

Министерство образования и науки РФ
ФГБОУ ВПО «Ярославский государственный
педагогический университет им. К.Д. Ушинского»

М.В. Малахов, А.А. Мельников, А.Д. Викулов

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТОДОМ БИОИМПЕДАНСНОЙ
СПЕКТРОСКОПИИ**

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Ярославль
2011

УДК 616-71
ББК 75.2я73
М 18

Печатается по решению редакционно-
издательского совета ЯГПУ

Рецензент:

Левин В.Н. – доктор медицинских наук, проф., заведующий
кафедрой медико-биологических основ спорта Ярославского
государственного педагогического университета
им. К.Д. Ушинского

Малахов М.В., Мельников А.А., Викулов А.Д.

М 18 Определение гематологических показателей методом
биоимпедансной спектроскопии : методические
указания. – Ярославль : Изд-во ЯГПУ, 2011. - 41 с.

Задачей настоящего пособия является описание
применения метода биоимпедансной спектроскопии для
исследования электрических свойств крови. В
методических указаниях раскрыты теоретические основы
метода биоимпедансного анализа, описана методика
биоимпедансной спектроскопии, рассмотрены дальнейшие
перспективы применения метода биоимпедансного анализа
для изучения процесса агрегации форменных элементов.

Методические указания предназначены для
студентов медицинских вузов и биологических
факультетов, а также для врачей лабораторной
диагностики.

УДК 616-71
ББК 75.2я73

© ФГБОУ ВПО «Ярославский
государственный
педагогический университет им.
К.Д. Ушинского», 2011
© М.В.Малахов, 2011
© А.А. Мельников, 2011
© А.Д. Викулов, 2011

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Теоретические сведения о методе биоимпедансной спектроскопии	5
Биоимпедансные модели живых объектов.....	11
Физиологическое значение параметров модели Cole.....	18
Применение биоимпедансного анализа в медицине.....	19
Применение биоимпедансного анализа для изучения клеток и тканей.....	22
Применение биоимпедансного анализа для исследования крови и суспензий эритроцитов.....	23
Методика измерения гематологических показателей методом биоимпедансной спектроскопии	25
Материалы исследования.....	25
Методика измерения.....	26
Определение показателей красной крови и скорости оседания эритроцитов с помощью метода биоимпедансной спектроскопии.....	31
Перспектива использования метода БИС для исследования агрегации эритроцитов	38
Темы УИРС	40
Библиографический список	41

Введение

Известно, что показатели крови изменяются при различных физиологических и патологических состояниях, в частности, при заболеваниях крови, воспалительных процессах, злокачественных новообразованиях, беременности, поэтому их количественная оценка является необходимой как в биологии, так и в практической медицине.

Кроме того, при критических состояниях больным переливают цельную кровь и её компоненты. Однако в процессе хранения в крови происходят изменения, существенно снижающие её качество, при этом значительно возрастает риск развития осложнений при трансфузии. Следует отметить, что нет быстрого метода количественной оценки этих изменений. Таким образом, разработка методов исследования крови является важной задачей.

В настоящее время гематологические показатели определяются рутинными методами, а также на автоматических гематологических анализаторах. Оценка рутинными методами заключается в подсчёте количества форменных элементов под световым микроскопом и измерении гематокрита центрифугированием в специальном гематокритном капилляре. Остальные индексы вычисляются на основе полученных значений.

В автоматических анализаторах гематологические показатели определяются кондуктометрическим методом и методом лазерного светорассеивания. Определение показателей крови кондуктометрическим методом заключается в измерении электрического сопротивления между электродами, расположенными по обе стороны отверстия, через которое проходят эритроциты. Принцип лазерного светорассеивания заключается в оценке степени рассеивания лазерного луча, проходящего через красные клетки крови или отраженного от них [1].

В данном издании описан новый метод оценки гематологических показателей на основе биоимпедансной

спектроскопии (БИС). С помощью предложенной методики можно быстро, легко и с высокой точностью определить гематокрит и СОЭ, а также количественно оценить изменения, происходящие в крови в процессе её хранения.

Теоретические сведения о методе биоимпедансной спектроскопии

Основные понятия

Электрический ток – это направленное движение заряженных частиц по проводнику под действием электрического поля.

Количество зарядов, проходящее через поперечное сечение проводника в единицу времени, называется *силой тока* (I , Ампер).

Под *электрическим напряжением* (U , Вольт), которое также называют *разностью потенциалов*, понимают работу, необходимую для перемещения электрического заряда из одной точки в другую. Любой проводник препятствует перемещению зарядов по нему, такое свойство проводника называется *электрическим сопротивлением* (R , Ом). Сопротивление равно отношению напряжения к силе тока $R=U/I$.

Электрический ток, параметры и направление которого не изменяются со временем, называется *постоянным*. Если же направление и сила тока в течение времени меняются, то он называется *переменным*. В цепи переменного тока изменение силы и направления тока происходит периодически, то есть повторяется через равные промежутки времени. Этот промежуток называются *периодом колебаний* (T , с) переменного тока, а величина, обратно пропорциональная периоду – *частотой* (f , Гц) тока. Фактически, частота – это количество полных колебаний в единицу времени.

Электрическая цепь, в которой есть ёмкостный элемент (*конденсатор*), обладает *активным* (R , Ом) и *реактивным* (X_c , Ом) сопротивлением. Активное

сопротивление зависит от свойств проводника, оно обуславливает преобразование электрической энергии в тепло при протекании электрического тока.

Реактивное сопротивление связано с наличием конденсатора, то есть элемента, состоящего из двух пластин проводника (обкладок), разделённых слоем диэлектрика (материала, не проводящего электрический ток). При движении заряженных частиц по проводнику заряд накапливается на обкладках конденсатора. Смена зарядов на обкладках отстаёт от изменения направления тока, поэтому конденсатор оказывает сопротивление току (рис. 1). Это сопротивление и называется реактивным, или ёмкостным. Реактивное сопротивление зависит от ёмкости конденсатора и частоты тока [2].

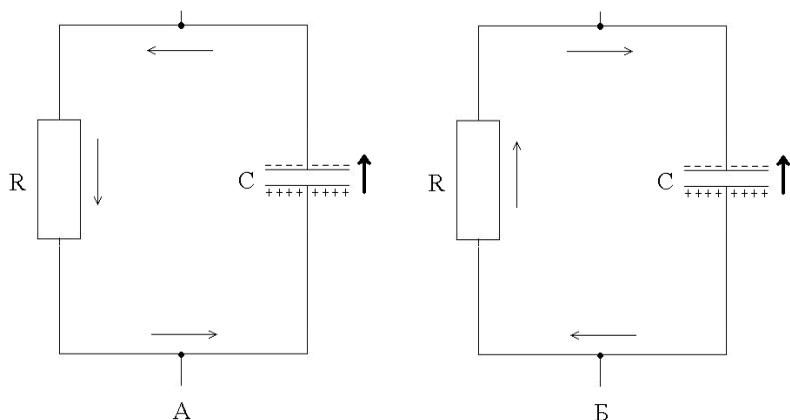


Рис. 1. Активное и реактивное сопротивление в цепи с конденсатором. Электрический ток заряжает конденсатор (А), при изменении направления тока смена заряда на обкладках конденсатора запаздывает (Б). R – сопротивление, C – конденсатор.

Электрическая цепь, в которой есть ёмкостный элемент, обладает комплексным сопротивлением, или *импедансом* (Z , Ом). Значение импеданса Z равно квадратному корню из суммы квадратов R и X_c :

$$Z = \sqrt{R^2 + Xc^2} \quad (1)$$

Измеряя активное и реактивное сопротивление в живых объектах, можно изучать их свойства. Такой метод исследования называется *биоимпедансным анализом (БИА)* [3].

