полимери до максимум на кривата, не само за декстраните но и за полиетилен гликол.

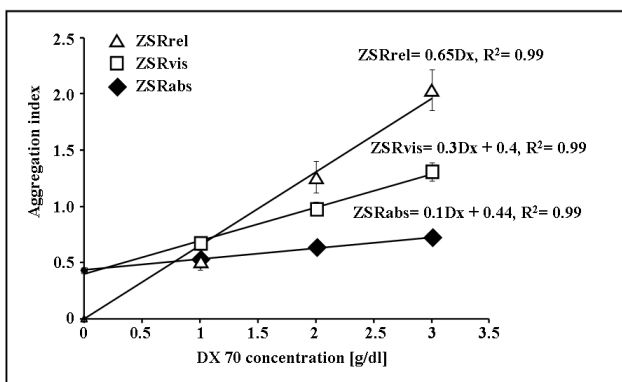
При количествената оценка на степента на агрегация е прието, стойностите на агрегационните индекси да се отнасят към условия, където агрегация не се осъществява, например когато клетките са суспендирани във буферизиран физиологичен разтвор (PBS). Затова ние винаги сме изследвали нашите кръвни проби в 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. 5 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 Myrenne, е 20-25% (Meiselman, 1993).

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-долу параметри.



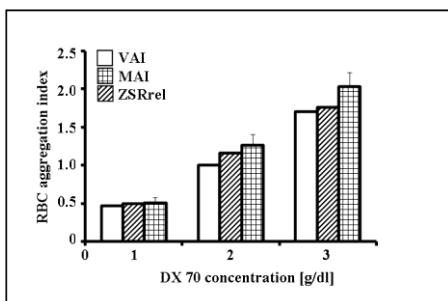
Фиг. 5. Зависимост на някои от агрегационните индекси от концентрацията на Dx70K в линейната област за здрави индивиди (N=59)

Той ще отразява изменението на агрегационния параметър за единица концентрация на полимера. И при наклона на регресионните прави за представените агрегационни индекси CV не надвишава 16%, най малък е този за ZSR_{rel} – 8.3%.

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. 6) е направена съпоставка на ZSR_{rel} 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.



Фигура 6. 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)

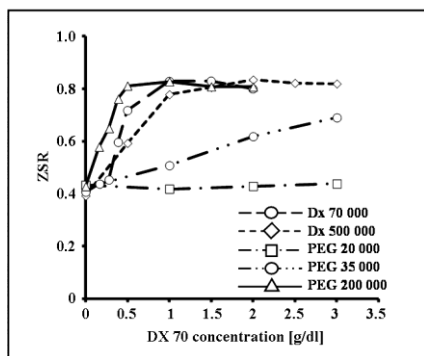
Агрегационният индекс за първия се означава като MAI, където се броя клетъчните единици (агрегати и отделни клетки) в кръвната проба с агрегиращ агент и се отнасят към броят им в неагрегираща среда – напр. PBS. При втория, означен от нас като VAI, се съпоставя вискозитетът на суспензията от еритроцити, 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.

Б Измервания в моделни условия

1. 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 фигура (Фиг. 7) са представени тези резултати. В областта от изследваните концентрации (0 – 3 g/dl)



Фиг. 7. 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). 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):

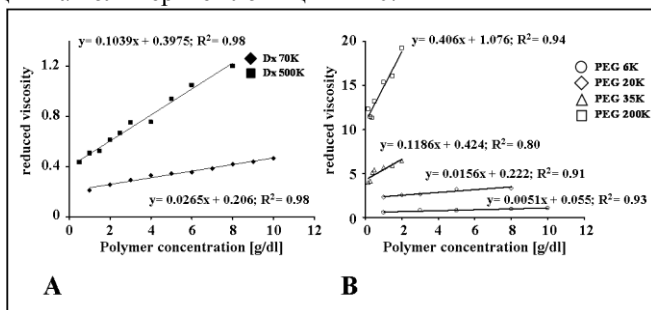
$$ZSR_{vis} = 1.843CFg + .464 \quad (r^2 = .994) \text{ and}$$

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

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

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). Следвайки тази теза ние определихме вискозиметрично размера на използваните от нас молекули.

На фиг. 8 са показани резултатите от вискозиметричното характеризиране на използваните от нас полимери. Граничният вискозитет се получава за концентрации на полимерите клонящи към 0.



Фигура 8. Зависимост на редуцирания вискозитет от концентрацията на полимери с различна молекулна маса: **А** – декстран, **В** – полиетилен гликол.

