

УДК 611.1; 532.5

АЛЬТЕРНАТИВНОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О КРОВИ И ПЛАЗМЕ КРОВИ В СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЕ

У. Виндбергер, Л. Нуар*

Венский медицинский университет, 1090 Вена, Австрия

* Университет Парижа-Сакле, 91191 Жиф-сюр-Иветт, Франция

E-mails: ursula.windberger@meduniwien.ac.at, laurens.noirez@cea.fr

Приведены результаты экспериментального исследования свойств крови. Для того чтобы обеспечить в эксперименте граничные условия, близкие к условиям, имеющим место в потоке крови, были выполнены измерения вязкоупругих характеристик на поверхности волокнистого слоя толщиной 10 нм, состоящего из белков внеклеточного матрикса. Установлено, что на кривой зависимости модуля сдвига от круговой частоты для натуральной цельной крови имеется плато. Показано, что в медленном потоке плазмы крови вблизи стенки сосуда может образоваться стационарный слой плазмы, способствующий увеличению функциональной толщины поверхностных слоев в сосудах. Напряжение сдвига, рассчитанное по скорости сдвига на стенке и вязкости крови, является неточным, если не учитывается наличие этого промежуточного слоя.

Ключевые слова: плазма крови, реология, межфазные силы, граничные условия, напряжения сдвига, эндотелиальный слой.

DOI: 10.15372/PMTF20220605

Введение. Жидкое состояние вещества является наиболее распространенным на Земле и играет важнейшую роль в жизненных процессах. В то же время это состояние наименее изучено. В микромасштабном течении проявляются необычные свойства жидкостей. Примером таких течений является поток жидкости в сосудистой сети, играющий основную роль в жизнеобеспечении организма. По-видимому, роль плазмы крови, остается недостаточно изученной. Плазма передает сдвиговое напряжение потока на мембраны эритроцитов, вызывая их подвижность и деформацию, что позволяет объединить ее поток с потоком эритроцитов [1]. Также плазма взаимодействует со стенкой сосуда и формирует крайний бесклеточный слой, который смазывает поток эритроцитов [2, 3]. Движущиеся эритроциты не касаются стенки ни *in vitro*, ни *in vivo*. Эритроциты всегда находятся на некотором расстоянии от стенки [4]. Поскольку этот бесклеточный слой влияет на характеристики потока, что подтверждается данными метаанализа крови пациентов [5], а также результатами экспериментов [6] по разжижению крови и изменению ее состава, необходимо исследование его биофизических свойств. Крайний слой плазмы не может представлять собой жидкость по всей его ширине. Он содержит люминальную область, в которой плазма течет вместе с эритроцитами, и область, в которой поток плазмы замедляется и останавливается. В проведенных ранее исследованиях о наличии неподвижного слоя вблизи эндотелиальных клеток свидетельствовали различия между приточным и отточным гематокритом [7]. Позднее этот слой был обнаружен в капиллярах мышц кремастера хомяка [8]. Характерными свойствами указанного слоя [9–11] являются просеивание мо-

лекул [12] и предотвращение избыточной фильтрации жидкости в интерстиций [13, 14]. Внутри волокнистой сети слоя эндотелиального гликокаликса содержится плазма. Этот слой, представляющий собой матрикс, защищает эндотелий от прилипания протромботических и воспалительных агентов [15, 16] и может уменьшаться при заболеваниях [17]. Жесткость данного слоя составляет приблизительно $0,3 \text{ пН/нм}$ [18], а кажущийся модуль Юнга приближенно равен 40 Па [19]. Значение вычисленного гидравлического сопротивления идентифицирует слой эндотелиального гликокаликса как существенно разбавленную матрицу макромолекул [20]. В настоящее время не известно, превышает ли толщина матричного слоя вследствие адсорбции макромолекул и образования эндотелиального поверхностного слоя ширину просвета [21]. Сложность определения состава неподвижного слоя на стенках сосудов обусловлена сложностью экспериментального определения длины хрупкого гликокаликса. Согласно имеющимся данным его ширина составляет от нескольких десятков до нескольких сотен нанометров [22]. Однако величина гидравлического сопротивления указывает на то, что ширина эндотелиального поверхностного слоя составляет несколько микрометров [4]. Таким образом, слой плазмы течет настолько медленно, что можно считать его неподвижным.

