



БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

УДК 53.06; 612.117; 76.03.29

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ДИФФУЗНОГО РАСSEЯНИЯ СВЕТА И ОПТИЧЕСКОГО ЗАХВАТА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КРОВИ: АГРЕГАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

А. Н. Семенов, А. Е. Луговцов, К. Ли, А. А. Фабричнова,
Ю. А. Ковалева, А. В. Приезжев

Семенов Алексей Николаевич, аспирант кафедры общей физики и волновых процессов; младший научный сотрудник, Международный лазерный центр, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, semenov@physics.msu.ru

Луговцов Андрей Егорович, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник, Международный лазерный центр, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, anlug1@gmail.com

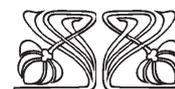
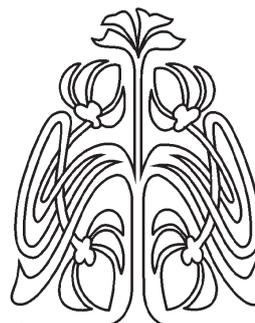
Ли Кисун, кандидат физико-математических наук, стажер-исследователь, физический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова; научно-технологический факультет, Саарский университет, Саарбрюкен, Германия, leekisung1991@gmail.com

Фабричнова Анастасия Анатольевна, аспирант кафедры физиологии и общей патологии, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, anastasia.fabrichnova@mail.ru

Ковалева Юлия Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения терапевтической эндокринологии, Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского, yulia.kovaleva@mail.ru

Приезжев Александр Васильевич, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры общей физики и волновых процессов; старший научный сотрудник, Международный лазерный центр, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, avr2@mail.ru

Параметры, характеризующие взаимодействие эритроцитов при их агрегации и дезагрегации, называемые агрегационными параметрами (АП), несут информацию о реологическом состоянии крови и могут служить диагностическими индикаторами различных патологических процессов в организме. Данные параметры могут использоваться для мониторинга общего состояния организма и эффективности лекарственной терапии сосудистых заболеваний. Использование оптических методов для исследования реологических свойств крови, в частности, для оценки способности эритроцитов агрегировать в покое и в потоке, позволяет проводить быстрые и точные измерения *in vitro* как на уровне большого числа клеток, так и на клеточном уровне. На макроуровне для измерения АП на ансамбле большого числа эритроцитов использовались диффузные методы светорассеяния, при которых анализировалась временная зависимость интенсивности лазерного излучения, рассеянного от образца цельной крови. На микроуровне исследования АП при взаимодействии отдельных клеток заключались в измерении сил агрегации и дезагрегации с помощью двухканальной системы оптического захвата. Были исследованы АП крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом (СД). Показано, что характерное время образования агрегатов эритроцитов в случае СД достоверно уменьшается, количество проагрегировавших клеток и гидродинамическая прочность агрегатов увеличиваются по сравнению с нормой. Достоверных отличий в способности эритроцитов деформироваться обнаружено не было.



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





Сила агрегации, возникающая при взаимодействии пары эритроцитов при их агрегации, в случае СД в 1.5 раза больше, чем у здоровых людей, при этом силы дезагрегации, которые необходимо приложить к агрегированному дублету клеток для их разделения, достоверно не отличаются. На основе результатов, полученных на макро- и микроуровне, сделан однозначный вывод о повышенной агрегации эритроцитов при сахарном диабете.

Ключевые слова: диффузионное светорассеяние, лазерный захват, агрегометрия эритроцитов при диабете, силы агрегации и дезагрегации, микрореологический статус при патологии.

DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-2-85-97

Введение

Изменения реологии крови на микро- и макроуровнях часто являются причиной и следствием многочисленных сосудистых заболеваний и в отдельных случаях могут привести к летальному исходу [1]. Наличие быстрого и простого метода измерения реологических свойств крови крайне важно для клинического использования, поскольку эти свойства в основном определяют течение крови в микрососудах (микроциркуляцию), а также могут служить количественными индикаторами общего состояния организма и использоваться для контроля эффективности терапии. Их изменения могут привести к нарушениям транспортных функций крови, что отрицательно отразится на снабжении органов и тканей кислородом и другими питательными веществами. Одним из важнейших свойств эритроцитов является их способность агрегировать [2].

Агрегационные параметры (АП) крови, характеризующие взаимодействие эритроцитов между собой, с другими клетками, а также со стенками кровеносных сосудов, могут существенно изменяться при возникновении различных социально значимых заболеваний, в частности сахарного диабета (СД) [3–6]. В качестве АП рассматривались характерное время образования агрегатов, индекс агрегации (доля эритроцитов, участвовавших в агрегационном взаимодействии), гидродинамическая прочность агрегатов, силы взаимодействия эритроцитов при их спонтанной агрегации и дезагрегации. Попытка классификации гемореологических нарушений по проценту неагрегированных эритроцитов приведена в работе [7]. Взаимодействие эритроцитов между собой заключается в двух обратимых процессах [8, 9]. При возникновении контакта между клетками происходит спонтанная агрегация эритроцитов, приводящая к образованию особых структур – так называемых «монетных столбиков». Под действием сдвигового напряжения в потоке крови образовавшиеся агрегаты

распадаются, происходит процесс дезагрегации. Динамика процессов агрегации и дезагрегации играет ключевую роль в микроциркуляции крови [10–12], в результате которой обеспечивается эффективный транспорт кислорода в клетки тканей и органов.

Оптические методы позволяют оперативно и эффективно исследовать АП на основе закономерности диффузного рассеяния лазерного излучения плотной суспензией эритроцитов [13, 14]. Для исследования АП на большом ансамбле клеток используются методы, основанные на измерении и последующем анализе интенсивности лазерного излучения, рассеянного от слоя цельной крови. Данный метод диффузного светорассеяния используется в ряде коммерчески доступных систем: лазерный оптический ротационный анализатор клеток LORCA («Mechatronics», Нидерланды) [15], лазерный агрегометр и деформометр эритроцитов LADE («Реомедлаб», Россия) [16], анализатор агрегации эритроцитов RheoScan («RheoScan-AnD300», «RheoMeditech», Республика Корея) [17], автоматический агрегометр эритроцитов FAEA (Mugenne, Германия) [18]. Для исследования АП на уровне отдельных клеток также разработан ряд методик, среди которых наиболее распространенными являются захват и удержание клеток с помощью микропипеток и атомно-силовая микроскопия [19, 20]. Следует отметить, что в этих методиках объекты для исследования подвергаются непосредственному механическому воздействию со стороны измерительного прибора.

Системы оптического захвата – так называемые лазерные пинцеты (ЛПП) – представляют собой альтернативный подход для выявления характеристик эритроцитов и их взаимодействия между собой [21–23]. Отличительной особенностью ЛПП является возможность измерения сил взаимодействия отдельных клеток без непосредственного механического контакта со стороны измерительной техники [21]. Возможность манипулирования клетками с помощью оптической ловушки позволяет измерять силы межклеточного взаимодействия в диапазоне значений 0,1–100 пН, в котором, в частности, представлены силы взаимодействия эритроцитов. Взаимодействие двух эритроцитов между собой с точки зрения возникающих между ними сил можно охарактеризовать с помощью двух сил: силы спонтанной агрегации, действующей на один эритроцит со стороны другого и приводящей к образованию агрегата (сила агрегации F_A); силы,



возникающей при разделении клеточного агрегата (сила дезагрегации F_D). Значения этих сил, которые могут служить важными диагностическими параметрами процессов агрегации эритроцитов при диагностике и мониторинге различных заболеваний, находятся в диапазоне 1–10 пН, что дает возможность их измерения с помощью ЛП.