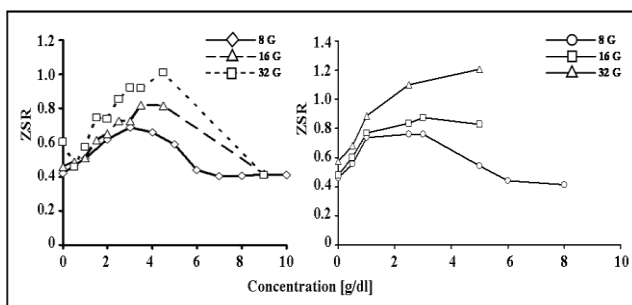
На графиките са представени и резултатите от линейната регресия съгласно уравнението на Хагинс (Huggins), с която са определени граничните вискозитети за отделните молекули. От получените стойности за $[\eta]$ сме определяли хидродинамичния радиус на молекулите. Те са представени в таблица 2.

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 хидратиранияте 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 по-евтини от апаратурата за квази-еластично разсейване на светлина, приложеният подход за количествено описание на свойствата на полимерите има сериозни възможности за приложение в медицинската практика.

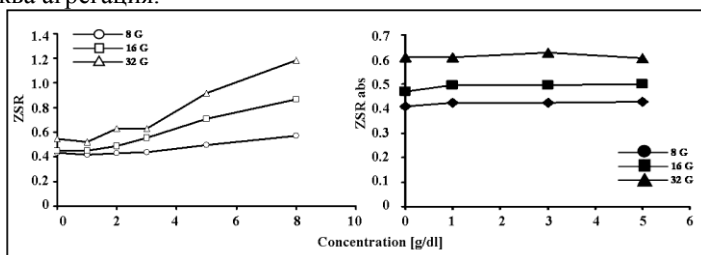
2. Роля на механичното притискане за агрегационното поведение на еритроцитите



Фигура 9. Зависимост на агрегационния индекс за еритроцити от концентрацията на DX 70K и DX 500K при различни сили на притискане на клетките към стената на капиларката.

Фигура 9 показва зависимостта на еритроцитния агрегационен индекс от концентрацията на DX 70 и DX 500 при различни сили на притискане на клетките към стената на капиларката. 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 по-силна агрегация. Тъй 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 (Chien, 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. 10) 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. 10, дясната графика), който в рамките на условията на експеримента не предизвиква агрегация.



Фигура 10. 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 е 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).

На това място ще отворим дума за механизма на агрегацията, предизвикана от макромолекули – плазмени белтъци или неутрални полимери.

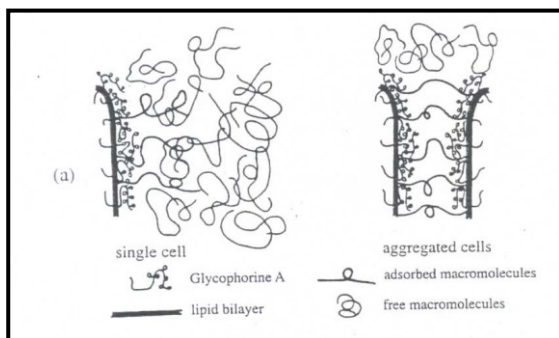
Модели за обясняване на агрегацията на еритроцити

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).

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 Chien и Jan и Brooks за

неутрални декстранови молекули индуциращи еритроцитна агрегация [Chien и Jan, 1973, Brooks, 1973].



Фигура 11. Схематично представяне на модела на омрежване (cross-bridging model). Вляво абсорбция на декстрини върху единична клетка; вдясно - образуване на напречни контакти между съседни клетъчни повърхности от полимерните молекули - води до формиране на монетни ролки от еритроцити [Baumler, 1999].

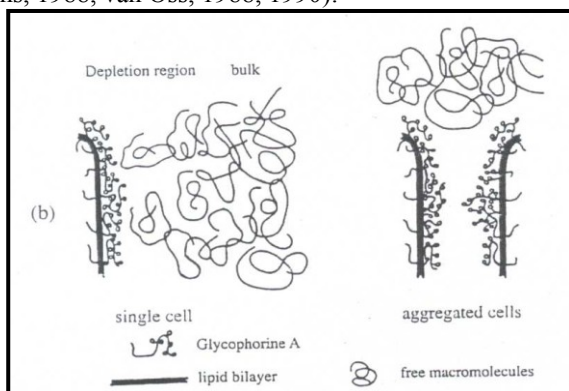
В този модел се постулира, че макромолекулата, (напр. декстранът (DX) - изграден от глюкозни единици, свързани с 1,6- α връзки или 1,3 и 1,4 връзки) или полиетиленгликола (PEG, изграден от етиленоксидни остатъци) са линейни, верижно подобни структури, които не абсорбират върху гликокаликса с цялата си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

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).



