

## PRACA ORYGINALNA

# Kliniczne zastosowania laserowo-optycznego rotacyjnego analizatora krwinek czerwonych LORCA

## Clinical applications of the Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyser LORCA

Ludmiła Słowińska, Karol Monkos

## STRESZCZENIE

Department of Biophysics, Medical University of Silesia, H. Jordana 19, 41-808 Zabrze 8, Poland

Laserowo-optyczny rotacyjny analizator krwinek czerwonych LORCA jest precyzyjnym przyrządem służącym do badania agregacji i odkształcalności erytrocytów. W pracy przedstawiono zasadę działania tego przyrządu oraz zdefiniowano wielkości przez niego mierzone, takie jak amplituda agregacji, czas połowicznego odtwarzania agregacji, indeks agregacji oraz indeks elongacji. Porównano średnie wartości tych wielkości dla grupy kontrolnej osób zdrowych oraz grup chorych na otyłość (body mass index – BMI > 35), raka trzustki, zawał serca, obturacyjny bezdech we śnie, zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem oraz cukrzycę typu 2.

## SŁOWA KLUCZOWE

erytrocyty, odkształcalność, amplituda agregacji, indeks agregacji, indeks elongacji

## ABSTRACT

Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyser LORCA is a precise instrument capable to investigation of aggregations and deformability of erythrocytes. In the paper the action principles of the instruments is presented and the measured quantities such as the aggregation amplitude, aggregation half time, aggregation index and elongation index are defined. A comparison of mean values of those quantities for the control group and groups of patients with obesity (body mass index – BMI > 35), pancreas tumor, myocardial infarction, obstructive sleep apnea, age-related macular degeneration and diabetes mellitus of the type 2 is made.

## ADRES

DO KORESPONDENCJI:  
Karol Monkos  
Katedra i Zakład Biofizyki  
Śląski Uniwersytet Medyczny  
ul. H. Jordana 19  
41-808 Zabrze 8  
tel. +48 32 272 20 41/236  
fax +48 32 272 01 42  
e-mail: monkos@sum.edu.pl

Ann.Acad.Med.Siles. 2010, 64, 3-4, 42-47  
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny  
w Katowicach  
ISSN 0208-5607

## KEY WORDS

erythrocytes, deformability, aggregation amplitude, aggregation index, elongation index

## WSTĘP

Laserowo-optyczny rotacyjny analizator krwinek czerwonych – LORCA (Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyser) został skonstruowany pod koniec lat dziewięćdziesiątych na Uniwersytecie Amsterdamskim w Holandii pod kierownictwem Maxa R. Hardemana. Jest to precyzyjny przyrząd do wyznaczania parametrów agregacji erytrocytów oraz indeksu ich odkształcalności [1, 2].

Zjawisko spontanicznej agregacji czerwonych krwinek w pełnej krwi, czyli tworzenie się trójwymiarowych struktur erytrocytów, odgrywa znaczącą rolę w przepływie krwi przy niskich prędkościach ścinania i istotnie wpływa na wzrost lepkości krwi. Zjawisko to obserwowano od ponad trzystu lat przy użyciu mikroskopu. W latach sześćdziesiątych Zijlstra [3] zaproponował nową technikę badania tego zjawiska przy użyciu światła odbitego od erytrocytów i zaproponował na nią nazwę sylektometria.