На сегодняшний день задача измерения АП с целью уточнения реологического состояния крови в норме и при СД является крайне актуальной. Измерения, проведенные на больших группах здоровых людей и больных СД, позволят выявить новые биофизические индикаторы состояния болезни и эффективности лечения, которые прежде не были задействованы в медицинской практике.

Целью данной работы является оценка изменений АП крови больных СД в сравнении с нормой методами диффузного светорассеяния на ансамбле клеток и с помощью системы оптического захвата на клеточном уровне.

1. Материалы и методы

Измерения реологических свойств крови, которые характеризуют агрегацию эритроцитов, проводились на уровне ансамбля эритроцитов, где измерения выполнялись на цельной крови (макроуровень), а также на уровне взаимодействия двух клеток (клеточный микроуровень) в сильноразбавленной суспензии эритроцитов в плазме крови. Преимущества такого подхода заключаются в том, что, с одной стороны, макроуровневые измерения дают усредненные по большому числу клеток величины параметров агрегации крови без учета индивидуальных особенностей эритроцитов по форме и возрасту. С другой стороны, измерения на клеточном уровне позволяют учесть различия в форме клеток, их возрасте, проследить в режиме реального времени образование дублета клеток, выявить механизмы и факторы изменения агрегации.

Измерение диффузного рассеяния света на цельной крови позволяет получать усредненные параметры агрегации эритроцитов, характеризующие среднее время образования агрегатов, их гидродинамическую прочность, способность клеток деформироваться в сдвиговом потоке, а также определять процентное соотношение клеток, участвующих в агрегации. Метод оптического захвата позволяет манипулировать отдельными клетками, измеряя силы взаимодействия эритроцитов, возникающих при их агрегации и дезагрегации. Совокупность полученных параметров агрегации и дезагрегации эритроцитов на обоих уровнях позволяет оценить полную

картину протекающих при агрегации и дезагрегации клеток процессов, выявить факторы, способствующие усилению или ослаблению межклеточного взаимодействия.

1.1. Измерения реологических параметров крови человека в норме и при сахарном диабете

Все измерения на образцах цельной человеческой крови и суспензии эритроцитов были выполнены *in vitro*. При проведении исследований учитывались последние рекомендации для гемореологических лабораторий, разработанные международной экспертной группой, созданной для стандартизации гемореологических методов [24]. Измерения агрегационных параметров эритроцитов проводились в течение первых трех часов после забора крови из локтевой вены добровольцев натощак. Во всех пробах крови в качестве антикоагулянта применялся ЭДТА (EDTA) для предотвращения свертываемости крови и образования тромбов. Измерения проводились при температуре 37°C, что соответствует физиологическим условиям в организме человека.

Всего было выделено 2 группы: добровольцы в возрасте 20–35 лет без хронических заболеваний и СД (контрольная группа, 10 человек) и пациенты с СД в возрасте 50–70 лет (экспериментальная группа, 10 человек).

Доноры крови были в полной мере проинформированы о целях исследования, им были разъяснены ожидаемые результаты, они подписали добровольное согласие на взятие у них крови и проведение испытаний.

Статистическая обработка полученных результатов испытаний была проведена с использованием программного обеспечения Statistica. Для анализа использовался непараметрический статистический U-критерий Манна–Уитни, который пригоден для оценки достоверности различий между двумя независимыми выборками – между контрольной группой здоровых доноров и группой больных СД [25, 26]. Различия между измеренными значениями параметров агрегации считались статистически достоверными при уровне статистической значимости $p < 0.05$.

1.2. Измерение сил взаимодействия эритроцитов в норме и при сахарном диабете с помощью системы оптического захвата

Для проведения измерений сил взаимодействия эритроцитов была собрана двухканальная система оптического захвата. Схема экспериментальной установки приведена на рис. 1.

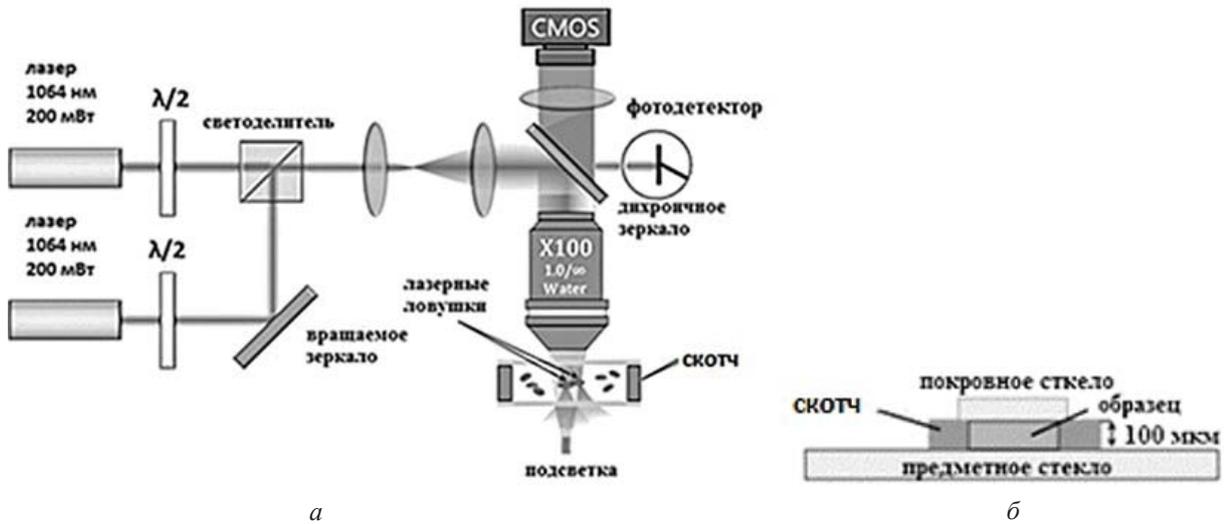


Рис. 1. Схема экспериментальной установки: *а* – двухканальная система оптического захвата, *б* – кювета с образцом

В качестве источников излучения использовались два Nd:YAG лазера с длиной волны 1064 нм и мощностью 200 мВт каждый. Положение лазеров, светоделительный куб и система линз на пути распространения пучков были отъюстированы с высокой точностью для достижения высокого градиента интенсивности в области фокусировки пучка (расположение лазерных ловушек на рис. 1, *а* указано стрелками). На выходе пучка из системы линз установлено дихроичное зеркало, с помощью которого пучок подается на заднюю входную апертуру объектива Olympus ($\times 100$, N.A. = 1, водная иммерсия), а также частично пропускается на фотодетектор для измерения мощности. Регулировка мощности пучков происходит с помощью полуволновых пластинок, установленных непосредственно после лазеров. К пластинкам подключены электрические моторы, способные прецизионно вращать их с малым шагом вращения. Один пучок всегда неподвижен, на пути второго пучка установлено зеркало, вращение которого позволяет перемещать область фокусировки пучка, меняя тем самым положение точки захвата. Таким образом используются 2 области захвата (2 ловушки): одна неподвижная, другая может перемещаться в кювете с образцом. В вертикальной части системы установлены линза и CMOS-камера, освещаемые белым светом лампы, установленной за объективом и кюветой с образцом.