Применительно к живым объектам проводящей средой, которая вносит вклад в активное сопротивление, является внеклеточная и внутриклеточная жидкость, представляющая собой раствор электролитов. Его величина зависит от концентрации ионов в жидкостях организма, их подвижности, содержания белков. Ёмкостное сопротивление определяется мембранами клеток и клеточных органелл. На него влияет суммарная площадь клеточных мембран, их проницаемость и химический состав.

Зависимость биоимпедансных показателей от частоты называется *дисперсией*. Значения параметров биоимпедансного анализа неодинаковы на разных частотах переменного тока. На низких частотах (5 кГц) электрический ток распространяется только по внеклеточному пространству, а на высоких – (500 кГц) внутриклеточная жидкость принимает участие в его проведении. Поскольку с ростом частоты тока объём проводящей среды увеличивается, активное сопротивление и импеданс уменьшаются. Реактивное сопротивление с ростом частоты сначала увеличивается, а затем снова снижается. На рисунке 2 в качестве примера изображены графики частотной зависимости активного (рис. 2А), реактивного (рис. 2Б) и комплексного (рис. 2В) сопротивления образца суспензии эритроцитов.

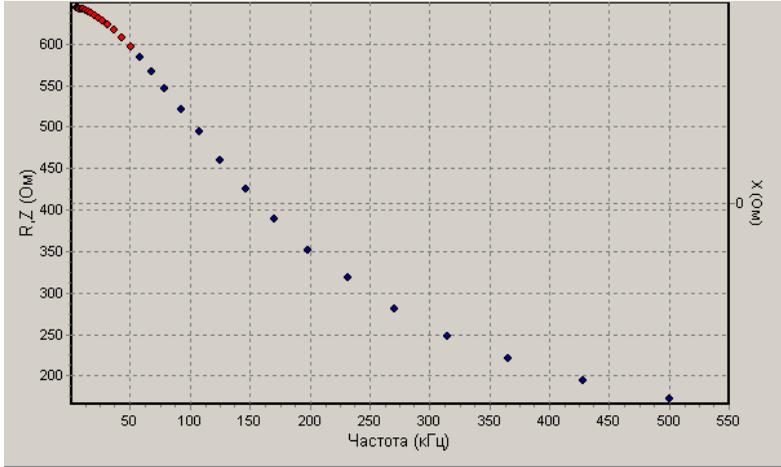


Рисунок 2А. Зависимость активного сопротивления суспензии эритроцитов от частоты тока.

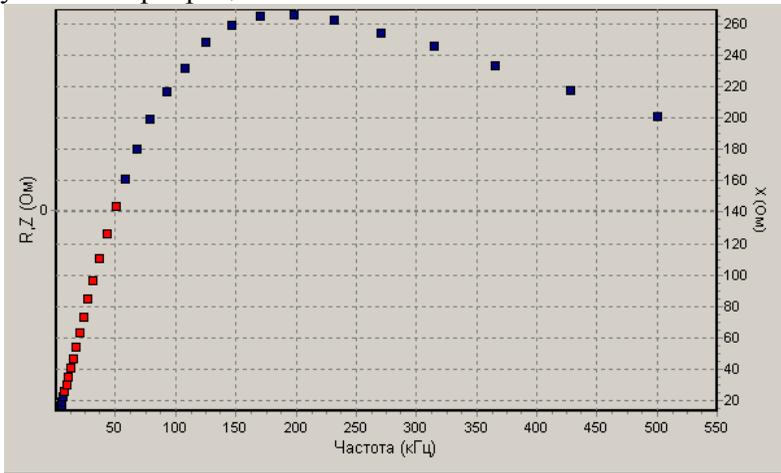


Рисунок 2Б. Зависимость реактивного сопротивления суспензии эритроцитов от частоты тока.

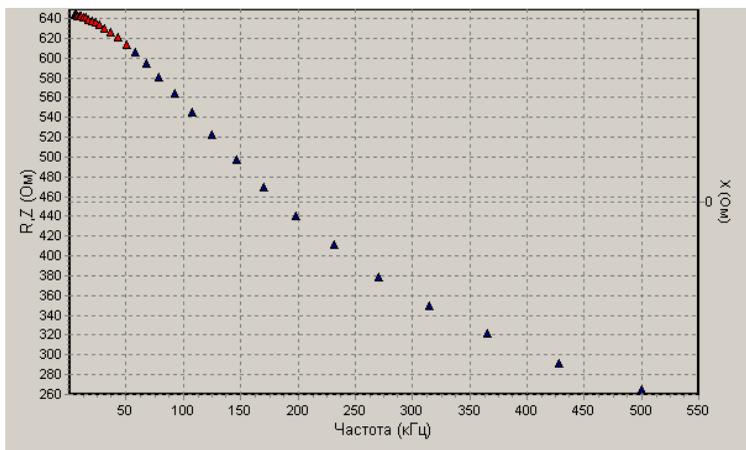


Рисунок 2В. Зависимость комплексного сопротивления (импеданса) суспензии эритроцитов от частоты тока.

Следует отметить, что на разных частотах механизм влияния свойств живых тканей на дисперсию показателей биоимпедансного анализа различен.

Ещё в середине прошлого столетия Шванном [4] было выделено три диапазона дисперсии (рис. 3): низкочастотный, α -дисперсия (от долей герца до нескольких килогерц), среднечастотный, β -дисперсия (от десятков килогерц до 100 МГц) и высокочастотный, γ -дисперсия (от 100 МГц до 100 ГГц).

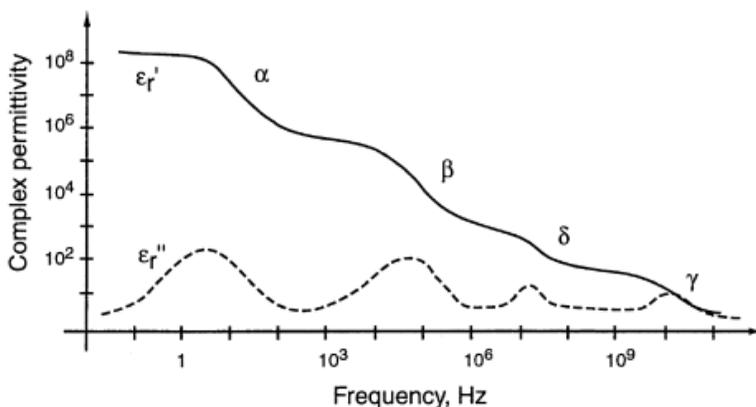


Рисунок 3. Диапазоны дисперсии диэлектрической проницаемости для живых тканей. ϵ_r' – относительная диэлектрическая проницаемость, ϵ_r'' – комплексная диэлектрическая проницаемость.

В низкочастотном α -диапазоне на биоимпедансные параметры оказывает влияние саркоплазматический ретикулум, мембранный потенциал клеток, свойства межклеточных контактов.

В диапазоне β -дисперсии показатели биоимпедансного анализа главным образом зависят от свойств клеточных мембран, а в верхней части диапазона – от крупномолекулярных белков.

Наконец, γ -диапазон обусловлен свойствами белковых молекул, а в верхней части (десятки и сотни гигагерц) – молекулами воды.

В настоящее время выделяют также диапазон δ -дисперсии (10 Мгц – 1ГГц), отражающий свойства связанной с белками воды.

Таким образом, можно исследовать различные свойства биологических объектов, измеряя их импеданс на разных частотах переменного тока. Такой метод исследования называется *биоимпедансной спектроскопией* [3].

Биоимпедансные модели живых объектов

При исследовании биологических объектов методом биоимпедансного анализа используются модели, в которых живая ткань представлена в виде эквивалентных электрических схем, в той или иной степени сходных с ней по особенностям проведения тока. С помощью различных моделей данные, полученные в процессе электрических измерений живых тел, могут быть интерпретированы для отражения их свойств [5].