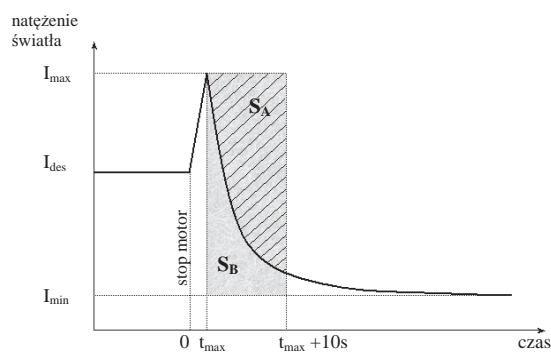
Zjawisko odkształcalności erytrocytów odgrywa istotną rolę w przepływie krwinek przez naczynia kapilarne o średnicy nawet dwa razy mniejszej niż średnica erytrocytów w spoczynku. W dużych arteriach, gdzie występują duże prędkości przepływu, wynikiem odkształcania się krwinek czerwonych jest obniżanie się lepkości krwi, a co za tym idzie obniżanie się oporów przepływu. Dlatego nawet niewielki wzrost sztywności erytrocytów może powodować znaczące zaburzenia w mikro- i makroprzepływach. Najstarszą metodą pomiaru odkształcalności erytrocytów jest technika filtracji przez odpowiednie filtry [4]. W latach osiemdziesiątych wprowadzono do pomiarów odkształcalności erytrocytów znacznie precyzyjniejszą metodę, zwaną ektacytometrią, w której wykorzystuje się światło laserowe rozpraszane na krwinkach.

Analizator LORCA, w którym dioda laserowa oraz kamera wideo sprzężone są z systemem komputerowym, stanowią połączenie techniki sylektometrii z ektacytometrią.

## METODA

A. Pomiar parametrów agregacji erytrocytów. Próbkę krwi przed właściwym badaniem poddaje się utlenowaniu przez inkubację i miesza-

nie z powietrzem (według proporcji 1 objętość krwi na 3 objętości powietrza) w ciągu 15 minut. Krew w ilości 1,5 ml wprowadza się do komory pomiarowej analizatora LORCA, którą stanowi przestrzeń pomiędzy dwoma przezroczystymi cylindrami. Zewnętrzny cylinder rotuje z zadanymi prędkościami ścinania względem wewnętrznego, spoczywającego cylindra. Pomiaru dokonuje się po osiągnięciu przez komorę z próbką krwi temperatury 37°C. Metoda pomiaru parametrów oraz kinetyki agregacji oparta jest na zjawisku rozpraszania światła laserowego przez krwinki czerwone, którego natężenie zależy od stopnia agregacji erytrocytów. Źródłem światła jest dioda laserowa wmontowana wewnątrz cylindra nieruchomego. Światło wsteczne rozproszone pada na dwie fotodiody, które stanowią czujniki, a następnie analizowane jest przez komputer. Wynikiem analizy komputerowej jest krzywa zależności natężenia światła rozproszonego od czasu (dla określonej szybkości ścinania), czyli tzw. sylektogram (Rycina 1).



Ryc. 1. Sylektogram – krzywa zależności natężenia światła rozproszonego od erytrocytów od czasu.

Fig. 1. Sylectogram – the curve of dependence of intensity of light scattered by erythrocytes versus time.

Opis sylektogramu:

1. Część pierwsza – dla czasu  $t < 0$ ; próbkę krwi poddaje się wstępnemu ścinaniu o prędkości np.  $800 \text{ s}^{-1}$ , co prowadzi do całkowitej desagregacji erytrocytów, oraz ich maksymalnemu odkształceniu (przejście z kształtu sferycznego do elipsoidalnego), natomiast natężenie światła rozproszonego ma w przybliżeniu stałą wartość ( $I_{des}$ ).
2. W umownym czasie  $t = 0$  silnik – wprowadzający cylinder zewnętrzny komory pomiarowej w rotację – zostaje wyłączony.
3. Część druga – dla czasu z przedziału  $0 < t < t_{max}$ : choć silnik został już wyłączony, to

szybkość ścinania erytrocytów osiąga wartość zero dopiero po czasie  $t_{max}$ , a krwinki powracają do kształtu sferycznego, natomiast rozproszenie światła osiąga wartość maksymalną ( $I_{max}$ ).

4. Część trzecia – dla czasu z przedziału  $t_{max} < t < (t_{max} + 10 \text{ s})$ ; w wybranym czasie 10 sekund następuje częściowa odbudowa agregacji erytrocytów, a natężenie światła rozproszonego wykładniczo maleje.
5. Część czwarta – dla czasu  $t > (t_{max} + 10 \text{ s})$ ; agregacja erytrocytów narasta do wartości maksymalnej, a rozproszenie światła, odpowiednio, do wartości minimalnej ( $I_{min}$ ).