Кювета, схема которой изображена на рис. 1, *б*, размещается на моторизированной платформе. Кювета состоит из предметного и покровного стекол, помещенных одно над другим, расстояние между которыми равно 100 мкм за счет двух-

сторонней клейкой лентой Scotch между стеклами по двум краям. Образец помещается в полость кюветы между стеклами с помощью микродозатора. После этого полость герметизируется с помощью вазелина с двух незакрытых скотчем краев для предотвращения возникновения нежелательных потоков и испарения образца.

Перед проведением измерений сил взаимодействия была выполнена процедура калибровки установки, необходимая для определения однозначной взаимосвязи значений силы оптического захвата $F_{\text{ОПТ}}$ с мощностью лазерного пучка. Калибровка проводилась путем сопоставления $F_{\text{ОПТ}}$ с силой вязкого трения, действующей на захваченную ловушкой клетку со стороны жидкости при перемещении платформы с кюветой с заданной скоростью относительно неподвижной ловушки, для различных значений мощности лазерного пучка. Более подробно эта процедура описана в работе [27]. Максимальная сила захвата составляла 12 пН при мощности лазерного пучка в области фокуса 25 мВт. В этих условиях нагреванием клетки от лазерного захватывающего пучка можно пренебречь ввиду очень низкого поглощения эритроцита на длине волны лазера, используемого для захвата (коэффициент поглощения гемоглобина $\mu_a = 10 \text{ см}^{-1}$), и наличия большого объема теплоотводящей жидкости (плазмы) вокруг клетки. Теоретические оценки показывают, что нагрев захваченных клеток не превышает 1°C на каждые 10 мВт мощности лазерного пучка [28].

Для проведения измерений сил взаимодействия с помощью ЛП требуется сильноразбавленная суспензия эритроцитов с малым содержанием клеток. Разбавление осуществлялось в



аутологичной плазме с концентрацией клеток в объеме конечной пробы около 0.05%. Плазма была получена при помощи центрифугирования по следующей схеме: 1 – центрифугирование в

течение 5 мин при 600 g; 2 – двукратное центрифугирование по 5 мин при 11 000 g.

Процедура измерения силы F_A состояла из трех последовательных операций (рис. 2).

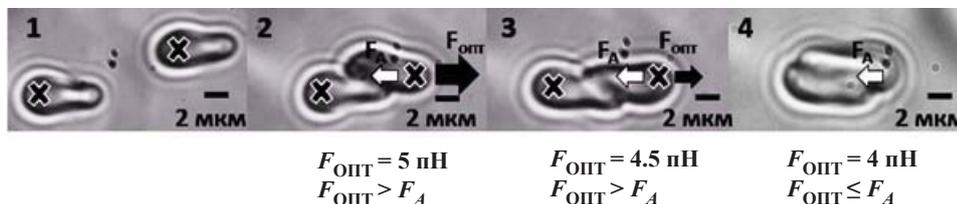


Рис. 2. Набор микрофотографий, иллюстрирующих пошаговую методику измерения силы агрегации эритроцитов. Крестовыми метками указаны положения оптических ловушек, стрелки указывают направления приложенных сил (F_A – белая стрелка, $F_{\text{ОПТ}}$ – черная стрелка)

В ходе первой операции два эритроцита захватывались с помощью ЛП и ориентировались параллельно путем передвижения платформы, на которой расположена кювета с суспензией эритроцитов. Один из эритроцитов захватывался неподвижной ловушкой (пучком), а второй – подвижной ловушкой. Силы взаимодействия при агрегации и дезагрегации зависят от площади изначального соприкосновения [29], поэтому для достижения адекватной повторяемости результатов выполнялся визуальный контроль неизменности площади перекрытия при первичном контакте клеток в процессе всех измерений. На 2-м шаге клетки с помощью подвижной ловушки приводятся в контакт таким образом, чтобы площадь взаимодействия составила порядка 40% от площади поверхности каждой клетки. Далее, на 3-м шаге, мощность подвижного лазерного пучка уменьшается, тем самым уменьшается сила оптического захвата $F_{\text{ОПТ}}$, удерживающая эритроцит в ловушке. Мощность пучка уменьшается до тех пор, пока удерживающей силы со стороны ловушки (черная стрелка на рис. 2) становится недостаточно для препятствия спонтанной агрегации эритроцитов (сила обозначена белой стрелкой на рис. 2), клетка вырывается из ловушки, и начинается процесс агрегации – наплзание одной клетки на другую (выполнение неравенства $F_{\text{ОПТ}} \leq F_A$). В этот момент фиксируется значение мощности пучка, вычисляется значение силы оптического захвата, которое приравнивается к силе агрегации F_A .

Процедура измерения силы дезагрегации F_D также состояла из трех последовательных операций, при этом 1-й и 2-й шаги были идентичны процессу измерения F_A . На 3-м шаге положение подвижного лазерного пучка (ловушки)

изменялось в попытке разделить образовавшийся на предыдущем шаге агрегат. Силу оптического захвата подвижного пучка при этом постепенно уменьшали с небольшим шагом для нахождения минимальной силы, необходимой для разделения агрегата. Это значение оптической силы фиксировалось и считалось равным силе дезагрегации F_D .

Для каждого образца измерения сил F_A и F_D проводились на не менее чем 15 парах различных эритроцитов. Итоговые результаты были получены после усреднения измеренных значений для исключения субъективных погрешностей при проведении эксперимента.

В работе [30] было показано, что свойства агрегации эритроцитов не изменяются при температурах 20 и 37°C. Поэтому измерения с помощью лазерных пинцетов проводились при комнатной температуре.

1.3. Измерение реологических параметров агрегации эритроцитов методом диффузного рассеяния света

Измерения АП крови на большом ансамбле клеток проводились методом диффузного рассеяния лазерного излучения (лазерная агрегометрия). Для этих целей использовался лазерный агрегометр эритроцитов RheoScan [16, 17] (рис. 3).



Рис. 3. Лазерный агрегометр RheoScan



При измерениях на RheoScan использовались одноразовые кюветы двух типов, изготовленные из прозрачного пластика.

Для измерения таких АП, как характерное время агрегации клеток, амплитуда и индекс агрегации, использовались кюветы первого типа (рис. 4). Кювета представляет собой небольшой плоский тонкий резервуар для цельной крови диаметром 0.5 см, в котором находится тонкий металлический перемешивающий стержень, способный вращаться под действием внешнего магнитного поля, создаваемого внутри кюветы, и перемешивать ее содержимое. В кювету с помощью микродозатора помещается цельная кровь в объеме 8 мкл.