1. Одна из простейших моделей предложена Дебаем. Он рассматривал живой объект в виде эквивалентной схемы, включающей в себя два ёмкостных элемента и один элемент, обладающий сопротивлением ($1R-2C$) (рис. 4)

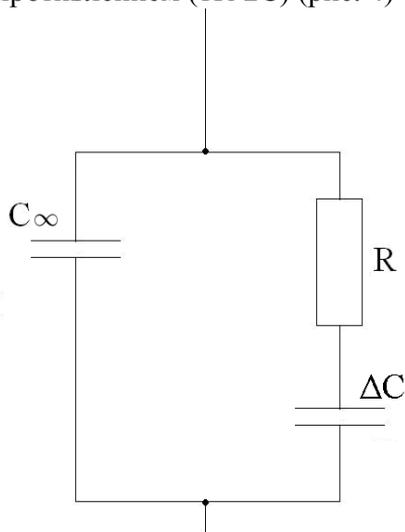


Рисунок 4. Эквивалентная схема для модели Дебая. R – сопротивление, C_∞ – ёмкость на частоте, стремящейся к бесконечности, ΔC – разность между ёмкостью на частоте, стремящейся к нулю, и ёмкостью на частоте, стремящейся к бесконечности.

Следует отметить, что модель Дебая не учитывает наличия в измеряемом объекте свободных зарядов. Таким

образом, она позволяет изучать свойства только сухих живых тел, не содержащих растворы электролитов, что существенно ограничивает её применение.

2. Более совершенная модель была разработана Максвеллом. Она рассматривает процессы, происходящие на границе разделов двух разных диэлектриков. Электрическая схема для этой модели включает в себя два элемента, обладающих сопротивлением, и два ёмкостных элемента (2R-2C) (рис. 5)

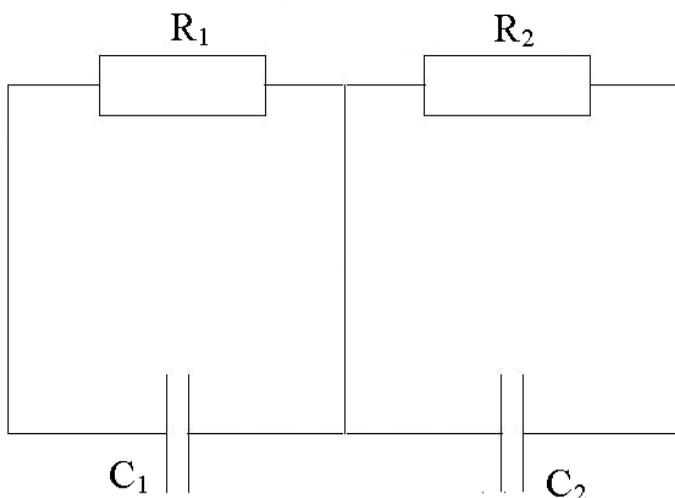


Рисунок 5. Эквивалентная схема для модели Максвелла.

Модель Максвелла даёт возможность изучать электрические свойства суспензий сферических частиц из диэлектрического материала, при этом как их внутреннее содержимое, так и суспендирующий раствор являются токопроводящими жидкостями. Поскольку клетки окружены мембраной, являющейся диэлектриком, а внеклеточная и внутриклеточная жидкость проводит электрический ток, эту модель можно использовать для исследования клеточных суспензий в растворах электролитов.

3. В настоящее время для изучения электрических свойств живых объектов широко используется модель, предложенная Кеннетом Коулом в 1940-х годах. В эквивалентной электрической схеме для этой модели есть два элемента, обладающих сопротивлением, и один ёмкостный элемент (2R-1C). Один из элементов, обладающих сопротивлением, соответствует внеклеточной жидкости (обозначается R_e), другой – внутриклеточной (обозначается R_i). Ёмкостный элемент отражает свойства клеточных мембран (обозначается C_m), поскольку мембрана является слоем диэлектрика, разделяющим два раствора электролитов (рис. 6).

Эта схема обладает активным (R) и реактивным, или ёмкостным (X_c) сопротивлением, причём как R , так и X_c зависит от частоты переменного тока. С ростом частоты активное сопротивление снижается, поскольку внутриклеточная жидкость принимает участие в проведении тока, и объём проводящей среды увеличивается.

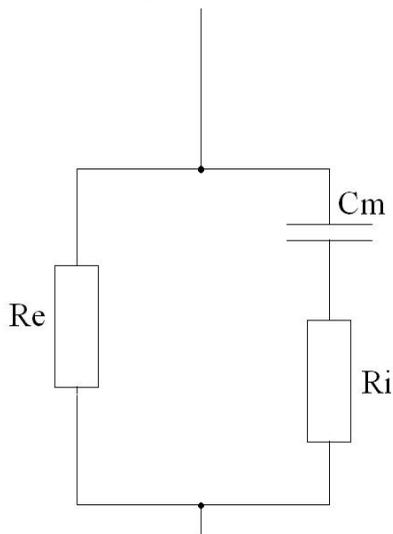


Рисунок 6. Эквивалентная схема для модели Коула.
Пояснения в тексте.

X_c с ростом частоты тока возрастает до определённого значения, а затем вновь снижается. Частота, на которой реактивное сопротивление принимает максимальное значение, называется характеристической.

Аппроксимированный график, отражающий отношение X_c к R на разных частотах переменного тока, называется годографом, или импедансным локусом. Годограф имеет вид полуокружности с центром на оси R , пересекающей эту ось в двух точках: R_0 и R_∞ . Значения этих точек являются экстраполированными. R_0 соответствует сопротивлению на 0 частоте, R_∞ – сопротивлению на очень высокой частоте. Используя значения R_0 и R_∞ можно рассчитать сопротивление внеклеточной (R_e) и внутриклеточной (R_i) жидкости. Фактически R_0 соответствует сопротивлению внеклеточной жидкости R_e , а R_∞ – параллельному соединению R_e и R_i (рис. 6). R_i вычисляется на основе R_0 и R_∞ .

Следует отметить, что в этой схеме изменение напряжения отстаёт от изменения силы тока на временной интервал, который называется фазовым сдвигом. Величина фазового сдвига также зависит от частоты тока. Фазовый сдвиг, который соответствует характеристической частоте, называется постоянной времени (τ_c) для изучаемого объекта. Постоянная времени прямо пропорциональна электрической ёмкости и обратно пропорциональна сумме проводимостей внеклеточной и внутриклеточной жидкости [5]:

$$\tau_c = aCm(1/2\sigma_2 + 1/\sigma_1) \quad (2),$$

где:

τ_c – постоянная времени;

a – радиус частиц;

Cm – электрическая ёмкость;

σ_1 – проводимость внутриклеточной жидкости;

σ_2 – проводимость внеклеточной жидкости

Поскольку сопротивление – это величина, обратная проводимости, τ_c пропорциональна сумме сопротивления внеклеточной и внутриклеточной жидкости и электрической ёмкости (уравнение 2). Так как F_{char} – это величина обратная τ_c , её значение обратно пропорционально сумме сопротивлений внеклеточной и внутриклеточной жидкости и электрической ёмкости в измеряемом живом объекте.

Поскольку биологические объекты состоят из большого количества неоднородных по форме и величине элементов (клеток и тканевых структур), каждый из которых имеет разные значения τ_c , живая ткань обладает определённым диапазоном значений постоянной времени. Рассмотренная на рисунке 6 эквивалентная схема обладает только одним значением τ_c , а значит, не позволяет учитывать неоднородность клеточных элементов.

Для более точного соответствия электрической схемы биологическим объектам Коул вместо ёмкостного элемента ввёл в неё так называемый CPE – constant phase element, то есть элемент, у которого значение τ_c не зависит от частоты (рис. 7). Этот элемент характеризуется безразмерным параметром Alpha, который может принимать значения от 0 до 1. Величина Alpha определяет положение годографа относительно оси R. При $\alpha = 1$ элемент CPE превращается в идеальный конденсатор, а годограф становится половиной окружности с центром на оси R.