Z sylektogramu komputer bezpośrednio odczytuje następujące parametry agregacji:

- $I_{max}$  – maksymalne natężenie światła rozproszonego przy maksymalnej desagregacji.
- $I_{min}$  – minimalne natężenie światła rozproszonego przy maksymalnej agregacji.
- $I_{des}$  – natężenie światła rozproszonego przy desagregacji erytrocytów dla prędkości ścinania  $800 \text{ s}^{-1}$ .
- $t_{max}$  – czas dojścia natężenia światła rozproszonego do wartości maksymalnej liczony od momentu wyłączenia silnika.

Po analizie powyższych parametrów komputer wylicza bardziej złożone wielkości, które służą do porównywania agregacji erytrocytów u różnych pacjentów:

- $A_{mp}$  – amplituda agregacji wyznaczana z sylektogramu ze wzoru:  $A_{mp} = I_{max} - I_{min}$ .
- $T_{1/2}$  – czas reprezentujący szybkość odbudowy agregacji erytrocytów; jest to czas dla którego natężenie światła osiąga wartość  $(I_{min} + \frac{1}{2} A_{mp})$ .
- AI – indeks agregacji reprezentujący nie tylko szybkość odbudowy erytrocytów, ale również miarę intensywności agregacji. Wyznacza się go ze wzoru:

$$AI = \frac{S_A}{S_A + S_B} \cdot 100 \% \quad (1)$$

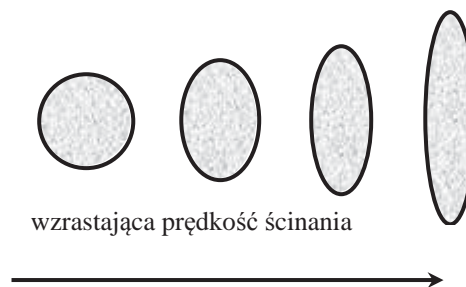
gdzie:  $S_A$  i  $S_B$  oznaczają powierzchnie zaznaczone na sylektogramie odpowiednio nad i pod krzywą w zakresie natężeń światła rozproszonego przyporządkowywanych przedziałowi czasu od  $t_{max}$  do  $(t_{max} + 10 \text{ s})$ .

B. Pomiar odkształcalności (elongacji) erytrocytów.

Analizator laserowo-optyczny LORCA, po wybraniu odpowiedniej opcji programu komputerowego, służy również do wyznaczania odkształcalności erytrocytów. Próbkę do badań

stanowi 25  $\mu\text{l}$  krwi rozpuszczonej w 5 ml 0,14 mM roztworu buforowego poliwinylpyrrolidonu (PBS). W skład roztworu buforowego wchodzi: 140 mM NaCl oraz 18,4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Wodny roztwór tego buforu posiada ściśle określone właściwości fizykochemiczne, tj.: pH 7,4, ciśnienie osmotyczne 300 mOsm/kg oraz lepkość  $30 \pm 2 \text{ mPas}$ . Pomiary przeprowadza się w stabilizowanej temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Badaną próbkę umieszcza się w komorze pomiarowej pomiędzy dwoma koncentrycznymi cylindrami, analogicznie jak przy pomiarze agregacji.

Światło lasera, przechodząc przez cienką warstwę krwinek czerwonych zawieszonych w roztworze PBS, ulega ugięciu, dając obraz dyfrakcyjny na ekranie projekcyjnym. Kształt obrazu dyfrakcyjnego zależy od wartości naprężenia ścinającego działającego na krwinkę podczas rotacji cylindra. Dla małych wartości szybkości ścinania obraz jest okręgiem. Jednak w miarę wzrostu naprężenia kształt obrazu dyfrakcyjnego przechodzi od koła do elipsy o coraz większym stosunku osi długiej do krótkiej, co ilustruje Rycina 2.