Фигура 12. Схематично представяне на модела 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 налягане в обемната фаза и тази непосредствено между клетките [Baumler, 1999].

Ако клетъчната повърхност е в контакт с полимерен разтвор и загубата на конфигурационна ентропия на полимера не е уравновесена от абсорбиционната 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 оръждаващия разтвор, в другия – по-малък.

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:

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

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

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

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

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

В таблицата по долу (табл. 3) 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. Това е ясно доказателство, че концентрацията на полимерните молекули близо до повърхността на еритроцитите е намалена в сравнение с обема на разтвора далече от повърхността. Тези резултати са в добро съвпадение с данни от електрофоретични измервания (Bäumler, et al. 1996; Meiselman, et al. 1999, Başkurt, et al. 2002, Rad, et al. 2009), както и от такива, получени с електро-ротационна методика

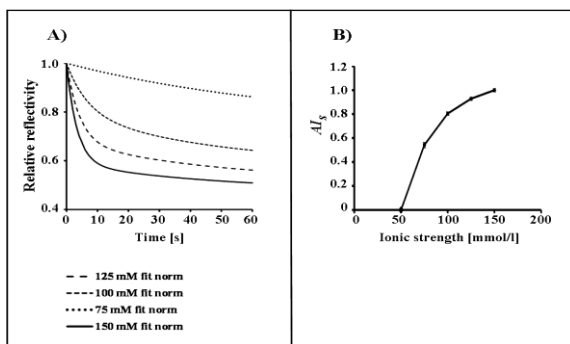
Таблица 3. Релаксационните времена (τ) за еритроцити, фиксирани с GA (GA – PBS), за различни концентрации на декстран в разтвора на Dx 75K, вискозитетите, измерените за обема на разтвора, и вискозитети, изчислени от релаксационните времена.

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

Тези резултати и показаните в работата данни за електрофореза на липозоми показват наличието на слой с намалена концентрация на полимер близо до повърхността на частиците. Нашите експериментални резултати подкрепят модела на ОМС.

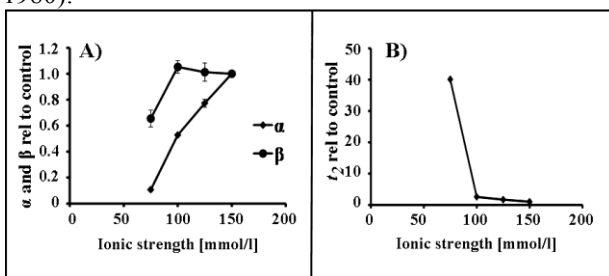
Влияние на йонната сила на средата върху агрегацията на еритроцити

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. На фиг. 13А. 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. 1В) и после не се променя във времето.



Фигура 13. Изследване агрегацията на еритроцити с метода, на отразяване на светлината. А Изменение на рефлексиралата 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 Dx 70K, 3 g/dl. Разликите са статистически достоверни, $P < 0.05$.

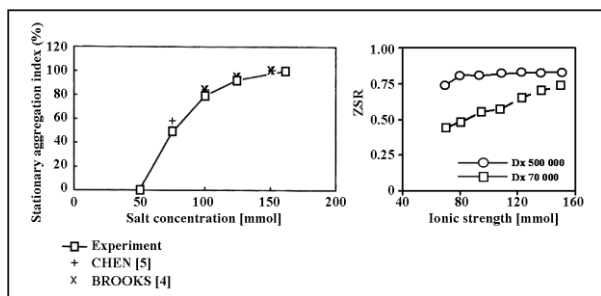
Кинетичните индекси, които описват агрегационното поведение на клетките са представени на фигурата отдолу. Вижда се ясно, забавянето на процеса на агрегация на клетките. Времоконстантите за образуването, както на малки, така и на големи агрегати, намаляват спрямо контролните суспензии. Най-чувствителен 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 14. 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 Dx 70K, 3 g/dl. Разликите са статистически достоверни, $P < 0.05$.