Целью экспериментов, результаты которых представлены в данной работе, являлось исследование вязких свойств крови и плазмы крови. Проведены динамические механические испытания плазмы, в которых обычные стальные поверхности [23] были заменены керамическими пластинами [24], предназначенными для улучшения взаимодействия образца и подложки, а следовательно, для оптимизации передачи напряжения сдвига через просвет. Было выбрано покрытие, которое моделирует граничное условие на разрушенной стенке артерии. Принцип реометрии заключается в определении зависимости силы реакции жидкости, подвергаемой динамическому механическому напряжению сдвига, от частоты ω . Жидкость заключена между двумя поверхностями, а механическое напряжение возникает в результате взаимодействия жидкости и субстрата и, следовательно, зависит от энергии взаимодействия образца и тестируемой поверхности, находящейся в контакте с жидкостью. Несмотря на то что принцип реометрии широко используется, граничные условия между подложкой и жидкостью часто не учитываются [25]. Увеличив силу взаимодействия жидкости с подложкой за счет использования высокоэнергетической подложки (керамики), имеющей хорошие смачивающие свойства, удалось обнаружить упругие свойства плазмы крови при сдвиге и показать, что на малых масштабах (несколько сотен микрометров) упругость плазмы увеличивается [26]. В работах [27, 28] показано, что граничные условия играют важную роль при определении реологических характеристик. Динамическая реакция жидкостей (в том числе вязких) в условиях полного смачивания может увеличиваться и приводить к проявлению вязкоупругих характеристик, аналогичных характеристикам твердого тела (рис. 1).

Наличие “статической” сдвиговой упругости в условиях стеснения ставит под сомнение адекватность классической модели вязкоупругости (модели Максвелла), согласно которой жидкость отличается от твердого тела отсутствием сопротивления напряжениям сдвига.

Влияние граничных условий на вязкоупругие характеристики свидетельствует о том, что жидкости нельзя описать одной универсальной вязкоупругой характеристикой [25]. Упругие свойства плазмы крови при сдвиге играют важную роль в формировании упругого слоя на поверхности эритроцитов позвоночных. Ореол, который был обнаружен в экспериментах, проведенных с использованием атомно-силового микроскопа, не только увеличивает функциональный размер клетки, но и замедляет поступление тепла в мембрану эритроцитов [29]. Таким образом, компоненты плазмы могут накапливаться на нескольких клеточных поверхностях, образуя упругую оболочку.