Ryc. 2. Zmiana obrazu dyfrakcyjnego na ekranie projekcyjnym wraz ze wzrostem szybkości ścinania.

Fig. 2. Change in diffraction pattern on the projection screen with increasing of the shear rate.

Obraz dyfrakcyjny rejestrowany jest za pomocą kamery video, a następnie przesyłany do komputera. Program komputerowy mierzy długości osi długiej „a” i krótkiej „b” elipsy z obrazu dyfrakcyjnego oraz wylicza indeks elongacji EI z następującego wzoru:

$$EI = \frac{a - b}{a + b} \quad (2)$$

Indeks elongacji jest miarą wielkości odkształcenia krwinek czerwonych podczas ich ruchu w komorze pomiarowej.

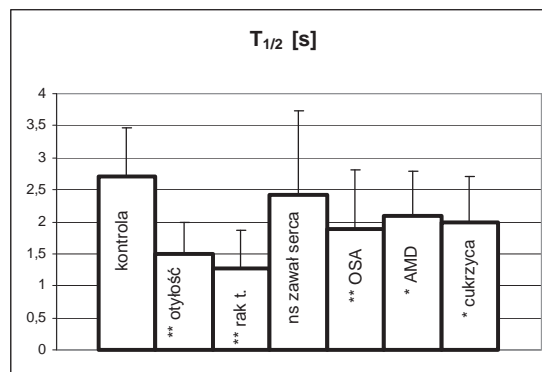
## MATERIAŁ

Krew do badań pobierano w ilości 5 ml z żyły odłokciowej, mieszając z antykoagulantem  $K_3EDTA$ . Przykładowe wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy uzyskano przy współpracy z następującymi klinikami SUM: Katedrą i Oddziałem Klinicznym Chirurgii Ogólnej, Bariatrycznej i Medycyny Ratunkowej w Zabrze u chorych z otyłością [5] oraz z rakiem trzustki, III Katedrą i Oddziałem Klinicznym Kardiologii Śląskiego Centrum Chorób Serca w Zabrze u chorych z zawałem serca [6], Katedrą i Kliniką Pneumonologii w Katowicach u chorych z obturacyjnym zespołem bezdechu we śnie (obstructive sleep apnea – OSA) [7], Katedrą i Oddziałem Klinicznym Chorób Oczu w Sosnowcu u chorych ze zwyrodnieniem plamki żółtej związanym z wiekiem (age-related macular degeneration – AMD) [8] oraz z cukrzycą [9].

## WYNIKI I OMÓWIENIE

Aby w obrazowy sposób porównać ze sobą wartości parametrów otrzymanych dla różnych grup chorych w badaniach aparatem LORCA, wyniki w niniejszej pracy przedstawiono w formie wykresów słupkowych. Na każdej rycinie zestawiono – dla wybranego parametru – średnie arytmetyczne wraz z odchyleniem standardowym dla grupy kontrolnej osób zdrowych oraz dla chorych na: otyłość (body mass index – BMI > 35), raka trzustki, świeży zawał serca, obturacyjny bezdech we śnie (OSA), zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem (AMD) oraz cukrzycę typu II. Na słupkach wykresów oprócz nazwy grupy podano wartości poziomów istotności (p), przy których między średnimi występuje różnica statystycznie znamienna względem grupy kontrolnej. Symbol \* oznacza, że  $p < 0,005$ , \*\* –  $p < 0,001$ , natomiast ns – oznacza, że pomiędzy średnimi wartościami badanego parametru z grupy chorych i grupy kontrolnej nie ma różnicy statystycznie znamiennej.