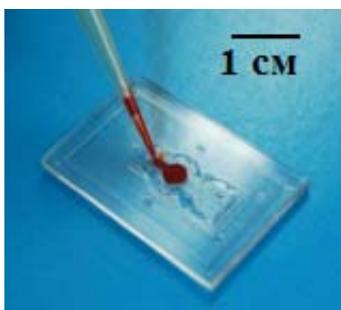


Рис. 4. Одноразовая микрокювета с магнитным перемешивающим стержнем для измерения параметров агрегации эритроцитов на приборе RheoScan

После помещения микрокюветы с кровью в прибор начинается процесс измерения. Прибор регистрирует зависимость интенсивности рассеянного вперед образцом крови лазерного излучения (длина волны 633 нм) от времени – агрегационную кинетику (рис. 5). В самом начале измерения стержень начинает вращаться с большой скоростью и тем самым разрушает все образовавшиеся в образце крови агрегаты. В этих условиях полностью дезагрегированные эритроциты испытывают деформацию, а интенсивность света, рассеянного кровью вперед, близка к минимальной (на агрегационной кинетике область времени $t < 0$, значение сигнала близко к нулю). Затем вращение стержня резко останавливается ($t = 0$). В момент остановки вращения наблюдается мгновенный скачок сигнала вниз, что связано со снижением интенсивности рассеянного вперед излучения, соответствующий восстановлению формы деформированных эритроцитов (изменяется средняя площадь рассеивающих частиц). Величина скачка интенсивности – параметр

АМР (измеряется в относительных единицах) – характеризует вытянутость эритроцитов при вращающемся стержне, их способность деформироваться (менять свою форму при действии на них сдвигового напряжения). Затем в образце крови начинается процесс спонтанной агрегации эритроцитов в покое (без внешнего напряжения сдвига). Лазерный пучок, падающий на резервуар с кровью, рассеивается на эритроцитах и вновь образующихся во времени агрегатах (идет процесс агрегации). Со временем интенсивность прошедшего вперед света увеличивается, так как за счет образования агрегатов увеличивается средний размер рассеивающих излучение центров. Процесс спонтанной агрегации занимает примерно 2 минуты, после чего интенсивность достигает максимального значения, указывающего на то, что в образце практически все эритроциты проагрегировали (см. рис. 5).

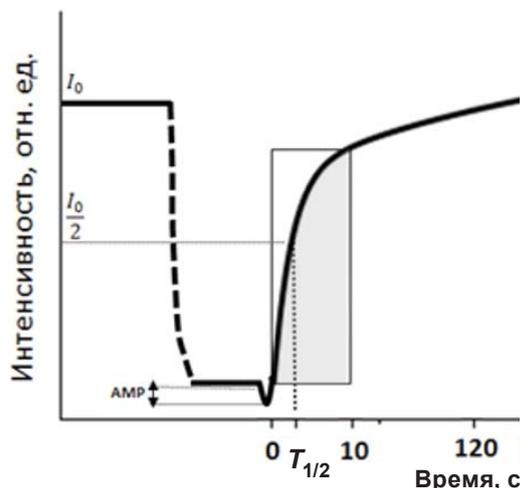


Рис. 5. Кинетика спонтанной агрегации эритроцитов, регистрируемая RheoScan: I_0 – интенсивность света, рассеянного вперед от слоя цельной крови, при максимальной агрегации эритроцитов; АМР – параметр, характеризующий деформируемость эритроцитов; $T_{1/2}$ – характерное время образования агрегатов

По агрегационной кинетике определяется характерное время образования агрегатов $T_{1/2}$ в секундах (время, за которое интенсивность света, рассеянного вперед, достигает половинного значения интенсивности при максимальной агрегации спустя 120 с), характеризующее скорость образования агрегатов, и индекс агрегации AI . AI характеризует количество агрегированных за 10 с эритроцитов в процентах. Данная величина вычисляется как отношение площади под кривой, описывающей агрегационную кинетику, к



суммарной площади над и под кривой за первые 10 с процесса спонтанной агрегации.

Кюветы второго типа (рис. 6), которые были использованы для оценки гидродинамической прочности агрегатов, содержат в себе микроканал (0.2 мм высота × 4,0 мм ширина × 40 мм длина) и резервуары для цельной крови на обоих его концах (0.5 мл). Данный тип кювет используется для измерения критического сдвигового напряжения (critical shear stress, CSS).

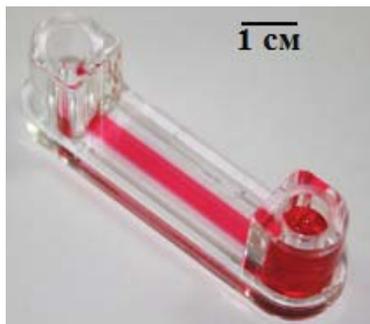


Рис. 6. Одноразовая кювета с двумя резервуарами и микроканалом для измерения деформируемости эритроцитов на приборе RheoScan

Цельная кровь в микроканале подвергается изменяющемуся сдвиговому напряжению под действием градиента давления. Для измерения CSS, которое характеризует гидродинамическую прочность образованных в крови агрегатов, в кювету помещали цельную кровь в объеме 0.5 мл. Силы вязкого трения, возникающие в микроканале, приводят к разрушению агрегатов эритроцитов под действием сдвиговых напряжений от 0 до 20 Па. Параметр CSS измеряется в единицах сдвигового напряжения – Паскалях (Па). Схематическое изображение процесса измерения приведено на рис 7. Измерения CSS проводятся следующим образом. В процессе измерений кровь пропускается через микроканал с напряжением сдвига, которое монотонно уменьшается со временем (первоначальное напряжение сдвига равно 20 Па). Поскольку сдвиговое напряжение в начале измерений (в первые 10 с) велико, интенсивность света, рассеянного в обратном направлении, увеличивается (образовавшиеся ранее и в текущий момент времени агрегаты разрушаются). Однако при достижении некоторого напряжения сдвига, равного CSS, возникающего в микроканале напряжения, будет уже недостаточно для разрушения образующихся агрегатов. Интенсивность рассеянного назад света при этом начинает уменьшаться. Таким образом, значение напряжения CSS может использоваться для характеристики гидродинамической прочности агрегатов эритроцитов в потоке. Другими словами, CSS – это минимальное напряжение сдвига, которое нужно приложить к потоку агрегатов для того, чтобы они начали разрушаться (инициировать процесс вынужденной дезагрегации).

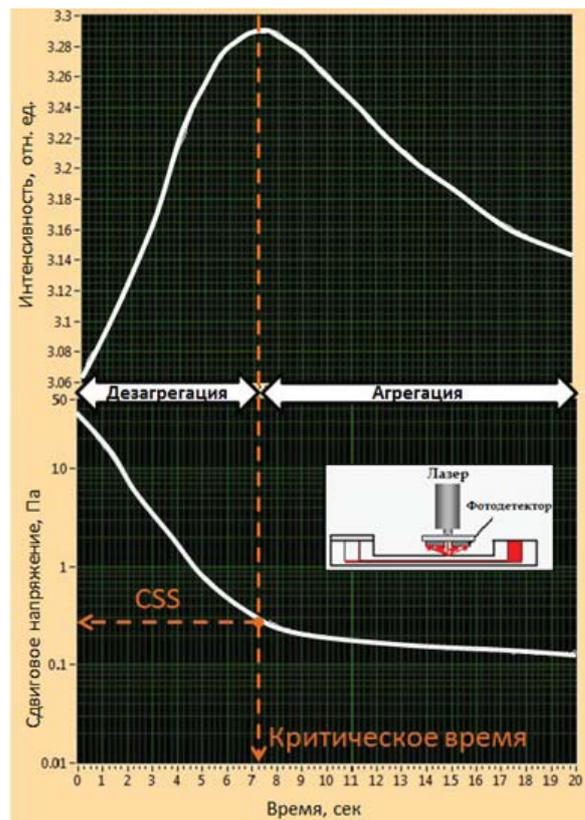


Рис. 7. Схематическое изображение процесса измерения критического сдвигового напряжения (critical shear stress, CSS)

2. Результаты и их обсуждение

Результаты измерений на ансамбле клеток методами диффузного светорассеяния представлены на рис. 8. Характерное время образования агрегатов эритроцитов достоверно уменьшается от значения 8.8 ± 2.1 с в случае контрольной группы до значения 5.3 ± 1.2 с при СД (рис. 8, а). Это свидетельствует об ускоренной агрегации эритроцитов в крови пациентов с СД. Количество красных клеток крови, которые участвуют в процессе агрегации, при СД растет по сравнению с нормой. Об этом можно судить



по достоверному увеличению значения индекса агрегации AI от $33.8 \pm 6.2\%$ в норме до $44.3 \pm 5.4\%$ при СД (рис. 8, б). Показано, что CSS эритроцитов больше в случае СД ($(270.7 \pm 78.5$ мПа) по сравнению с нормой (211.9 ± 48.6 мПа) (рис. 8, г). Таким образом, можно заключить, что при сахарном диабете скорость образования агрегатов, их количество и прочность увеличи-

ваются. Это говорит о повышенной способности эритроцитов к агрегации у таких пациентов. Поскольку данные свойства агрегации напрямую определяют течение крови в организме, то это может привести к нарушению циркуляции крови и, как следствие, к ухудшению снабжения органов и тканей кислородом и питательными веществами.