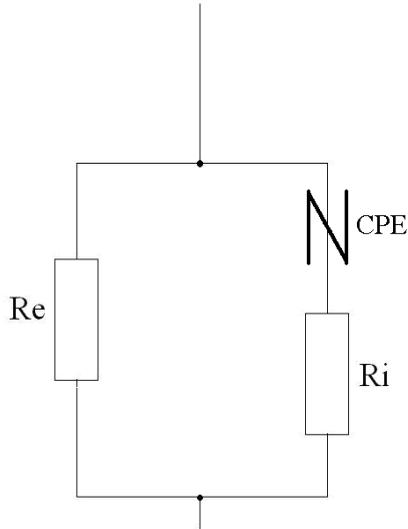


Рисунок 7. Эквивалентная схема с СРЕ. Пояснения в тексте.

При уменьшении α центр окружности смещается вниз, так что годограф становится частью полуокружности. При $\alpha = 0$ элемент СРЕ вырождается в идеальное сопротивление, а годограф сжимается в точку на оси R (рис. 8) [3].

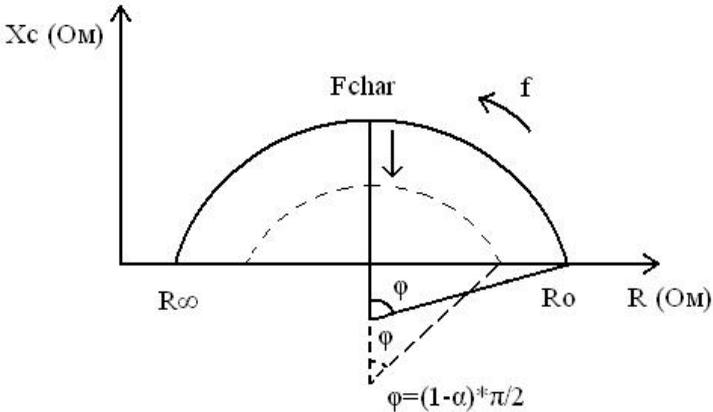


Рисунок 8. Уменьшение параметра Alpha при смещении годографа вниз. R – активное сопротивление, X_c – реактивное сопротивление, f – частота, F_{char} –

характеристическая частота, α – параметр Alpha, R_0 , R_∞ – сопротивление на частоте, равной нулю и частоте, стремящейся к бесконечности соответственно.

Частотные характеристики импеданса живых тканей описываются уравнением, предложенным Коулом в 1941 году:

$$Z = R_\infty + \frac{\Delta R}{1 + (j\omega\tau_c)^\alpha} \quad (3),$$

где Z – импеданс;

R_∞ – сопротивление на частоте, стремящейся к бесконечности;

ΔR – разность между R_0 и R_∞ ;

j – мнимая единица;

ω – частота;

τ_c – постоянная времени;

α – параметр Alpha.

Значение электрической ёмкости рассчитывается на основе остальных параметров модели Cole [6]:

$$C_m = \frac{1}{2\pi \times F_{char} \times (R_i + R_e)^{1/(1-\alpha)}}$$

(4),

где C_m – электрическая ёмкость;

F_{char} – характеристическая частота;

R_i – сопротивление внутриклеточной жидкости;

R_e – сопротивление внеклеточной жидкости;

α – параметр Alpha.

Таким образом, с помощью модели Cole можно рассчитать величины сопротивления внеклеточной R_e и внутриклеточной R_i жидкости, характеристическую частоту F_{char} , параметр Alpha и электрическую ёмкость C_m .

Физиологическое значение параметров модели Cole

Следует отметить, что различные физиологические свойства биологических объектов оказывают влияние на параметры модели Cole.

Известно, что сопротивление проводника зависит от объёма проводящей среды и её проводимости.

В живых тканях проводящей средой является внеклеточная и внутриклеточная жидкость. Следовательно, основные факторы, влияющие на R_e и R_i , – это объём соответственно внеклеточной и внутриклеточной жидкости, а также её проводимость, которая, в свою очередь, определяется концентрацией ионов и их подвижностью [7].

Электрическая ёмкость – это отношение количества заряда на пластинах проводника со слоем диэлектрика между ними к напряжению между этими пластинами. Она прямо пропорциональна площади пластин проводника и диэлектрической проницаемости диэлектрика и обратно пропорциональна толщине его слоя. Под диэлектрической проницаемостью понимают поляризуемость диэлектрика в электрическом поле, она характеризует его ёмкостные свойства. В биологических объектах ёмкость определяется клеточными мембранами, так как они представляют собой слой диэлектрика между двумя проводящими областями – внеклеточной и внутриклеточной жидкостью. Известно, что в значение ёмкости вносят вклад мембранные белки, поскольку они обладают высоким значением диэлектрической проницаемости. Однако основным фактором, оказывающим влияние на электрическую ёмкость живых тканей, является суммарная площадь клеточных мембран в измеряемом объекте [5].

Характеристическая частота обратно пропорциональна значению постоянной времени измеряемого биологического объекта, τ_c в свою очередь, зависит от сумм R_e и R_i , а также от C_m живой ткани. Таким образом, F_{char} является комплексной величиной, на которую влияют как

сопротивление внеклеточной и внутриклеточной жидкости, так и электрическая ёмкость.

Параметр Alpha отражает диапазон значений τ_c , чем больше разброс постоянных времени, тем Alpha меньше, и наоборот. В биологических объектах Alpha определяется неоднородностью по форме и размерам клеточных элементов в измеряемом образце. Каждая клетка в измеряемой ткани имеет своё значение τ_c . Если клетки в измеряемой ткани различаются по форме и размерам, диапазон значений τ_c большой, параметр Alpha при этом приближается к 0. Напротив, если клеточные элементы в биологическом объекте одинаковы, то диапазон значений постоянных времени небольшой, и значение Alpha стремится к 1. Кроме того, на Alpha оказывают влияние размер клеток, анизотропия измеряемого образца, взаимодействия между клеточными элементами [5].

Применение биоимпедансного анализа в медицине

Биоимпедансный анализ позволяет определить объём внеклеточной, внутриклеточной и общей жидкости организма, а также оценить тощую и жировую массу тела с высокой точностью. Кроме того, метод БИА является неинвазивным, сравнительно недорогим и простым в использовании, не требует высокой квалификации персонала, что позволяет широко использовать его в клинической практике. Ниже будут рассмотрены некоторые области применения метода биоимпедансного анализа в медицине.

1. *Использование БИА в диагностике ожирения.* Ожирение является широко распространённой патологией, ухудшающей качество жизни и приводящей к серьёзным осложнениям. Для диагностики ожирения в клинической практике используют индекс массы тела, то есть отношение массы тела к квадрату длины тела. Однако этот показатель не всегда свидетельствует об ожирении, а может быть связан, например, с гипертрофией мышц. Поскольку биоимпедансный анализ позволяет оценить жировую и

тощую массу тела, его можно использовать как альтернативный метод для более точной и надежной диагностики ожирения.

2. *Использование БИА в медицине критических состояний.* В интенсивной терапии мониторинг гидратации организма и перераспределения жидкости между водными секторами является очень важным компонентом диагностики и оценки декомпенсации жизненно важных функций. Так как с помощью биоимпедансного анализа возможно быстрое и точное определение объемов внеклеточной и внутриклеточной жидкости, БИА используется как один из методов диагностики в медицине критических состояний. С помощью биоимпедансного анализа можно оценивать изменение содержания жидкости в организме во время и после оперативных вмешательств, а также при различных патологических состояниях (например, перемещение воды и сосудистого русла в интерстициальное пространство при сепсисе).