На следващата фиг. 15, графика вляво, са сравнени резултатите, получени от нас с метода на отразената светлина, и данни от литературата за същия агрегиращ агент (Dx 70K), 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

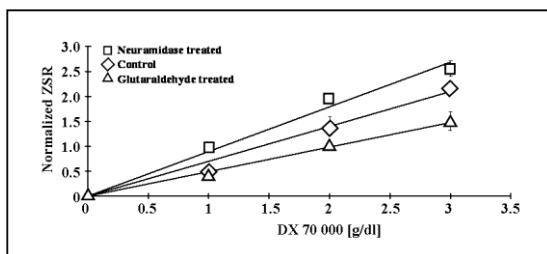
кривата за рефрактометричния метод (Берлин) и ZSR показва съпоставянето на резултатите за Dx 70K (фиг. графиката вляво) - при около 50 mmol/l клетките вече не агрегират. Подобни резултати са публикувани и в по-ново време (Pribush, et al. 2007; Neu, et al 2003). При 1 g/dl Dx 500K йонната сила почти не 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 Dx 500K е значително по-голям от този на 3 g/dl Dx 70K при ниска йонна сила, отколкото при физиологична.



Фигура 15. 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 Dx 70K; дясна графика, ZSR за 3 g/dl Dx 70K и 1 g/dl Dx 500K при различни йонни сили.

Клетъчни фактори, които влияят на процеса на агрегация на еритроцити

А Повърхостен електричен заряд. От клетъчни фактори на еритроцитите сме изследвали: повърхостния електричен заряд на външната повърхност на мембраната, деформируемостта и стерични особености на гликокаликса на клетки ковалентно декорирани с полиетилен гликол. Ролята на повърхостния електричен заряд (surface electric charge, SEC) сме изследвали, като сме третирали клетките с невраминидаза. Този ензим класически се използва за отстраняване на сиаловата киселина от повърхността на клетките. Деформируемостта на еритроцитите сме намалявали с глутаралдехид (GA) или чрез денатуриране на мембранните белтъци с висока температура (47-50 °C). На следващата фигура (фиг. 16) сме показали изменението на агрегацията за клетки с намалена деформируемост и намален повърхостен заряд.



Фигура 16. Агрегация на еритроцити с намалени повърхностен електричен заряд (N-RBC, инкубация с невраминидаза, 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 70K.

Вижда се, че намаленият SEC води до засилване на агрегацията, поради намаленото електростатично отблъскване (Jan and Chien, 1973, Chien, 1977). Втвърдените клетки показват намаление на агрегационната способност, вследствие на увеличаване на енергийния разход за деформация на клетките при образуване на агрегатите (Knox, et al 1977, Chien, 1976).

Наклонът на линейната регресия (даващ увеличението на ZSR за g/dl декстран) може да се използва като интегрален параметър на агрегируемостта на клетките.

На следващата фигура (фиг. 17) са сравнени, скалираните деформируемост (D) и сialова киселина (SA), т.е. отнесените спрямо стойността на нетретирани клетки, като ефект върху агрегацията на човешки еритроцити. Наклоните от линейните регресии ясно показват, че електричната компонента във междуклетъчното взаимодействие има по-силно влияние от механичната.

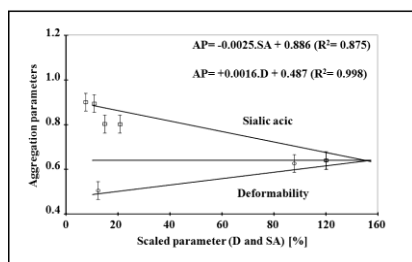
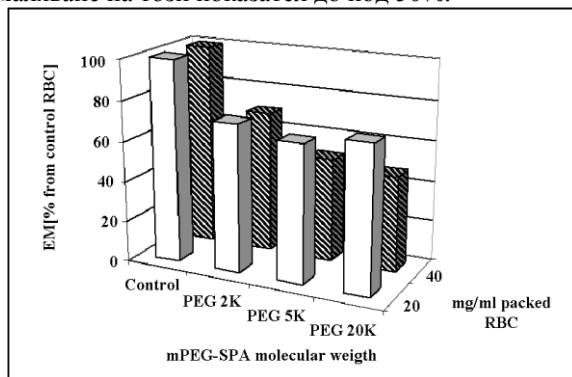


Fig. 17. Влияние на скалираните деформируемост (D) съдържание на сialова киселина (SA) в мембраната върху наклонът на правата от фиг. 16 – зависимостта на ZSR (коригиран за вискозитет и отнесен към стойността в PBS) от концентрацията на Dx 70K.

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. 18 показва данните от определянето на електрофоретичната подвижност на клетките (ЕМ). Вижда се, че с удължаване на веригата на PEG, закачени за повърхността на клетките ЕМ 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%.