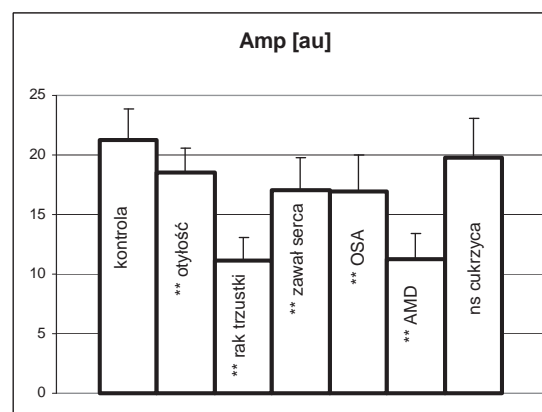
Wartości parametrów opisujących stopień agregacji erytrocytów przedstawione są na Rycinach 3–5. Rycina 3 pokazuje czas połowiczny odbudowy agregatów krwinek czerwonych  $T_{1/2}$ . We wszystkich grupach chorych wartość



**Ryc. 3.** Średnie wartości i odchylenia standardowe czasu połowicznego odtwarzania agregacji  $T_{1/2}$  dla grupy kontrolnej oraz grup pacjentów z różnymi schorzeniami.

**Fig. 3.** Means values and standard deviations of the aggregation half time  $T_{1/2}$  for the control group and groups of patients with different diseases.

tego czasu była mniejsza w stosunku do grupy kontrolnej o wartość z zakresu od 10% do 53%, przy czym najmniejszą wartość  $T_{1/2}$  przyjmuje dla grupy z rakiem trzustki.



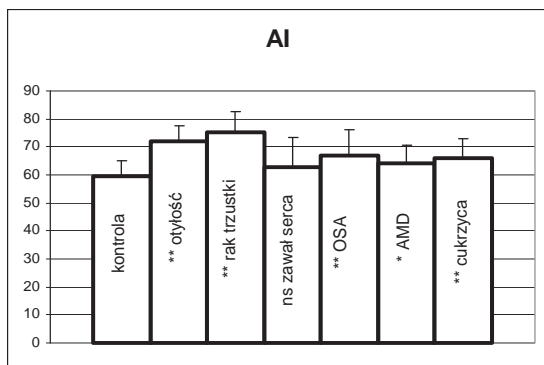
**Ryc. 4.** Średnie wartości i odchylenia standardowe amplitudy agregacji  $A_{mp}$  (podane w jednostkach umownych) dla grupy kontrolnej oraz grup pacjentów z różnymi schorzeniami.

**Fig. 4.** Means values and standard deviations of the aggregation amplitude  $A_{mp}$  (given in arbitrary units) for the control group and groups of patients with different diseases.

Na Rycinie 4 przedstawiono z kolei wartości amplitudy agregacji erytrocytów  $A_{mp}$ . Średnia wartość tej wielkości dla poszczególnych grup chorych jest mniejsza od wartości średniej dla grupy kontrolnej o około 7% (dla chorych na cukrzycę) aż do około 48% (dla chorych na raka trzustki). Najmniejszą wartość amplituda  $A_{mp}$  przyjmuje w grupie chorych z rakiem trzustki, jak i z AMD, natomiast w grupie z za-

wałem serca i OSA wartość tego parametru jest na tym samym poziomie i jest mniejsza o około 20% od grupy kontrolnej.

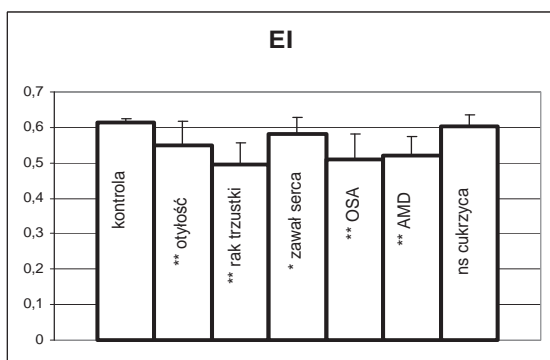
Na Rycinie 5 przedstawiono wartości indeksu agregacji AI w porównywanych grupach. Okazuje się, że wartość tego parametru w grupie kontrolnej jest najniższa; niższa o 6% do 27%



**Ryc. 5.** Średnie wartości i odchylenia standardowe indeksu agregacji AI – wyliczonego ze wzoru (1) – dla grupy kontrolnej oraz grup pacjentów z różnymi schorzeniami.