3. *Использование БИА в диагностике заболеваний сердечно-сосудистой системы.* Биоимпедансный анализ даёт возможность оценивать гемодинамические показатели, например, периферическое сосудистое сопротивление, ударный объём. Кроме того, совместно с методом ультразвукового исследования сердца (эхокардиоскопией) метод БИА позволяет выявить гипертрофию левого желудочка, которая является осложнением артериальной гипертензии. Для этого используется индекс отношения массы миокарда левого желудочка, получаемой с помощью эхокардиоскопии, к тощей массе тела, которую оценивают с помощью БИА.

4. *Использование БИА в акушерстве.* Биоимпедансный анализ используется в акушерстве для диагностики преэклампсии. Беременность осложняется преэклампсией в 5% – 7% случаев, это заболевание является ведущей причиной перинатальной материнской смертности. Преэклампсия сопровождается задержкой воды в организме

вследствие уменьшения клубочковой фильтрации, а также перераспределением жидкости из сосудистого русла в интерстициальное пространство из-за увеличения проницаемости капилляров и снижения онкотического давления. Поскольку показатели биоимпедансного анализа являются чувствительными к перераспределению жидкости между водными секторами, этот метод позволяет выявить указанные изменения, характерные для преэклампсии.

5. *Использование БИА в трансплантологии.* В настоящее время трансплантация органов и тканей получила широкое распространение в клинической практике. Однако после пересадки трансплантата может произойти его отторжение, поэтому оценка жизнеспособности пересаживаемого органа и выявление ранних признаков отторжения является важной задачей. С помощью биоимпедансного анализа можно выявить изменения, происходящие в пересаживаемых органах при снижении их жизнеспособности (замещение жировой тканью, ишемия, отёк). БИА также даёт возможность обнаружить признаки отторжения трансплантата, поскольку динамика биоимпедансных показателей пересаженных органов отражает гистологические и биохимические изменения, происходящие при их отторжении.

6. *Электроимпедансная томография.* Томография, то есть неразрушающее послойное исследование внутренней структуры объекта, является широко распространённым методом диагностики. Внутреннюю структуру организма можно изучать, оценивая разное сопротивление различных тканей электрическому току. Такой метод исследования называется электроимпедансной томографией (ЭИТ). ЭИТ даёт возможность выявить нарушение лёгочной вентиляции, диагностировать нарушения мозгового кровообращения, злокачественные новообразования простаты и молочной железы. Следует отметить, что к недостаткам электроимпедансной томографии относится низкая разрешающая способность. Сочетая ЭИТ с

магнитно-резонансной томографией, можно существенно повысить качество получаемых изображений.

Применение биоимпедансного анализа для изучения клеток и тканей

БИА может быть использован не только для исследования целого организма, но и для изучения тканей, клеточных культур и отдельных клеток. В частности метод биоимпедансного анализа позволяет оценить толщину слоя клеточной культуры, а также степень извитости межклеточного пространства и свойства межклеточных контактов. Уменьшение адгезивных свойств клеток при их обработке трипсином приводят к снижению импеданса однослойной клеточной культуры.

Кроме того, с помощью биоимпедансного анализа можно оценить свойства клеточных мембран. Так, электропорация, то есть воздействие на мембраны клеток электрическим полем для создания в них пор, приводит к снижению импеданса ткани вследствие увеличения проницаемости клеточных мембран для ионов. Адсорбция белков на мембранах клеток приводит к росту диэлектрической проницаемости и снижению характеристической частоты измеряемой ткани.

Метод биоимпедансного анализа является чувствительным к процессам, происходящим в клетках при действии на них токсических веществ. Например, при длительной инкубации мезотелиоцитов в растворе асбеста нетоксичной концентрации происходит уменьшение электрической ёмкости и снижение электропроводности цитоплазмы, обусловленное повреждением клеточных мембран и увеличением их проницаемости. При действии на культуру эндотелия цитохалазином отмечается снижение внеклеточного сопротивления, связанное с нарушением межклеточных контактов, а также рост электрической ёмкости вследствие увеличения складчатости мембран.

Метод БИА даёт возможность изучать процесс деления клеток. Увеличение размеров клеточной культуры так и появление перегородок между клетками в процессе деления приводит к циклическим изменениям показателей биоимпедансного анализа.

Применение микрокамер для исследования электрических свойств клеточных суспензий и отдельных клеток позволяет существенно повысить точность измерений. При этом значительно уменьшается подаваемое напряжение, облегчается контроль температуры в измерительной камере. С помощью цитометров с микрокамерами можно оценивать форму и размеры клеток, дифференцировать различные их типы (например, опухолевые и нормальные), а также исследовать свойства клеточных мембран.

Применение биоимпедансного анализа для исследования крови и суспензий эритроцитов

Метод биоимпедансного анализа используется для изучения свойств крови, эритроцитарных суспензий, а также отдельных форменных элементов.

На биоимпедансные параметры в значительной степени оказывает влияние гематокрит. Тесная связь показателей биоимпедансного анализа с гематокритом обусловлена чувствительностью БИА к общему объёму внеклеточной и внутриклеточной жидкости, а также к суммарной площади клеточных мембран. Более того, значение гематокрита, рассчитанное на основе электрических показателей крови, является более точным, чем полученное центрифугированием в гематокритном капилляре, поскольку при этом исключается деформирующее воздействие на форменные элементы. Кроме гематокрита, метод БИА позволяет определить концентрацию эритроцитов в измеряемом образце крови.

На значения параметров биоимпедансной спектроскопии оказывает влияние концентрация белков в

плазме, поскольку электрические свойства мембран форменных элементов изменяются при адсорбции на них протеинов. Кроме того, белки ускоряют процесс агрегации эритроцитов, что также приводит к изменению показателей биоимпедансного анализа.

Биоимпедансные параметры связаны с величиной скорости оседания эритроцитов, что объясняется зависимостью СОЭ от показателей крови (содержание белков, гематокрит), которые влияют и на её электрические свойства.

Показатели биоимпедансного анализа являются чувствительными к изменениям, происходящим в эритроцитах и плазме крови в процессе её хранения.

Воздействие на кровь физических факторов приводит к изменениям её электрических свойств. В частности, повышение температуры приводит к росту проводимости и снижению диэлектрической проницаемости исследуемого образца крови, характеристическая частота при этом не меняется. Под действием сильного магнитного поля происходит рост сопротивления внеклеточной жидкости и электрической ёмкости образца крови. Облучение животных различными дозами гамма-излучения приводит к повышению вязкости их крови, при этом её диэлектрическая проницаемость снижается, а характеристическая частота возрастает.

Следует отметить, что имеются различия между биоимпедансными показателями движущейся и неподвижной крови, поскольку при движении крови происходит переориентация эритроцитов параллельно потоку, при этом проявляется анизотропия её электрических свойств. В направлении потока крови электропроводность возрастает, а в перпендикулярном направлении – снижается.

Метод биоимпедансного анализа является чувствительным к изменениям, происходящим в крови при различных патологических состояниях. Так, например, при малярии наличие плазмодиев в эритроцитах вызывает рост сопротивления внутриклеточной жидкости и электрической

ёмкости измеряемых образцов. Заболевания, сопровождающиеся нарушением реологических свойств крови (например, сахарный диабет), вызывают рост диэлектрической проницаемости и электропроводности.

Биоимпедансный анализ позволяет изучать процесс формирования агрегатов из эритроцитов в виде «монетных столбиков». Агрегация эритроцитов сопровождается ростом проводимости и ёмкости, а разрушение – к снижению этих параметров БИС. Повышение электрической ёмкости при агрегации форменных элементов обусловлено их взаимной поляризацией.