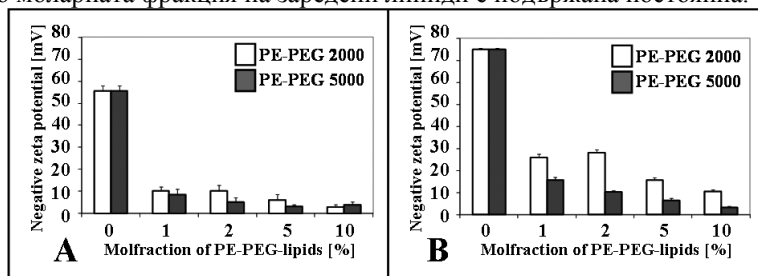


Фиг. 18. Електрофоретичната подвижност на еритроцити декорирани ковалентно с mPEG-SPA с различна дължина (2K, 5K и 20K), при различни условия на инкубация 20 и 40 mg/ml еритроцитен седимент).

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 ЕМ 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 ЕМ. 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 вероятно допълнително намалява електрофоретичната подвижност.

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. 19) са показани резултатите от определената електрофоретична подвижност на липозоми декорирани с PEG, където моларната фракция на заредени липиди е поддържана постоянна.

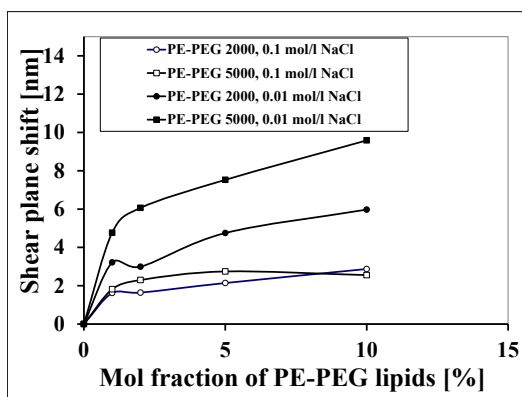


Фигура 19. Дзета потенциал на отрицателно заредени липозоми от EggPC/PS съдържащи различни молни фракции PE-PEG 2000 and PE-PEG 5000 в буферирен с HEPES (10 mmol/l, pH=7.4) при две различни йонни сили: А – NaCl 0.1 mol/l; В - NaCl 0.01 mol/l

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 *EM*. 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 молекулите на PEG, а не на промяна на електричния 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 (X^{PBS}) към вътрешността на разтвора (X^{PEG}):

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

κ е параметърът на Дебай.



Фигура 20. Изчислено отместване на равнината на прихлъзване 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. 19. В условията на по-висока йонна сила (0.1 mol/l NaCl) равнината на прихлъзване е почти 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 прихлъзване 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 фосфолипиди. 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 прихлъзване са изложени в таблица от долу.

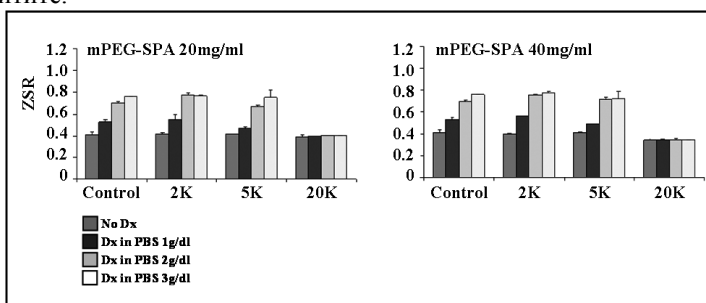
Таблица 4.. Сравняване на размерите на PEG веригите (nm), получени от дифракция на рентгенови лъчи [1], и отместването на равнината на прихлъзване, поради присъствието в мембраните на PE-PEG липиди с различни по дължина вериги.

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 ковалентно 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.

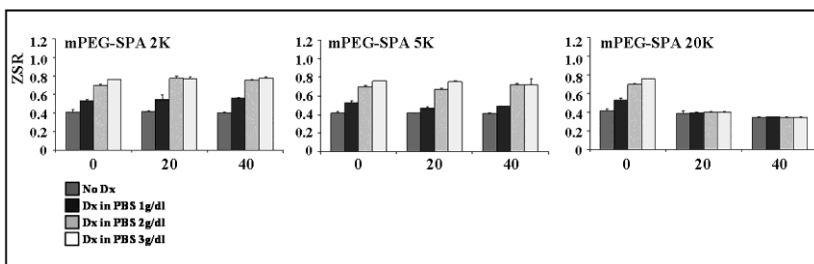
За изследване ролята на стеричните характеристики на мембрана за взаимодействието на клетките сме използвали дзета седиментационния метод. Като агрегиращ агент прилагаме D_x 70000 (D_x70K) в различни концентрации. Допълнително сме използвали различни по-големина сили на центрофугиране, с които да притискаме клетките една към друга и върху стената на тръбичката, за да оценим ефекта на стеричното пречене при взаимодействието между еритроцитите.