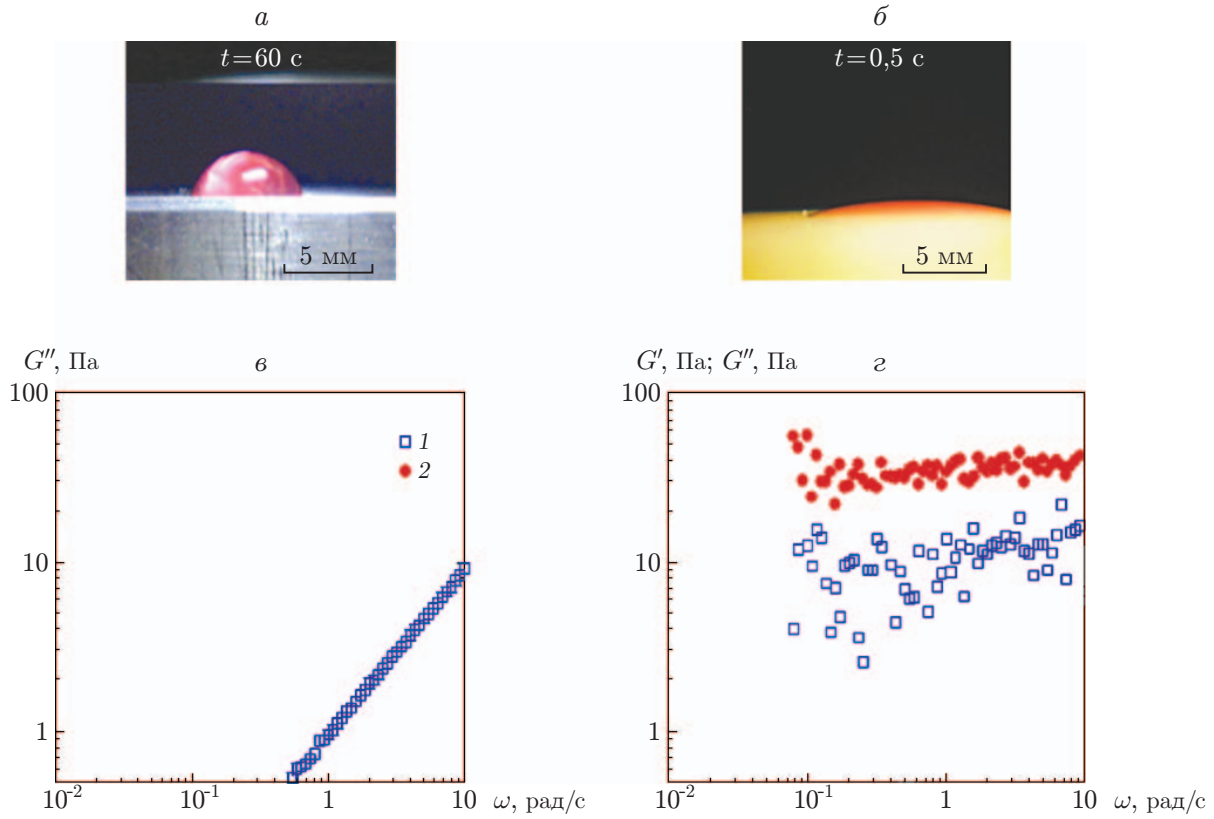


Рис. 1. Смачиваемость и упругость жидкости:

a, b — процесс образования капли глицерина (a — практически полная смачиваемость через 0,5 с (осаждение жидкости на поверхности алюминия)), b — полная смачиваемость (осаждение жидкости на поверхности непористой керамики)); v, z — зависимости модулей вязкости G'' (1) и упругости G' (2) от частоты при осаждении глицерина на различные поверхности (v — поверхность алюминия, z — поверхность керамики)

1. Материалы и методы, используемые в эксперименте. В экспериментах для определения частоты напряжения сдвига и ширины просвета были измерены характеристики вязкоупругости с использованием реометра Physica MCR301 с регулируемым напряжением (Anton Paar, Австрия). Кровь, заключенная между двумя параллельными пластинами диаметром 50 мм, нагружалась динамическим напряжением сдвига

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t)$$

(σ_0 — амплитуда напряжения сдвига; ω — частота), возникающим при синусоидальном движении пластины. Изменяя частоту приложенного синусоидального напряжения

$$\sigma(\omega) = \sigma_0 \sin(\omega t + \Delta\varphi)$$

($\sigma(\omega)$ — приложенное напряжение сдвига; $\Delta\varphi$ — фазовый сдвиг между волнами на входе и выходе), можно проанализировать влияние напряжения сдвига на динамику жидкости, определяя модуль упругости $G'(\omega)$ и модуль вязкости $G''(\omega)$:

$$\sigma(\omega) = \gamma_0(G'(\omega) \sin(\omega t) + G''(\omega) \cos(\omega t)).$$

Здесь γ_0 — амплитуда деформации, определяемая как отношение смещения к ширине зазора между пластинами. При использовании модулей G' и G'' предполагается, что волна напряжения сохраняет синусоидальную форму в процессе движения. В эксперименте было приложено постоянное напряжение сдвига, равное 10 мПа, частота варьировалась в диапазоне $0,3 \div 30,0$ рад/с, а ширина просвета была выбрана равной 0,7 мм.

При исследовании потока внутри ложного просвета рассеченной стенки аорты [30] пластины были покрыты гидрогелем, имитирующим соединительную ткань. Использовался очищенный децеллюляризованный порошок гидрогеля экстрацеллюлярного матрикса, полученный из хориона [31] и разбавленный фосфатным буфером (концентрация порошка равна 0,2 %). Часть порошка помещалась на поверхности реометрических пластин (нижний фиксатор — боратное стекло, верхний фиксатор — одноразовые пластины, изготовленные из белой жести с алюминиевым покрытием), после чего пластины медленно погружались в фосфатный буфер, находящийся в чашке Петри, при температуре, равной 37 °С. После инкубации в течение 2 ч пластины извлекались и располагались вертикально, буфер стекал в абсорбирующий материал в виде непрозрачной пленки на поверхности стекла. Затем пластины извлекались, путем регулирования двигателя подавлялась инерция верхней пластины, обусловленная дополнительным весом, а также была получена развертка по частоте для нативного образца крови человека (гематокрит — 42 %). Для сравнения были выполнены измерения вязкоупругих характеристик с использованием подложки из нержавеющей стали. Обе серии экспериментов были проведены при температуре, равной 37 °С.