**Fig. 5.** Means values and standard deviations of the aggregation index AI – calculated from the formula (1) – for the control group and groups of patients with different diseases.

względem pozostałych grup. Z badanych grup chorych najwyższy indeks agregacji otrzymano dla grupy chorych z rakiem trzustki, natomiast najniższy dla grupy chorych z zawałem serca. Obliczenia statystyczne pokazały jednak, że pomiędzy średnią wartością indeksu



**Ryc. 6.** Średnie wartości i odchylenia standardowe indeksu elongacji EI – wyliczonego ze wzoru (2) – dla grupy kontrolnej oraz grup pacjentów z różnymi schorzeniami.

**Fig. 6.** Means values and standard deviations of the elongation index EI – calculated from the formula (2) – for the control group and groups of patients with different diseases.

agregacji w tym ostatnim przypadku a średnią z grupy kontrolnej nie ma różnicy statystycznie znamiennej.

Miarą wielkości odkształcenia erytrocytów podczas przepływu jest indeks elongacji. Na Rycinie 6 przedstawiono wartości tego parametru w omawianych grupach chorych dla wybranego naprężenia ścinającego 60,03 Pa. Okazuje się, że pomiędzy średnimi wartościami tego parametru nie ma różnicy statystycznie znamiennej jedynie dla grupy kontrolnej i grupy chorych na cukrzycę (różnica wynosi około 2%). Największa różnica pomiędzy średnimi wartościami tego parametru w stosunku do grupy kontrolnej występuje w grupie chorych z OSA, AMD oraz rakiem trzustki. W tych trzech grupach chorych indeks elongacji ma prawie identyczną wartość, mniejszą od wartości dla grupy kontrolnej o około 17%.

U chorych występuje nie tylko wzrost liczby i wielkości agregatów krwinek, ale również zwiększenie siły wiązań erytrocytów (reprezentowane przez AI i  $A_{mp}$ ). Zwiększenie tych sił powoduje, że do rozrywania agregatów wymagane są wyższe prędkości ścinania. Zwiększenie siły wiązań erytrocytów powoduje również wzrost szybkości samego procesu agregacji (reprezentowany przez  $T_{1/2}$ ). Wzrost liczby i wielkości agregatów erytrocytów oznacza wzrost lepkości krwi, a co za tym idzie wzrost oporu przepływu krwi – szczególnie w odcinkach naczyń zmienionych chorobowo. Prowadzi to do ograniczenia przepływu krwi, a nawet do zastojów [10]. Prawidłowa zdolność erytrocytów do odkształceń jest konieczna do sprawnego transportu tlenu i dwutlenku węgla, a w konsekwencji do normalnej perfuzji tkanek. Obniżenie zdolności erytrocytów do odkształceń – wykazane u chorych – nie tylko prowadzi do spadku utlenowania tkanek [11], ale również skraca czas życia krwinek czerwonych [12]. Niekorzystne zmiany właściwości reologicznych krwi obserwuje się w różnych stanach chorobowych. Są one, między innymi, jednym z elementów zwiększonego ryzyka zachorowania na choroby układu krążenia, które są jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach uprzemysłowionych. Zmiany reologiczne krwi mogą być następstwem choroby, mogą być również czynnikiem sprzyjającym powstawaniu różnych procesów patologicznych w organizmie.