Следует отметить, что электрические свойства агрегатов эритроцитов анизотропны. В случае, когда направление электрического поля параллельно оси агрегата, увеличение количества эритроцитов в «монетном столбике» приводит к росту диэлектрической проницаемости и снижению характеристической частоты, и наоборот, если электрическое поле перпендикулярно оси, диэлектрическая проницаемость уменьшается, а характеристическая частота возрастает.

Методика измерения гематологических показателей методом биоимпедансной спектроскопии

Необходимые приборы и материалы:

- образец крови,
- измерительная камера,
- биоимпедансный анализатор,
- компьютер и специализированное программное обеспечение.

Материалы исследования

Для определения гематологических показателей используют образцы венозной крови. Забор крови осуществляют методом венепункции, кровь собирается в

стерильные гепаринизированные вакуумные пробирки. Для повышения точности измерений следует избегать температурных и механических воздействий на кровь, а также максимально сократить время между забором крови и процессом измерения. Перед процессом измерения образец крови необходимо тщательно перемешать для исключения влияния процесса агрегации эритроцитов на его результаты.

Методика измерения

Для определения гематологических показателей методом БИС образцы крови объёмом 1 мл помещают в измерительную камеру. Камера представляет собой неподвижно зафиксированную в вертикальном положении пластиковую трубку диаметром 8 мм. Перпендикулярно её оси через центр параллельно друг другу проходят электроды из позолоченной медной проволоки. Диаметр токовых (ТЭ) электродов равен 3 мм, потенциальных (ПЭ) – 0,5 мм. Расстояние между потенциальными электродами составляет 2,5 мм, между потенциальными и токовыми – 3 мм. Общее расстояние между токовыми электродами равно 9 мм (рис. 10). Затем электроды подсоединяют к соответствующим клеммам биоимпедансного анализатора ABC-01 «Медасс». Анализатор подключают к персональному компьютеру с установленным программным обеспечением ABC01-024 посредством USB-кабеля и получают значения сопротивления внеклеточной (R_e , Ом) и внутриклеточной (R_i , Ом) жидкости, электрической ёмкости (C_m , пФ), характеристической частоты (f_{char} , кГц) и параметра Alpha.

Программа ABC01-024 графически отображает изменение активного, реактивного сопротивления и импеданса в процессе измерения (рис. 9А), выстраивает годограф (рис. 9Б), выдаёт полученные и рассчитанные показатели биоимпедансной спектроскопии и позволяет экспортировать их в приложение MS Excel (рис. 9В).

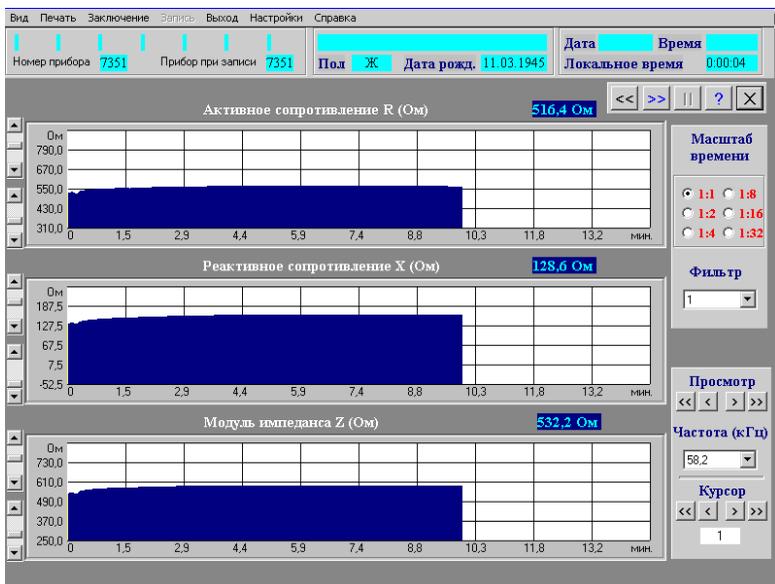


Рис 9А. Изменение активного, реактивного и комплексного сопротивления суспензии эритроцитов в процессе измерения.

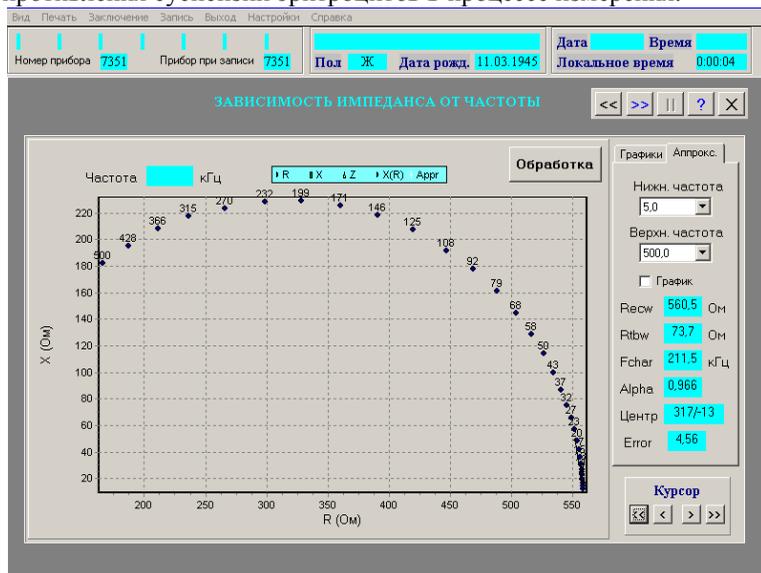


Рис. 9Б. Годограф, полученный в программе ABC01-024 при измерении суспензии эритроцитов.

Вид Печать Заключение Запись Выход Настройки Справка

Номер прибора 7351 Прибор при записи 7351

Дата Ж Дата рожд. 11.03.1945

Локальное время 00:08

ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ СОСТАВА ТЕЛА

Рост (см) Вес (кг) ИМТ (кг/кв.м)

50 кГц		Другие частоты		
Активн.сопр. R50 (Ом)	534,1	Аппрокс. 0 кГц. R _{сw} (Ом)	570,3	ECW _{arrg} (кг)
Ревект.сопр. Xс50 (Ом)	117,3	5 кГц. R5 (Ом)	567,8	ECW5 (кг)
Фаз угол Phi50 (град)	12,39	500 кГц. R500 (Ом)	166,5	TBW500 (кг)
Общая вода TBW50 (кг)		Аппрокс. 500 кГц. R500a (Ом)	157,6	TBW500a (кг)
Тощая масса (кг)		Аппрокс. бесконечн. R _{tbw} (Ом)	71,4	TBW _{arrg} (кг)
Жировая масса (кг)		Аппрокс. внутриклет. R _{icw} (Ом)	81,6	ICW _{arrg} (кг)
Активная клет.масса (кг)		Расчетное значение TBW50 - ECW5 = ICW50 (кг)		
Внеклеточная масса (кг)		Фазовый угол клеточной составляющей на 50 кГц (град)		
Масса скелетной мускулатуры (кг)				
Параметры модели Cole для импедансов				
Характеристическая частота F _{сher} (кГц)		209,3	Alpha 0,960	
Параметры модели Cole для комплексных проводимостей				
Характеристическая частота F _{сher} (кГц)		-	Alpha -	

Экспорт Заголовки

Рис. 9В. Параметры биоимпедансной спектроскопии, полученные в программе ABC01-024 при измерении суспензии эритроцитов.

Измерения выполняются при комнатной температуре ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) в диапазоне частот 5 – 500 кГц (31 частота). Процесс подготовки и само измерение занимает не более 30 секунд.