2. Результаты исследования и их обсуждение. На рис. 2 представлены зависимости от частоты модуля упругости и модуля вязкости слоя (толщина 0,7 мм) цельной крови человека.

Вязкоупругая реакция, возникающая на поверхности, сравнивалась с соответствующей реакцией в случае поверхности из нержавеющей стали при тех же динамических условиях. Из приведенных результатов следует, что на кривой зависимости модуля упругости от частоты имеется плато на уровне 30 мПа при частотах, меньших 1 рад/с, в целом же кровь колеблется на всем промежутке, на котором она находится в контакте с белками внеклеточного матрикса. Отсутствие упругих свойств крови при сдвиге в контрольном эксперименте со стальными пластинами, в котором поведение крови подобно поведению вязкой среды, свидетельствует о влиянии покрытия. Определение области контакта протекающей взвеси крови с эндотелием является чрезвычайно сложной задачей. Течение крови всегда начинается на некотором расстоянии от мембраны эндотелиальных клеток, так как между ними находится твердый слой (рис. 3), уменьшающий пространство, доступное для

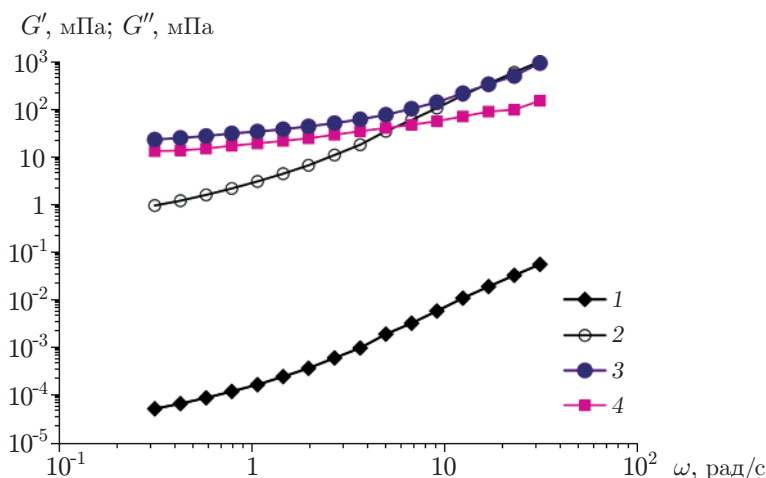


Рис. 2. Экспериментальные зависимости модуля упругости (1, 3) и модуля вязкости (2, 4) от круговой частоты, полученные для нативной крови человека с использованием пластины из нержавеющей стали без покрытия (1, 2) и пластины с нанесенным на нее покрытием (3, 4)