## WNIOSKI

Analiza parametrów otrzymanych z pomiarów na analizatorze krwinek czerwonych LORCA

dla różnych grup chorych pokazuje, że zróżnicowanie poszczególnych parametrów w stosunku do grupy kontrolnej jest różne. Przykładowo, dla pacjentów chorych na cukrzycę typu II średnie wartości indeksu elongacji EI są prawie identyczne jak w grupie kontrolnej, natomiast średnie wartości czasu połowicznego odtwarzania agregacji  $T_{1/2}$  znacznie różnią się od siebie. Z kolei u pacjentów z zawałem serca średnia wartość indeksu agregacji AI jest zbliżona do AI z grupy kontrolnej, natomiast średnie wartości amplitudy agregacji  $A_{mp}$  z obydwu grup znacznie różnią się od siebie. U chorych ze zwyrodnieniem plamki żółtej związanym z wiekiem (AMD) jedynie średnia wartość indeksu agregacji AI jest zbliżona do tej z grupy

kontrolnej, pozostałe parametry bardzo różnią się od tych z grupy kontrolnej. Największe różnice, we wszystkich parametrach, w stosunku do grupy kontrolnej obserwuje się dla chorych z rakiem trzustki. Do prawidłowej oceny agregacji i odkształcalności erytrocytów w badanej grupie pacjentów konieczna jest więc analiza wszystkich parametrów mierzonych przy pomocy przyrządu LORCA. Reasumując, można stwierdzić, że laserowo-optyczny rotacyjny analizator krwinek czerwonych LORCA, jako precyzyjny i czuły przyrząd zdolny do wykrywania nawet małych zmian, zarówno w zdolności erytrocytów do odkształceń, jak i ich agregacji, daje możliwość szerokich zastosowań w badaniach klinicznych.

#### PIŚMIENNICTWO:

1. Hardeman M.R., Goedhart P.T., Dobbe J.G.G., Lettinga K.P. Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA); I. A new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters. *Clin. Hemorheol.* 1994; 14: 605-618.
2. Hardeman M.R., Goedhart P.T., Schut N.H. Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA); II. Red blood cell deformability; elongation index versus cell transit time. *Clin. Hemorheol.* 1994; 14: 619-630.
3. Zijlstra W.G. Sylllectometry, a new method for studying rouleaux formation of red blood cells. *Acta Phys. Pharm. Neerl.* 1958; 7: 153-154.
4. Bareford D., Stone P.C.V., Caldwell N.M., Meiselman H.J., Stuart J. Comparison of instruments for measurement of erythrocyte deformability. *Clin. Hemorheol.* 1985; 5: 311-322.
5. Wiewióra M., Sosada K., Wyleżoł M., Słowińska L., Żurawiński W. Red blood cell aggregation and deformability among patients qualified for bariatric surgery. *Obes. Surg.* 2007; 17(3): 365-371.
6. Wasilewski J., Turczyński B., Słowińska L., Kowalik V., Osadnik T., Poloński L. Haemorheological factors and myocardial reperfusion in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary coronary intervention. *Kardiol. Pol.* 2007; 65(7): 778-785.
7. Tażbirek M., Słowińska L., Skoczyński S., Pierzchała W. Short-term continuous positive airway pressure therapy reverses the pathological influence of obstructive sleep apnea on blood rheology parameters. *Clin. Hemorheol.* 2009; 14(4): 241-249.
8. Słowińska L., Michalska-Małecka K., Dorecka M., Romaniuk W. Deviations in values of hemorheological parameters in people suffering from age-related macular degeneration. *Pol. J. Environ. Stud.* 2008; 17(1A): 143-146.
9. Turczyński B., Michalska-Małecka K., Słowińska L., Szczęsny S., Romaniuk W. Nieproliferacyjna retinopatia cukrzycowa a agregacja krwinek czerwonych. *Wiad. Lek.* 2004; 57(11-12): 634-640.
10. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. An update. *N. Engl. J. Med.* 1986; 314: 488-491.
11. Cicco G., Pirrelli A. Red blood cell (RBC) deformability, RBC aggregability and tissue oxygenation in hypertension. *Clin. Hemorheol.* 1999; 21(3-4): 169-177.
12. Wem Z.Y., Song L.C., Yan Z.Y., Lu Z.H., Sun D.G., Sun Y., Chien Shu. An animal model to study erythrocyte senescence with a narrow time window: alterations in osmotic fragility and deformability of erythrocytes during their life span. *Clin. Hemorheol.* 1998; 18(4): 299-306.