Фигура 21. Агрегационно поведение на еритроцити декорирани ковалентно с mPEG-SPA с различна дължина. Агрегиращ агент е D_x70K при различни концентрации. Относителната сила на центрофугиране е 8G.

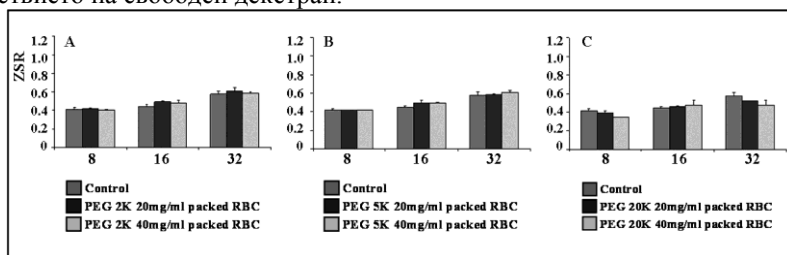
Увеличаване на концентрацията на декстран в средата засилва агрегацията на еритроцитите при всички суспензии с изключение на тези, където клетките са покрити с най-дългата верига mPEG-SPA. Модифицирането на повърхността на клетките с полимер води до намаляване на агрегационния индекс. Колкото по-дълга 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 (фиг. 22) 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 22. 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.

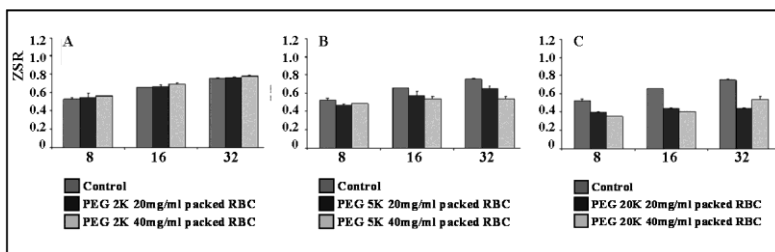
Забелязва се, че само най-дългата верига PEG (20K) предотвратява агрегацията и седиментацията, както е при суспензията от контролни клетки в отсъствието на свободен декстран.



Фигура 23. 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 : A – 2K; B - 5K; C - 20K. 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.

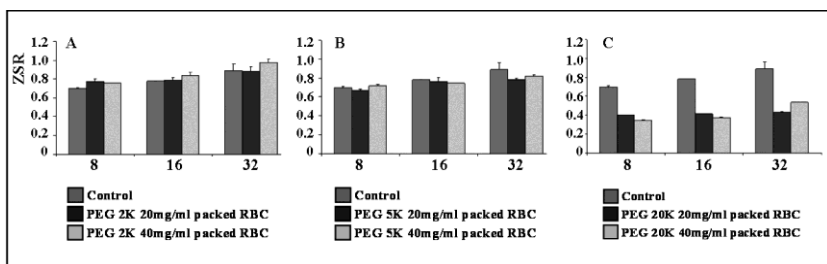
Дължината на полимерната верига и повърхностната плътност на сегментите ѝ са определящи за ефективността на стеричното „отблъскване” между клетките. В това отношение (в горната графика последната група – C, Фиг. 23) mPEG-SPA 20K, закрепен към повърхността на еритроцитите при концентрация 40 mg/ml клетъчен 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 24. 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 : A – 2K; B - 5K; C - 20K. Суспензионната среда съдържа 1 g/dl Dx70.