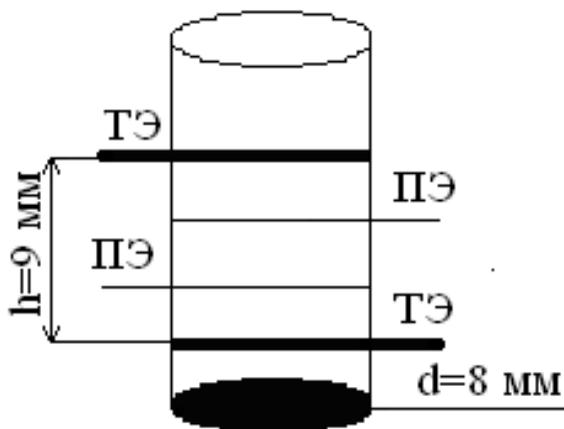


Рисунок 10. Схема измерительной камеры. ТЭ – токовые электроды, ПЭ – потенциальные электроды.

Следует отметить, что недостатком описанной выше измерительной камеры является неравномерное распространение электрического поля по измеряемому образцу из-за геометрии токовых и измерительных электродов, что приводит к снижению точности измерения показателей крови.

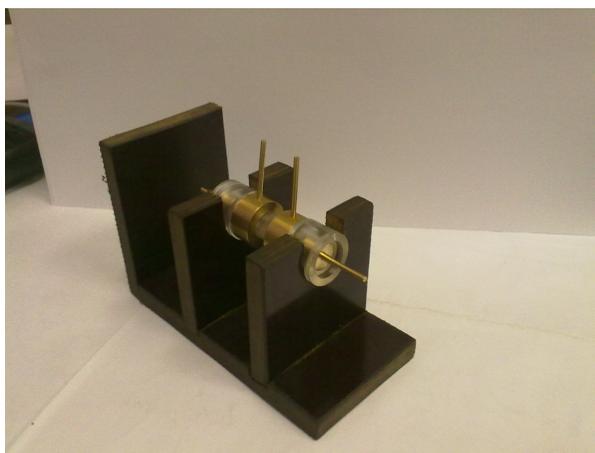


Рисунок 11. Измерительная камера с изменённой конструкцией.

Для более равномерного распространения электрического поля конструкция камеры может быть изменена: токовые электроды изготавливаются в виде заглушек с торцов камеры, а потенциальные – в виде втулок. Между токовыми и потенциальными электродами вставляются переходники из диэлектрического материала, а между потенциальными электродами – пластиковая трубка (рис. 11).

Таким образом, камера является разборной. Такая конструкция токовых и потенциальных электродов и их расположение в корпусе не только обеспечивает более равномерное распространение электрического поля по измеряемому образцу (рис. 12), что повышает точность измерения, но и облегчает обработку камеры.

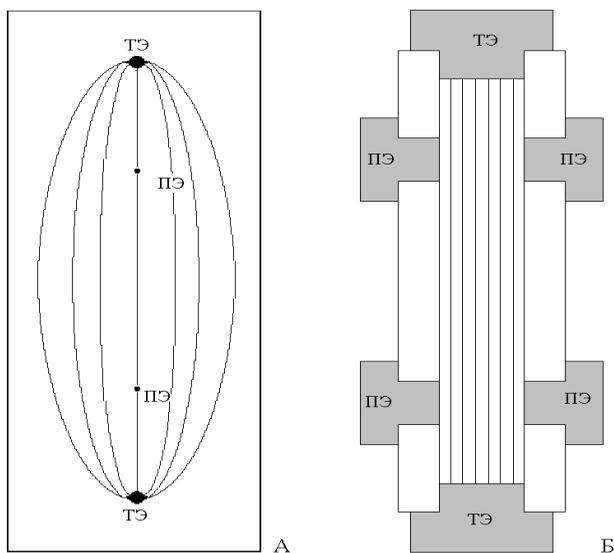


Рисунок 12. Распространение электрического поля по измеряемым образцам крови в камерах разной конструкции. А – электрическое поле распространяется неравномерно, его линии искривлены, Б – в измерительной камере с изменённой конструкцией электрическое поле распространяется равномерно.

Определение показателей красной крови и скорости оседания эритроцитов с помощью метода биоимпедансной спектроскопии.

Гематокрит, содержание гемоглобина, концентрация эритроцитов

На основе полученных значений параметров БИС (сопротивления внеклеточной (R_e , Ом) и внутриклеточной (R_i , Ом) жидкости, электрической ёмкости (C_m , пФ), характеристической частоты (F_{char} , кГц) и параметра Alpha), рассчитывают гематокрит (Ht, %), используя следующее уравнение множественной регрессии (5):

$$Ht (\%) = 0,17R_e - 0,28R_i - 0,01F_{char} - 0,16C_m + 9,98\text{Alpha} + 75,1 \quad (5),$$

где

Ht (%) – гематокрит

R_e (Ом) – сопротивление внеклеточной жидкости

R_i (Ом) – сопротивление внутриклеточной жидкости

C_m (пФ) – электрическая ёмкость

F_{char} (кГц) – характеристическая частота

Alpha – параметр Alpha.

На рисунке 13 изображена корреляционная связь между гематокритным показателем, рассчитанным с помощью представленного уравнения множественной регрессии, и измеренным на автоматическом гематологическом анализаторе, коэффициент корреляции $r=0,91$.

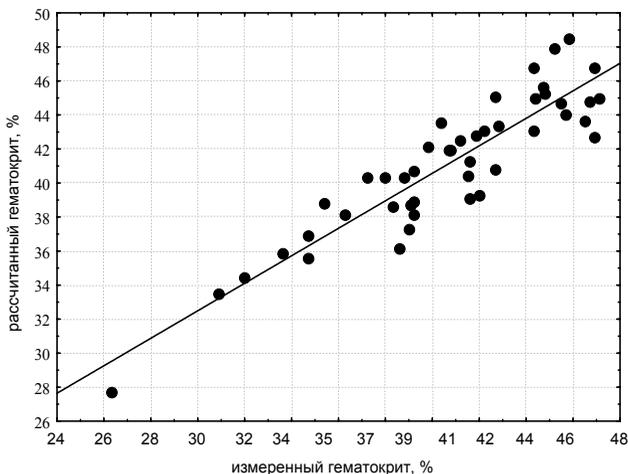


Рисунок 13. Корреляция рассчитанного и измеренного гематокрита ($r=0,91$).

Используя полученные при измерении образцов крови параметры БИС можно также вычислить значения содержания гемоглобина (Hb, г/л) (уравнение 6) и концентрации эритроцитов (RBC, $10^{12}/л$) (уравнение 7).

$$\text{Hb (г/л)} = 0,38\text{Re} - 1,04\text{Ri} - 0,08\text{Fchar} - 27,16\text{Alpha} - 0,63\text{Cm} + 368,4 \quad (6)$$

$$\text{RBC (}10^{12}/л\text{)} = 0,03\text{Re} - 0,01\text{Ri} + 0,004\text{Fchar} + 18,3\text{Alpha} + 0,02\text{Cm} - 18,4 \quad (7)$$

Коэффициенты корреляции (r) рассчитанных и измеренных на автоматическом анализаторе значений содержания гемоглобина и концентрации эритроцитов составляют 0,89 и 0,80 соответственно (рис. 14, 15)

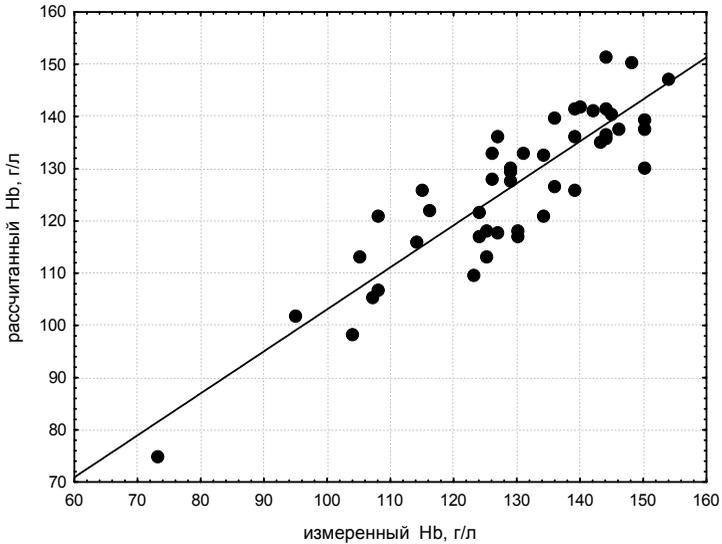


Рисунок 14. Корреляция рассчитанного и измеренного содержания гемоглобина ($r=0,89$).