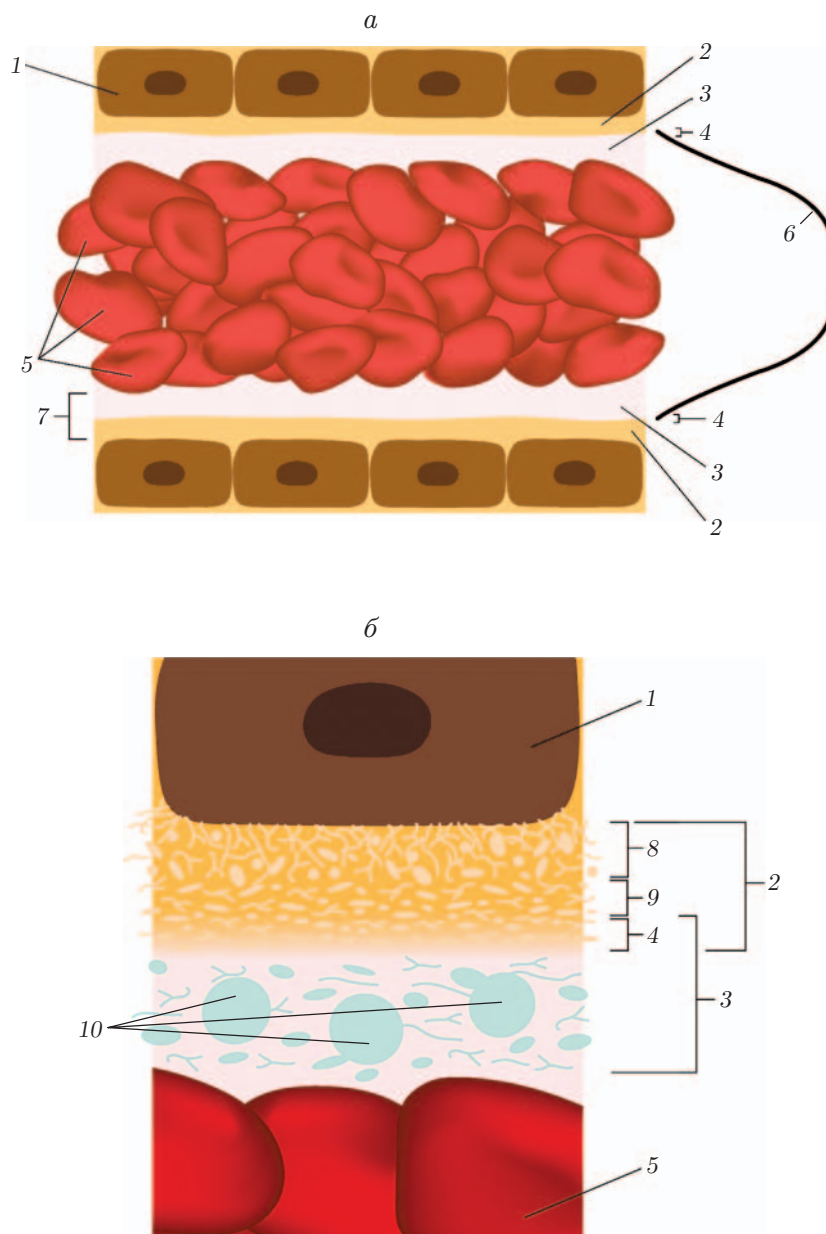


Рис. 3. Схема стационарного и подвижного слоев, примыкающих к эндотелиально-клеточной выстилке сосудов:

a — общий вид, *б* — увеличенный фрагмент; 1 — эндотелиальная выстилка, 2 — неподвижный свободный от клеток слой, 3 — подвижный свободный от клеток слой, 4 — граница между неподвижным и подвижным слоями, 5 — красные кровяные тельца, 6 — профиль потока, 7 — ширина свободного от клеток слоя, 8 — гликокаликс, 9 — молекулы адсорбированной плазмы, 10 — тромбоциты

потока крови [3]. Для того чтобы это пространство не уменьшалось, можно использовать покрытие альбумином, поскольку он способен связываться с клеточными поверхностями [32, 33]. С одной стороны, альбуминовое покрытие эффективно защищает эритроциты от лизиса под действием сил гидродинамического сдвига [34]. С другой стороны, сам по себе альбумин не образует поверхностный слой по всей длине [35]. В работе [26] установлено, что плазма крови, а не составляющие ее вещества может образовывать неподвижный слой при замедлении кровотока, в результате чего происходит адгезия этого слоя с субстратом, находящимся под ним. Этот вывод подтверждает концепцию о том, что слой эндотелиального гликокаликса может быть увеличен за счет просвета вследствие взаимодействия с компонентами плазмы [21]. Также этот вывод согласуется с новыми теоретическими моделями, в которых учитывается влияние стеснения [25, 36].

Таким образом, слои крови субмиллиметровой толщины, заключенные между двумя тонкими оболочками белков внеклеточного матрикса, обладают конечным пределом упругости. Наличие упругих свойств крови означает, что она может течь только в том случае, если напряжение превышает предельное значение. Это предельное значение зависит от граничных условий.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о важности учета межфазных условий, влияющих на характер течения в микроканалах. Такой учет необходим при выборе гемодинамических моделей для практических приложений.