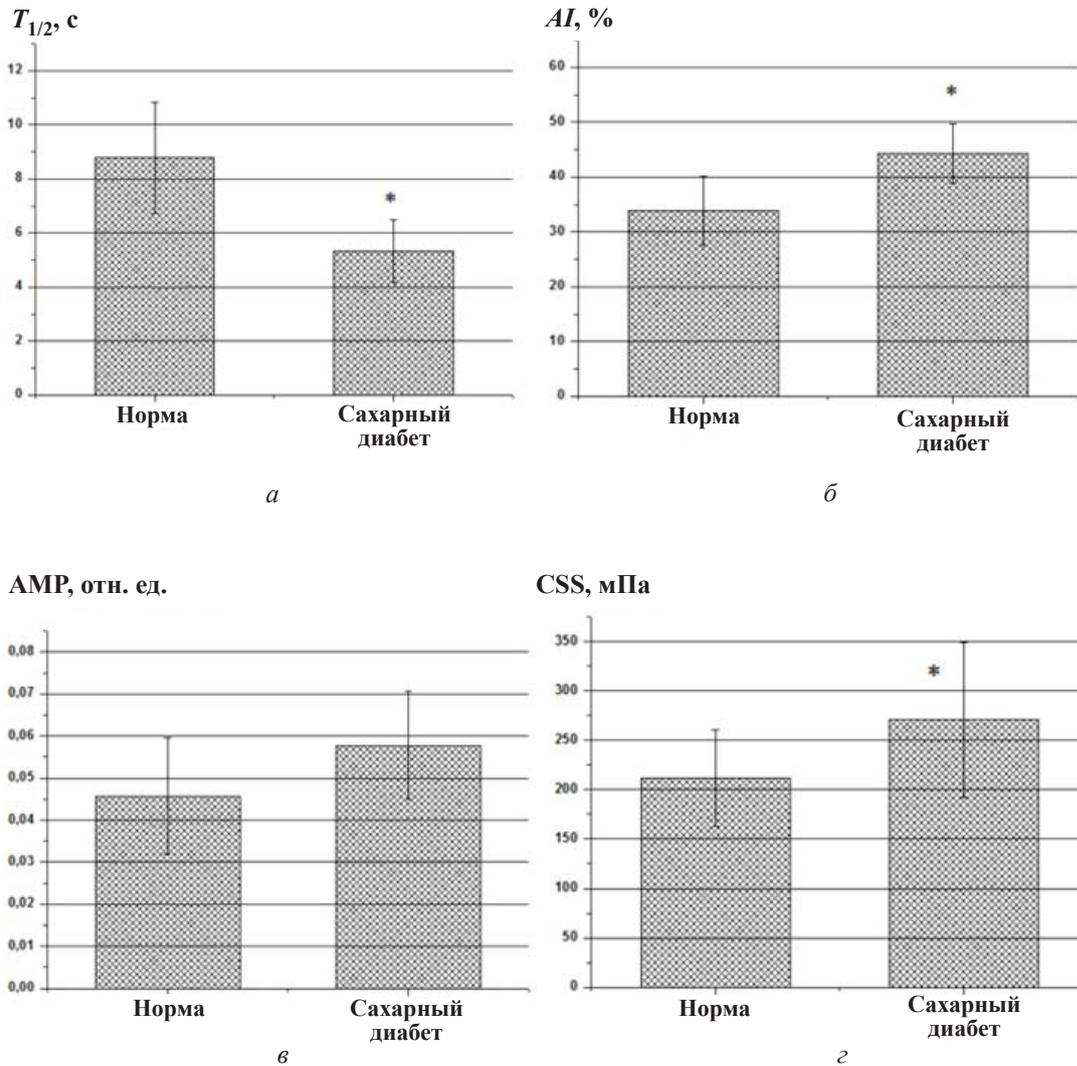


Рис. 8. Параметры агрегации крови, измеренные методом диффузного рассеяния света с помощью прибора RheoScan в норме ($n = 10$) и при СД ($n = 10$): а – характерное время образование агрегатов $T_{1/2}$, б – индекс агрегации эритроцитов AI , в – амплитуда агрегации AMP, г – критическое сдвиговое напряжение CSS ; * $p < 0.05$ (непараметрический критерий Манна–Уитни)

В свою очередь, мы не обнаружили достоверных отличий в параметре AMP, который характеризует способность эритроцитов менять свою форму (деформироваться) в сдвиговом потоке (рис. 8, в).

Таким образом, измерения АП на макроуровне на большом ансамбле клеток показали

увеличение агрегации эритроцитов при СД. Показано, что метод диффузного светорассеяния и функционирующий на его основе прибор RheoScan позволяют проводить мониторинг агрегационных параметров при СД.

Результаты измерений методом оптического захвата показали (рис. 9), что величина силы



агрегации эритроцитов F_A у больных СД составляет 4.2 ± 1.2 пН ($n = 10$), что статистически достоверно ($p < 0.05$) превышает величину F_A в контрольной группе 2.7 ± 1.5 пН ($n = 10$). Дан-

ные результаты, полученные на дублетах клеток, коррелируют с результатами гидродинамической прочности агрегатов, полученными на цельной крови (см. рис. 8, з).

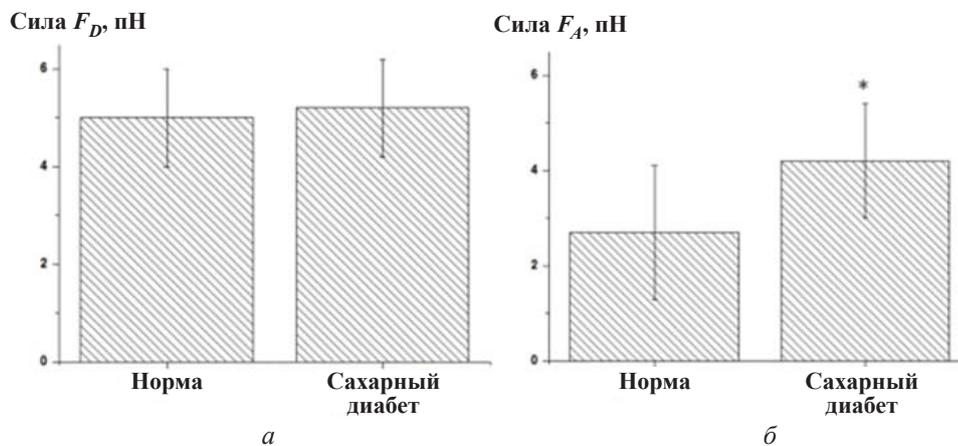


Рис. 9. Результаты измерений сил взаимодействия эритроцитов при их disaggregation (а) и агрегации (б) в норме ($n=10$) и при СД ($n=10$). Для каждой величины на диаграмме указано среднее квадратичное отклонение; * $p < 0.05$ (непараметрический критерий Манна–Уитни)

Достоверных отличий между группами при измерении силы disaggregation обнаружить не удалось ($p > 0.05$): $F_D = 5.2 \pm 1.0$ пН в группе СД и $F_D = 5.0 \pm 1.0$ пН в контрольной группе. При этом было показано, что для каждой из групп сила disaggregation статистически достоверно ($p < 0.05$) превышает силу агрегации.