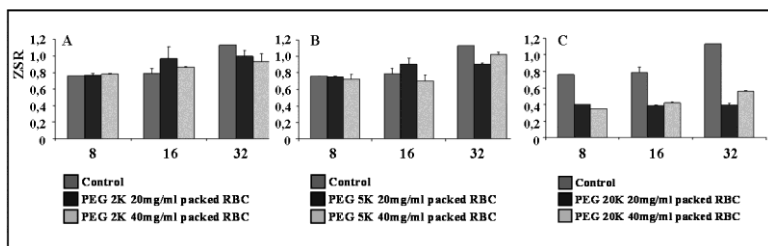
На фиг. 24 са представени резултатите от измерванията върху седиментационното поведение на декорираните с PEG еритроцити в присъствието на агрегиращ агент - Dx 70K, 1 g/dl, при различни сили на центрофугиране - 8G, 16 G, 32 G. Комбинирането на механичното притискане с агрегационния потенциал на свободния полимер води до увеличаване на агрегацията и седиментацията на контролите и покритите с PEG– 2K клетки (Фиг. 24A). Увеличаване на дължината на полимерната верига (PEG– 5K), 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– 20K), 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 третирани в среда с 20 mg/ml еритроцитен седимент, но по малко от нетретираниите клетки и тези покрити с по-късите вериги PEG (2K и 5K). 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. 25 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 нетретираниите клетки и тези покрити с PEG 2K. При еритроцитите декорирани с PEG 5K агрегацията е по слаба в сравнение с контролните клетки и тези покрити с PEG 2K. Ролята на степента на свързване на PEG с повърхността е по-слабо изразена. При 32 G

(Фиг. 25В) изглежда да се появява тенденцията стеричното пречене да намалява, както е за клетките декорирани с PEG 20K (Фиг. 23С и 24С). И тук засилването на агрегационната компонента присъства само при концентрации 40 mg/ml еритроцитен седимент в инкубационната среда.



Фигура 25. 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. 26) са представени резултатите, където концентрацията на Dx70 е увеличена до 3g/dl. Сега намаляване на ZSR се наблюдава и за най-късата верига (PEG 2K), 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.



Фиг. 26. 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. 25В) 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 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. За ново дефинираните от нас параметри - ZSR_{rel} (коригираната стойност за 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.

Таблица 5. Сравняване на чувствителността на различни агрегационни индекси за установяване достоверни разлики между група здрави индивиди и група болни от хипертония.

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	Norm
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
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 дефинираният индекс ZSR_{rel} показва по-добри възможности.

За разделяне влиянието на клетъчни от плазмени фактори е предложен индекс (Ami, et al.2001). Ние го формулирахме за нашата методика:

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

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

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

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

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

Съгласно тези дефиниции, $0 \leq PF \leq 1$. Когато $PF = 0$, няма плазмени приноси за агрегацията; когато $PF = 1$ измененията се дължат изцяло 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 g/dl Dx 70K. Получената стойност е 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.

Използвана литература:

Василева А., Стоев С. Апаратура за изследване на електрофоретичните свойства на клетки. – Мед. техника, 1980, 1.

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

Дженев, 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.

Димитров, Д., Стоев, С., Василева, А., Х. Дерменджиев. Неполяризуема електродна система за микроелектрофоретична апаратура. Бюл. изобр. и рационал., 1982, XVI, No. 2.

Панайотов, И., С. Факиров, Химия и физика на полимерите, Университетско издателство „Св. Климент Охридски”, София, 2005 г., 610 стр.

Стоев, С., Василева, А. Неполяризуема електродна система за микроелектрофоретична апаратура. – Изобр. и рационализ. в мед., 13, 1979, 6, 12.

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.

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.

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.

Bangham, A.D., Hill, M.W., Miller, N.G.A., Preparation and use of liposomes as models of cells. *Methods Membr. Biol.*, 1 1974, 1-68.

Başkurt O.K., Bor-Küçükataay, 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.

Baskurt O.K., Boynard, M., Coketlet 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).

Baskurt OK, Meiselman HJ: Red blood cell “aggregability”. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 43, 2009, 353-354.

Baskurt OK, Neu B, Meiselman HJ: *Red Blood Cell Aggregation* (b). Boca Raton, FL: CRC Press; 2011; 300 p.

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.

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.

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.

Bäumler, 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.

Bäumler, H., I. Dzhenev, S. Iovtchev, R. Petrova, D. Lerche. Polarizability of human red blood cells and conformational state of glycocalyx. *Studia biophysica*, 125, 1988, 45-51.

Bäumler, 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.

Bäumler, 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.

biological membranes, *Methods Membr. Biol.*, 1 1974, 1-68.

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.

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.

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.

Bull, B., Brailsford, J. The Zeta sedimentation ratio. *Blood* 40, 1972, p. 550-559.