Авторы выражают благодарность Сабрине Рорингер и Патрику Барони за помощь в проведении экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Dasanna A. K., Mauer J., Gompper G., Fedosov D.** Importance of viscosity contrast for the motion of erythrocytes in microcapillaries // *Front. Physiol.* 2021. V. 9. 666913. DOI: 10.3389/fphys.2021.666913.
2. **Freund J. B., Orescanin M. M.** Cellular flow in a small blood vessel // *J. Fluid Mech.* 2011. V. 671. P. 466–490. DOI: 10.1017/S0022112010005835.
3. **Yalcin O., Jani V. P., Johnson P. C., Cabrales P.** Implications enzymatic degradation of the endothelial glycocalyx on the microvascular hemodynamics and the arteriolar red cell free layer of the rat cremaster muscle // *Front. Physiol.* 2018. V. 9. 00168. DOI: 10.3389/fphys.2018.00168.
4. **Pries A. R., Secomb T. W.** Blood flow in microvascular networks // *Microcirculation.* 2008. P. 3–36. DOI: 10.1016/B978-0-12-374530-9.00001-2.
5. **Pries A. R., Secomb T. W., Sperandio M., Gaehtgens P.** Blood flow resistance during hemodilution: Effect of plasma composition // *Cardiovasc. Res.* 1998. V. 37. P. 225–235. DOI: 10.1016/S0008-6363(97)00226-5.
6. **Brands J., Kliner D., Lipowsky H. H., et al.** New insights into the microvascular mechanisms of drag reducing polymers: Effect on the cell-free layer // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. 1–10. DOI: 10.1371/journal.pone.0077252.
7. **Klitzman B., Duling R.** Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle // *Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.* 1979. V. 237. P. H481–H490.
8. **Vink H., Duling B. R.** Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries // *Circulat. Res.* 1996. V. 79. P. 581–589. DOI: 10.1161/01.RES.79.3.581.
9. **Weinbaum S.** Whitaker distinguished lecture: Models to solve mysteries in biomechanics at the cellular level; a new view of fiber matrix layers // *Annual Biomed. Engng.* 1998. V. 26. P. 627–643. DOI: 10.1114/1.134.