Можно ввести параметр взаимодействия двух эритроцитов, задаваемый отношением средних величин сил при их disaggregation и агрегации:

$$R = \frac{\langle F_D \rangle}{\langle F_A \rangle}. \quad (1)$$

Этот параметр рассчитывается для каждого образца крови и далее усредняется по всей группе. Полученные средние значения R сравнивались между контрольной группой и группой с СД (рис. 10). Показано, что значение параметра R в норме статистически достоверно ($p \ll 0.05$) почти в 2 раза превышает величину, измеренную в группе с СД: норма – $R = 2.1 \pm 0.7$, СД – $R = 1.3 \pm 0.1$.

Исходя из вышесказанного, можно предположить, что параметр взаимодействия клеток крови при их агрегации и disaggregation перспективен для использования в качестве индикатора наличия в организме патологического процесса, связанного с СД, или предрасположенности к нему. Использование данного параметра для

R , отн. ед

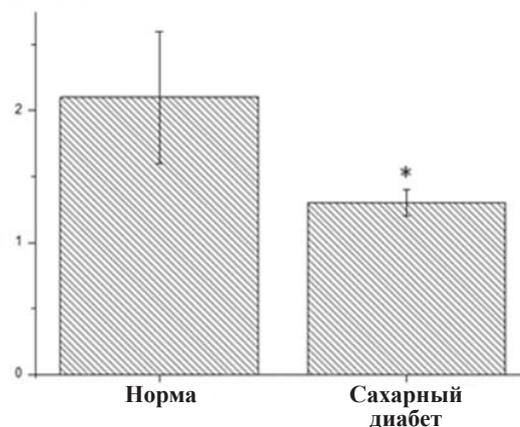


Рис. 10. Значения параметра взаимодействия $R = \langle F_D \rangle / \langle F_A \rangle$ в норме ($n=10$) и при СД ($n=10$). Для каждой величины указано среднее квадратичное отклонение; * $p < 0.05$ (непараметрический критерий Манна–Уитни)

диагностики и мониторинга эффективности терапии СД и возможных прочих патологий, в частности, сердечно-сосудистых заболеваний, требует дополнительных исследований и тщательной верификации.

Заключение

Метод диффузного рассеяния света позволяет проводить измерения агрегационных параметров на большом ансамбле клеток, а также



чувствителен к изменениям этих параметров в случае СД. В работе показано, что в случае СД эритроциты обладают повышенной способностью к агрегации по сравнению с нормой, при этом деформируемость эритроцитов достоверно не изменяется. Было показано, что силы взаимодействия эритроцитов при агрегации при СД существенно больше, чем в норме. Силы, возникающие при разделении агрегата при СД статистически достоверно не отличаются от контроля, при этом сила дезагрегации больше силы агрегации во всех группах. Это статистически значимое различие позволило ввести новый параметр количественной оценки взаимодействия эритроцитов при агрегации и дезагрегации, который перспективен для использования в диагностике и контроле эффективности терапии как сахарного диабета, так и других сосудистых патологий.

Системы оптического захвата показали себя в качестве удобного и многообещающего инструмента для проведения исследований на уровне отдельных клеток, позволяя отслеживать кинетику взаимодействия эритроцитов при агрегации и дезагрегации и с высокой точностью измерять силы, возникающие при этих процессах.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Кошелеву Владимиру Борисовичу за полезные обсуждения при подготовке статьи.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-52-51050).

Список литературы

1. Левтов В. А., Перигер С. А., Шадрин Н. Х. Реология крови. М.: Медицина, 1982. 272 с.
2. Соколова И. А. Агрегация эритроцитов // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2010. Т. 9, № 4. С. 4–26.
3. Le Devehat, Vimeux M., Bondoux G., Bertrand A. Red blood cells aggregation and disaggregation in diabetes mellitus // Clinical Hemorheology. 1989. Vol. 9. P. 845–854.
4. Singh M., Shin S. Hemorheological Disorders in Diabetes Mellitus // Indian J. Exp. Biol. 2009. Vol. 47. P. 7–15.
5. Муравьев А. В., Замышляев А. В., Тихомирова И. А., Чучканов Ф. А., Булаева С. В., Маймистова А. А. Изменение реологического профиля у больных диабетом 1 и 2 типа при лечении Тренталом // Клиническая фармакология и терапия. 2009. № 2 С. 87–90.
6. Кузник Б. И., Витковский Ю. А., Захарова М. Ю., Ключерева Н. Н., Роднина О. С., Солтов А. В. Агрегационная активность форменных элементов крови у больных сахарным диабетом 1 и 2 типа // Сахарный диабет. 2012. Т. 2. С. 49–53.
7. Фирсов Н. Н., Коротаева Т. В., Вышлова М. А. Классификация тяжести гемореологических расстройств // Реологические исследования в медицине. М., 2000. Вып. 2. С. 136–141.
8. Baskurt K., Meiselman H. J. Hemodynamic effects of red blood cell aggregation // Indian J. of Exp. Biol. 2007. Vol. 45, № 1. P. 25–31.
9. Baskurt K., Meiselman H. J. Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance // Clin. Hemorheol. Microcirc. 2013. Vol. 53, № 1–2. P. 23–37.
10. Муравьев А. В., Чепоров С. В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови). Ярославль: Изд-во ЯГПУ, 2009. 178 с.
11. Муравьев А. В., Тихомирова И. А., Булаева С. В., Вдовин В. А., Муравьев А. А. Исследование роли отдельных реологических характеристик крови в изменении ее текучести и транспортного потенциала // Российский журнал биомеханики. 2012. Т. 16, № 3 (57). С. 32–41.
12. Соколова И. А., Кошелев В. Б. Синдром повышенной вязкости крови // Технологии живых систем. 2011. Т. 8, № 6. С. 78–81.
13. Baskurt O. K., Uyuklu M., Ulker P., Cengiz M., Nemeth N., Alexy T., Shin S., Hardeman M., Meiselman H. J. Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation // Clin. Hemorheol. Microcirc. 2009. Vol. 43, № 4. P. 283–298.
14. Лопатин В. Н., Приезжев А. В., Анонасенко А. Д., Шепелевич Н. В., Пожиленкова П. В., Простакова И. В. Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред. М.: Физматлит, 2004. 384 с.
15. Hardeman M. R., Dobbe J. G. G., Ince C. The laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer // Clin. Hemorheol. Microcirc. 2001. Vol. 25, № 1. P. 1–11.
16. Priezzhev A. V., Lee K., Firsov N. N., Lademann J. Optical study of RBC aggregation in whole blood samples and single cells. Chapter 1 // Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / ed. V. V. Tuchin. 2nd ed. : in 2 vol. Vol. 2 : Methods Bellingham : SPIE Press, 2016. P. 5–36.
17. Shin S., Yang Y., Suh J. S. Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip-based stirring system by light transmission // Clin. Hemorheol. Microcirc. 2009. Vol. 41. P. 197–207.
18. Kiesewetter H., Radtke H., Schneider R., Mussler K., Scheffler A., Schmid-Schonbein H. The mini erythrocyte aggregometer: a new apparatus for the rapid quantification of the extent of erythrocyte aggregation // Biomed. Tech. (Berlin). 1982. Vol. 27, № 9. P. 209–213.
19. Steffen P., Verdier C., Wagner C. Quantification of depletion-induced adhesion of red blood cells // Phys. Rev. Lett. 2013. Vol. 110. P. 018102-1–018102-5.
20. Buxbaum K., Evans E., Brooks D. E. Quantitation of surface affinities of red blood cells in dextran solutions and plasma // Biochemistry. 1982. Vol. 21. P. 3235–3239.