- 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.
- Chien, S., Jan, K.-M.** Ultrastructural basis of the mechanism of rouleaux formation. *Microvasc. Res.* 5, 1973, p. 155-166.
- 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.
- Chien, S., Sung, L.** Physicochemical basis and clinical implications of red cell aggregation. *Clin. Hemorheology* 7, 1987, p. 71-91.
- 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.
- Chien, S., Sung, L.A.** Physicochemical basis and clinical implication of red blood cell aggregation. *Clinical Hemorheology*, 1987, 71-91.
- Chien, S.** Thrombosis Research, Electrochemical interactions between erythrocyte surfaces. *Suppl. II*, 8, 1976, 189-202.
- 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.
- 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.
- Dintenfass, L.** Rheology of Blood in Diagnostic and Preventive Medicine. An Introduction to Clinical Haemorheology, Bittersworths, London, 1976, pp. 396. (на страница 59-60)
- 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.
- 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.
- 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.
- H. Bäumlner, 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.
- 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.
- 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.
- Jan, K.-M., Chien, S.** Influence of the Ionic Composition of Fluid Medium on Red Cell Aggregation. *J. Gen. Physiol.* 61, 1973, 655-668.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Lerche D., H. Bäumlner, G. Mills, G. Pöhlmann, Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung rheologischer Parameter. *Wirtschaftspatent*, DD 216104A1, 31.03.1983.

Lerche, D., Bäumlner, 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.

Lerche, D., Bäumlner, 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.

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.

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.

Meiselman, H.J., Red Blood Cell Role in RBC aggregation 1963-1993 and beyond, *Clin. Hemorheol.* 13, 1993, 575-592.

Mills, P., D. Quemada, J. Dufaux. Etude de la cinétique d'aggregation erythrocytaire dans en encoulement de Couette. *Rev. Phys. Appl.*, 15, 1980, 1357-1366.

Mills, P., Quemada, D., Dufaux, J., Etude de la cinétique d'aggregation erythrocytaire dans en encoulement de Couette. *Rev. Phys. Appl.*, 15, 1980, 1357-1366.

Neu B., Meiselman, H. Depletion mediated red blood cell aggregation in polymer solutions. *Biorheology*, 2002, 2482-2490.

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

Neu, J.K. Armstrong, T.C. Fisher, H. Bäumlner and H.J. Meiselman. Electrophoretic mobility of human red blood cells coated with poly(ethylene) glycol. *Biorheology*, 38(5/6), 2001, 389-403.

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

- 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.
- 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.
- Snabre, P., Bäumlner, H., Mills, P.** Aggregation of human red blood cells after moderate heat treatment. *Biorheology*, 22, 1985, 185-195.
- 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.
- 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.
- Warren, L.** The thiobarbituric acid assay of sialic acid, *Biol. Chem.*, 234, 1959, 1971-1975.
- Warren, L.** Thiobarbituric acid assay of sialic acids, *Methods in Enzymology*, 6, 1963, 463-465.
- 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.

ИЗВОДИ

1. По прецизност и биологична вариация 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-мощният агрегиращ агент от двата полимера и неговият 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 еритроцитите с невраминидаза води до увеличаване на степента и ускоряване на процеса на агрегацията.
6. Използвайки електро-оптика на клетки и електрофореза на липозоми показваме, че в близост до повърхността на частиците съществува слой с намалена концентрация на полимер. Този факт подкрепя модела на ОМС (depletion layer) за агрегацията на еритроцити за неутралните полимери декстран и полиетилен гликол.
7. 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
8. 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, ефектът на стеричното пречене на полимерните вериги отслабва
9. Ново формулираните от нас агрегационни параметри показват по-добри възможности от оригиналния за методиката на ZSR при установяване връзките на агрегацията на еритроцити с плазмени и клетъчни фактори

Приноси

1. Научни приноси

1.1. Апробиран е седиментационен подход за изследване на агрегационното поведение на еритроцити, основан на увеличаване на механичното притискане на клетките една спрямо друга 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 потвърдителен характер са електрофоретичните и електрооптични резултати, касаещи намалената концентрация на полимери в близост до повърхности на липозоми и еритроцити (depletion layer)

СПИСЪК

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

на СВЕТОСЛАВ МЕТОДИЕВ ЙОВЧЕВ

главен асистент по биофизика

в Катедрата по физика и биофизика

на Медицинския факултет, МУ – София

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

А Публикации

1. **Jovtchev, S.**, Bäumlner, 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. Bäumlér, H., Dzhenév, 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., Dzhenév, 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:

Светослав Методиев Йовчев)

СПРАВКА

за цитиранията на публикациите във връзка с дисертацията

на **СВЕТΟΣЛАВ МЕТОДИЕВ ЙОВЧЕВ**

главен асистент по биофизика
в Катедрата по 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., Roskowicz, 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.