10. **Zhang X., Sun D., Song J. W., et al.** Endothelial cell dysfunction and glycocalyx — A vicious circle // *Matrix Biology*. 2018. V. 71. P. 421–431.
11. **Curry F. E., Michel C. C.** A fiber matrix model of capillary permeability // *Microvasc. Res.* 1980. V. 20. P. 96–99. DOI: 10.1016/0026-2862(80)90024-2.
12. **Siren E. M. J., Chapanian R., Constantinescu I., et al.** Oncotically driven control over glycocalyx dimension for cell surface engineering and protein binding in the longitudinal direction // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. 7581. DOI: 10.1038/s41598-018-25870-2.
13. **Crocket E. S.** Endothelial glycocalyx and the revised starling principle // *PVRI Chronicle*. 2014. V. 1. P. 41–46.
14. **Hu X., Weinbaum S.** A new view of Starling's hypothesis at the microstructural level // *Microvascular Res.* 1999. V. 58. P. 281–304. DOI: 10.1006/mvre.1999.2177.
15. **Gouverneur M., Van Den Berg B., Nieuwdorp M., et al.** Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: Effects of fluid shear stress // *J. Intern. Med.* 2006. V. 259. P. 393–400. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2006.01625.x.
16. **Broekhuizen L. N., Mooij H. L., Kastelein J. J. P., et al.** Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease // *Current Opin. Lipidol.* 2009. V. 20. P. 57–62. DOI: 10.1097/MOL.0b013e328321b587.
17. **Nieuwdorp M., Van Haeften T. W., Gouverneur M. C. L. G., et al.** Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo // *Diabetes*. 2006. V. 55. P. 480–486. DOI: 10.2337/diabetes.55.02.06.db05-1103.
18. **Wiesinger A., Peters W., Chappell D., et al.** Nanomechanics of the endothelial glycocalyx in experimental sepsis // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. 1–14. DOI: 10.1371/journal.pone.0080905.
19. **Bai K., Wang W.** Spatio-temporal development of the endothelial glycocalyx layer and its mechanical property in vitro // *J. Roy. Soc. Interface*. 2012. V. 9. P. 2290–2298. DOI: 10.1098/rsif.2011.0901.
20. **Secomb T. W., Hsu R., Pries A. R.** A model for red blood cell motion in glycocalyx-lined capillaries // *Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.* 1998. V. 274. P. H1016-1022.
21. **Pries A. R., Secomb T. W., Gaehtgens P.** The endothelial surface layer // *Pflugers Arch. Europ. J. Physiol.* 2000. V. 440. P. 653–666. DOI: 10.1007/s004240000307.
22. **Squire J. M., Chew M., Nneji G., et al.** Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: A possible explanation for molecular filtering? // *J. Structur. Biol.* 2001. V. 136. P. 239–255. DOI: 10.1006/jsbi.2002.4441.
23. **Ferry J.** Viscoelastic properties of polymers. N. Y.; Chichester; Bribane etc.: John Wiley and Sons, 1980.
24. **Brevet. 0510988. France, WO 2007/048890 A 1.** Procédé et dispositif pour la détermination d'au moins une propriété dynamique d'un matériau fluide ou solide déformable / P. Baroni, H. Mendil, L. Noirez. Dépôt 27.10.2005. Publ. 03.05.2007.
25. **Zaccone A., Noirez L.** Universal $G' \sim L^{-3}$ law for the low-frequency shear modulus of confined liquids // *J. Phys. Chem. Lett.* 2021. V. 12. P. 650–657. DOI: 10.1021/acs.jpcclett.0c02953.
26. **Windberger U., Baroni P., Noirez L.** Capillary-size flow of human blood plasma: Revealing hidden elasticity and scale dependence // *J. Biomed. Materials Res.* 2022. V. 110, iss. 2. P. 298–303. DOI: 10.1002/jbm.a.37286.
27. **Noirez L.** Probing submillimeter dynamics to access static shear elasticity from polymer melts to molecular fluids // *Polymers and polymeric composites: A reference series*. Berlin; Heidelberg: Springer, 2020. P. 1–23. DOI: 10.1007/978-3-642-37179-0_54-2.

28. **Noirez L., Baroni P.** Revealing the solid-like nature of glycerol at ambient temperature // J. Molec. Structure. 2010. V. 972. P. 16–21.
29. **Baier D., Müller T., Mohr T., Windberger U.** Red blood cell stiffness and adhesion are species-specific properties strongly affected by temperature and medium changes in single cell force spectroscopy // Molecules. 2021. V. 26. 2771. DOI: 10.3390/molecules26092771.
30. **Jafarinia A., Müller T. S., Windberger U., et al.** Blood rheology influence on false lumen thrombosis in type B aortic dissection // J. Biomed. Engng Biosci. 2020. V. 7. P. 13–24.
31. **Schneider K. H., Aigner P., Holnthoner W., et al.** Decellularized human placenta chorion matrix as a favorable source of small-diameter vascular grafts // Acta Biomaterialia. 2016. V. 29. P. 125–134. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.09.038.
32. **Reinhart S. A., Schulzki T., Reinhart W. H.** Albumin reverses the echinocytic shape transformation of stored erythrocytes // Clinic. Hemorheol. Microcirculat. 2015. V. 60. P. 437–449. DOI: 10.3233/CH-141899.
33. **Wall J., Ayoub F., O'Shea P.** Interactions of macromolecules with the mammalian cell surface // J. Cell Sci. 1995. V. 108. P. 2673–2682.
34. **Williams A. R.** The effect of bovine and human serum albumins on the mechanical properties of human erythrocyte membranes // Biochim. Biophys. Acta. 1973. V. 307. P. 58–64.
35. **Adamson B. Y. R. H., Clough G.** Plasma proteins modify the endothelial cell glycocalyx of frog mesenteric microvessels // Physiology. 1992. P. 473–486. DOI: 10.1113/jphysiol.1992.sp018934.
36. **Zaccone A., Trachenko K.** Explaining the low-frequency shear elasticity of confined liquids // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2020. V. 117. P. 19353–19655. DOI: 10.1073/PNAS.2010787117.

*Поступила в редакцию 26/V 2021 г.,
после доработки — 24/III 2022 г.
Принята к публикации 26/V 2022 г.*