21. Lee K., Kinnunen M., Khokhlova M.D., Lyubin E. V., Priezhev A.V., Meglinski I., Fedyanin A. Optical tweezers study of red blood cell aggregation and disaggregation in plasma and protein solutions // J. Biomed. Opt. 2016. Vol. 21, № 3. 035001.
22. Silva D. C., Jovino C. N., Silva C. A., Fernandes H. P., Milton Filho M., Lucena S. C., Costa A. M., Cesar C. L., Barjas-Castro M. L., Santos B. S., Fontes A. Optical tweezers as a new biomedical tool to measure zeta potential of stored red blood cells // PloS ONE. 2012. Vol. 7, № 2. e31778.
23. Fernandes P. H., Fontes A., Thomaz A., Castro V., Cesar C. L., Barjas-Castro M. L. Measuring red blood cell aggregation forces using double optical tweezers // Scand. J. Clin. Lab. Invest. 2013. Vol. 73, № 3. P. 262–264. DOI: 10.3109/00365513.2013.765961.
24. Baskurt O. K., Boynard M., Cokeletetal G. C. New guidelines for hemorheological laboratory techniques // Clin. Hemorheol. Microcirc. 2009. Vol. 42, № 2. P. 75–97.
25. Mann H. B., Whitney D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other // The Annals of Mathematical Statistics. 1947. Vol. 18, № 1. P. 50–60.
26. Arcuri A., Briand L. A Hitchhiker's guide to statistical tests for assessing randomized algorithms in software engineering // Softw. Test. Verif. Reliab. 2014. Vol. 24. P. 219–250. DOI: 10.1002/stvr.1486.
27. Маклыгин А. Ю., Приезжев А. В., Карменян А. В., Никитин С. Ю., Оболенский И. С., Луговцов А. Е., Кисун Ли Измерение силы взаимодействия между эритроцитами в агрегате с помощью лазерного пинцета // Квантовая электроника. 2012. Т. 42, № 6. С. 500–504.
28. Liu Y., Cheng D. K., Sonek G. J., Berns M. W., Chapman C. F., Tromberg B. J. Evidence for localized cell heating induced by infrared optical tweezers // Biophys. J. 1985. Vol. 68. P. 2137–2144.
29. Lee K., Kinnunen M., Danilina A. V., Ustinov V. D., Shin S., Meglinski I., Priezhev A. V. Characterization at the individual cell level and in whole blood samples of shear stress preventing red blood cells aggregation // J. Biomech. 2016. Vol. 3, iss. 7. P. 1021–1026.
30. Lee K., Priezhev A., Shin S., Yaya F., Meglinski I. Characterization of shear stress preventing red blood cells aggregation at the individual cell level : The temperature dependence // Clin. Hemorheol. Microcirc. 2016. Vol. 64. P. 853–857.

Образец для цитирования:

Семенов А. Н., Луговцов А. Е., Ли К., Фабричнова А. А., Ковалева Ю. А., Приезжев А. В. Использование методов диффузного рассеяния света и оптического захвата для исследования реологических свойств крови: агрегация эритроцитов при сахарном диабете // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2017. Т. 17, вып. 2. С. 85–97. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-2-85-97.

Applying Methods of Diffuse Light Scattering and Optical Trapping for Assessing Blood Rheological Parameters: Erythrocytes Aggregation in Diabetes Mellitus

A. N. Semenov, A. E. Lugovtsov, K. Lee,
A. A. Fabrichnova, Yu. A. Kovaleva, A. V. Priezhev

Alexey N. Semenov, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, Semenov@physics.msu.ru.

Andrey E. Lugovtsov, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, anlug1@gmail.com

Lee Kisung, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia; University of Saarland, Campus building E2-6, Saarbrücken, 66123, Germany, leekisung1991@gmail.com

Anastasia A. Fabrichnova, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, anastasia.fabrichnova@mail.ru

Yulia A. Kovaleva, Moscow Regional Research and Clinical Institute ("MONIKI"), 61/2, Shepkin str., Moscow, 129110, Russia, yulia.kovaleva@mail.ru

Alexander V. Priezhev, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, avp2@mail.ru

Background and Objectives: Aggregation parameters of blood characterize red blood cells interaction processes which play a major role in the microcirculation regulation. It was shown that these parameters are significantly different in case of Diabetes Mellitus (DM) and therefore can be proposed as a novel parameter of the disease state and therapy efficiency. Usage of diffuse methods of measuring aggregation properties in whole blood combined with the single cell level measuring technique will allow creating a new complete approach to investigate the hemorheological state of the blood in various socially important disease. **Materials and Methods:** For assessing the time of spontaneous aggregation, hydrodynamic strength, aggregation index and deformability properties of ensemble of RBCs in whole blood we used commercially available aggregometer Rheoscan-AnD300 (Rheomeditech, Korea). Operation of this device is based on measuring the intensity of laser light scattered by whole blood samples. Measurements of RBC aggregating/disaggregating forces were performed using home-made 2-channelled optical tweezer (OT) in high-diluted autologous plasma. Two cells were manipulated and brought to the 40% of cell surface contact forming an aggregate. The minimal trapping force required to prevent the complete aggregation (aggregating force F_A) was measured. The minimal trapping force required to disassemble the aggregate completely (disaggregating force F_D) was also measured. **Results:** The measurements of RBC interaction forces were performed in groups of healthy donors and patients suffering from DM. The measured value of the aggregation force in DM was $F_A = 4.2 \pm 1.2$ pN which 1.5 times exceeds the aggregating force in norm ($F_A = 2.7 \pm 1.5$ pN) while the disaggregating forces F_D were found to be nearly the same. DM is characterized by enhanced aggregation. It was shown that the



characteristic time of aggregates formation is reduced in whole blood of patients with DM relative to the control group. **Conclusions:** The statistically significant difference in aggregating forces in norm and DM allowed to propose a novel aggregating parameter $R = F_D / F_A$ which can diagnose the microrheological state of the pathological blood in case of DM. Information about alterations of the time of aggregates formation can be considered as an indication of DM as well as for monitoring the patients treatment efficiency.

Key words: red blood cells aggregation, diffuse light scattering, optical tweezers, diabetes mellitus.

Acknowledgements: Authors also want to thank Vladimir B. Koshelev for the assistance in the article discussion.

This work was supported by the Russian foundation for basic research (project no. 16-52-51050).

References

1. LevtoV V. A., Reriger S. A., Shadrina N. Ch. *Reologia krovi* [Blood rheology]. Moscow, Medicine Publ., 1982. 272 p. (in Russian).
2. Sokolova I. A. Erythrocyte aggregation. *Regional Haemodynamics and Microcirculation*, 2010, vol. 9, no. 4, pp. 4–26 (in Russian).
3. Le Devehat, Vimeux M., Bondoux G., Bertrand A. Red blood cells aggregation and disaggregation in diabetes mellitus. *Clinical Hemorheology*, 1989, vol. 9, pp. 845–854.
4. Singh M., Shin S. Hemorheological Disorders in Diabetes Mellitus. *Indian J. Exp. Biol.*, 2009, vol. 47, pp. 7–15.
5. Muravyov A. V., Zamushlyayev A. V., Tikhomirova I. A., Chuchkanov F. A., Bulaeva S. V., Maimistova A. A. Izmenenie reologicheskogo profil'nykh diabetom 1 i 2 tipa pri lechenii Trentalom [Rheological profile change in patients suffering from Diabetes Mellitus types 1 and 2 during Trental therapy]. *Klinicheskaya Farmakologiya i Terapiya* [Clinical Pharmacology and Therapy], 2009, no. 2, pp. 87–90 (in Russian).
6. Kuznik B. I., Vitkovskii Yu. A., Zakharova M. Yu., Klyuchereva N. N., Rodnina O. S., Solpov A. V. Aggregation activity of blood formed elements in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Mellitus Journal*, 2012, vol. 2, pp. 49–53 (in Russian).
7. Firsov N. N., Korotaeva T. V., Vishlova V. A. Klasifikatsiya tiazhesti gemoreologicheskikh rasstroystv [Hemorheological disorders gravity classification]. In: *Rheologicheskie issledovaniya v medicine* [Rheological investigations in medicine]. Moscow, 2000, iss. 2, pp. 136–141 (in Russian).
8. Baskurt K., Meiselman H. J. Hemodynamic effects of red blood cell aggregation. *Indian J. of Exp. Biol.*, 2007, vol. 45, no. 1, pp. 25–31.
9. Baskurt K., Meiselman H. J. Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2013, vol. 53, no. 1–2, pp. 23–37.
10. Muravyov A. V., Cheporov S. V. *Gemoreologiya (eksperimental'nye i klinicheskie aspekty reologii krovi)* [Hemorheology (experimental and clinical aspects of blood rheology)]. Yaroslavl', 2009, YSPU Publ. 178 p. (in Russian).
11. Muravyov A. V., Tikhomirova I. A., Bulaeva S. V., Vdovin V. A., Muravyov A. A. The study of the role of individual blood characteristics in its fluidity alteration and transport efficiency. *Russian Journal of Biomechanics*, 2012, vol. 16, no. 3 (57), pp. 32–41.
12. Sokolova I. A., Koshelev V. B. Syndrom of increased blood viscosity. *Tekhnologii Zhivyykh Sistem* [Living Systems Technologies], 2011, vol. 8, no. 6, pp. 78–81 (in Russian).
13. Baskurt O. K., Uyuklu M., Ulker P., Cengiz M., Nemeth N., Alexy T., Shin S., Hardeman M., Meiselman H. J. Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2009, vol. 43, no. 4, pp. 283–298.
14. Lopatin V. N., Priezzhev A. V., Aponasenko A. D., Shepelevich N. V., Pozilenkova P. V., Prostakova I. V. *Metody svetorasseianiya v analize dispersnykh biologicheskikh sred* [Light scattering methods in disperse biological environments analysis]. Moscow, PhysMatLit, 2004. 384 p. (in Russian).
15. Hardeman M.R., Dobbe J.G.G., Ince C. The laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2001, vol. 25, no. 1, pp. 1–11.
16. Priezzhev A. V., Lee K., Firsov N. N., Lademann J. Optical study of RBC aggregation in whole blood samples and single cells. Chapter 1. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*. Ed. Valery V. Tuchin. 2nd ed.: in 2 vol. Vol. 2: Methods. Bellingham, SPIE Press, 2016, pp. 5–36.
17. Shin S., Yang Y., Suh J. S. Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip-based stirring system by light transmission. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2009, vol. 41, pp. 197–207.
18. Kiesewetter H., Radtke H., Schneider R., Mussler K., Scheffler A., Schmid-Schonbein H. The mini erythrocyte aggregometer: a new apparatus for the rapid quantification of the extent of erythrocyte aggregation. *Biomed. Tech.* Berlin, 1982, vol. 27, no. 9, pp. 209–213.
19. Steffen P., Verdier C., Wagner C. Quantification of depletion-induced adhesion of red blood cells. *Phys. Rev. Lett.*, 2013, vol. 110, pp. 018102-1–018102-5.
20. Buxbaum K., Evans E., Brooks D. E. Quantitation of surface affinities of red blood cells in dextran solutions and plasma. *Biochemistry*, 1982, vol. 21, pp. 3235–3239.
21. Lee K., Kinnunen M., Khokhlova M. D., Lyubin E. V., Priezzhev A. V., Meglinski I., Fedyanin A. Optical tweezers study of red blood cell aggregation and disaggregation in plasma and protein solutions. *J. Biomed. Opt.*, 2016, vol. 21, no. 3, 035001.
22. Silva D. C., Jovino C. N., Silva C. A., Fernandes H. P., Milton Filho M., Lucena S. C., Costa A. M., Cesar C. L., Barjas-Castro M. L., Santos B. S., Fontes A. Optical tweezers as a new biomedical tool to measure zeta potential of stored red blood cells. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 2, e31778.



23. Fernandes P. H., Fontes A., Thomaz A., Castro V., Cesar C. L., Barjas-Castro M. L. Measuring red blood cell aggregation forces using double optical tweezers. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2013, vol. 73, no. 3, pp. 262–264. DOI: 10.3109/00365513.2013.765961.
24. Baskurt O. K., Boynard M., Cokeletetal G. C. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2009, vol. 42, no. 2, pp. 75–97.
25. Mann H. B., Whitney D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 1947, vol. 18, no. 1, pp. 50–60.
26. Arcuri A., Briand L. A Hitchhiker’s guide to statistical tests for assessing randomized algorithms in software engineering. *Softw. Test. Verif. Reliab*, 2014, vol. 24, pp. 219–250. DOI: 10.1002/stvr.1486.
27. Maklygin A. Yu., Priezzhev A.V., Karmenyan A. V., Nikitin S. Yu., Obolenskii I. S., Lugovtsov A. E., Kisun Li. Measurement of interaction forces between red blood cells in aggregates by optical tweezers. *Quantum Electronics*, 2012, vol. 42, no. 6, pp. 500–504.
28. Liu Y., Cheng D. K., Sonek G. J., Berns M. W., Chapman C. F., Tromberg B. J. Evidence for localized cell heating induced by infrared optical tweezers. *Biophys. J.*, 1985, vol. 68, pp. 2137–2144.
29. Lee K., Kinnunen M., Danilina A. V., Ustinov V. D., Shin S., Meglinski I., Priezzhev A. V. Characterization at the individual cell level and in whole blood samples of shear stress preventing red blood cells aggregation. *J. Biomech.*, 2016, vol. 3, iss. 7, pp. 1021–1026.
30. Lee K., Priezzhev A., Shin S., Yaya F., Meglinski I. Characterization of shear stress preventing red blood cells aggregation at the individual cell level: The temperature dependence. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2016, vol. 64, pp. 853–857.

Cite this article as:

Semenov A. N., Lugovtsov A. E., Lee K., Fabrichnova A. A., Kovaleva Yu. A., Priezzhev A. V. Applying Methods of Diffuse Light Scattering and Optical Trapping for Assessing Blood Rheological Parameters: Erythrocytes Aggregation in Diabetes Mellitus. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 2, pp. 85–97 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-2-85-97.