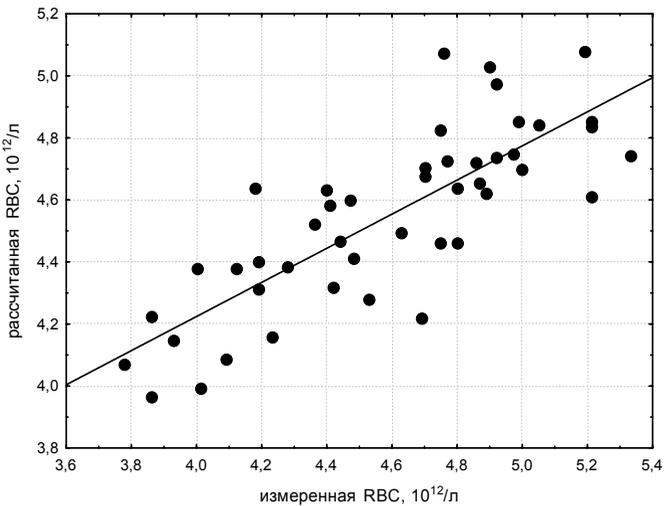


Рисунок 15. Корреляция рассчитанной и измеренной концентрации эритроцитов ($r=0,80$).

Таким образом, методика биоимпедансной спектроскопии позволяет с достаточно высокой точностью определить основные показатели красной крови (гематокрит, содержание гемоглобина, концентрацию эритроцитов).

Скорость оседания эритроцитов

В крови, помещённой в неподвижную камеру, происходит взаимодействие между форменными элементами, они формируют агрегаты в виде монетных столбиков, которые затем оседают на дно пробирки (рис. 16) [8]. На скорость процесса агрегации и оседания форменных элементов влияет гематокрит, а также содержание крупномолекулярных белков в плазме. При различных патологических (воспалительные процессы, злокачественные новообразования) и физиологических (беременность) состояниях концентрация плазменных белков изменяется, что влияет на скорость оседания эритроцитов (СОЭ). Таким образом, оценка СОЭ является важным диагностическим тестом. В клинической практике скорость оседания эритроцитов определяется методом Панченкова: кровь, смешанную с антикоагулянтом (цитрат натрия) в соотношении 4:1 набирают в вертикально фиксированный капилляр высотой 100 мм и оставляют на час. Высота столбика плазмы над эритроцитами через час и будет равна СОЭ. Очевидно, что этот метод определения скорости оседания эритроцитов требует много времени.

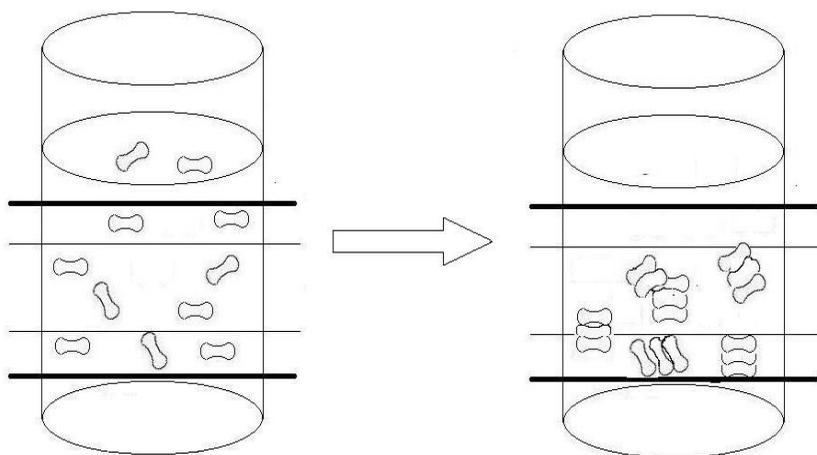


Рисунок 16. Формирование агрегатов и их оседание на дно измерительной камеры.

С помощью метода БИС можно получить значение СОЭ значительно быстрее, поскольку все параметры биоимпедансной спектроскопии в неподвижной крови изменяются в течение первых минут (рис. 17, 18).

Для оценки СОЭ с помощью метода БИС образец крови объёмом 1 мл помещают в измерительную камеру, предварительно тщательно перемешав его. Далее измеряют параметры БИС (Re , Ri , Sm , $Fchar$ и $Alpha$) в течение 3 минут, после чего рассчитывают процентные изменения для всех этих показателей на 3 минуте по сравнению с началом измерения (ΔRe_3 , ΔRi_3 , $\Delta Fchar_3$, $\Delta Alpha_3$ и ΔSm_3). Величина СОЭ (мм/ч) рассчитывается на основе следующего уравнения множественной регрессии (уравнение 8):

$$COЭ \text{ (мм/ч)} = 0,14\Delta Re_3 - 0,07\Delta Ri_3 + 0,10\Delta Fchar_3 + 0,24\Delta Alpha_3 + 0,05\Delta Sm_3 + 0,70 \quad (8)$$

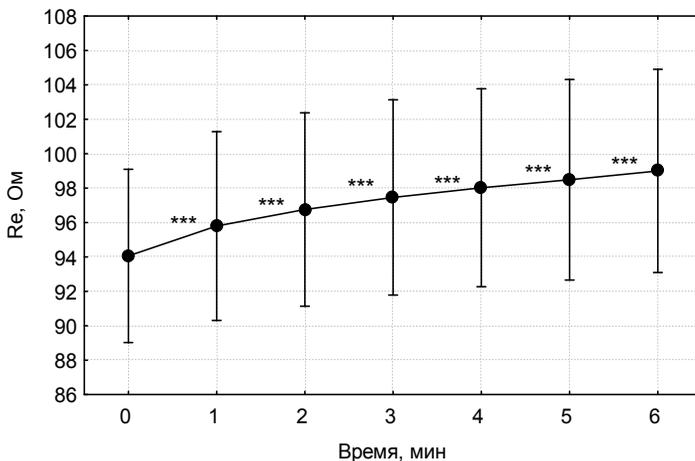


Рисунок 17. Изменение величины Re в неподвижной крови в течение 6 минут.

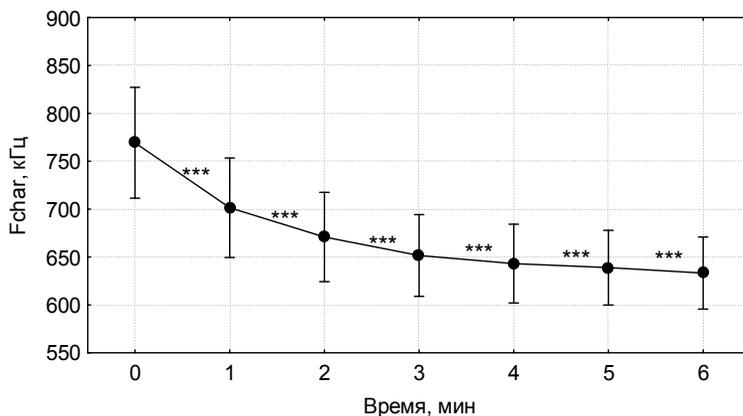


Рисунок 18. Изменение величины F_{char} в неподвижной крови в течение 6 минут.

Количественная оценка изменений, происходящих в крови в процессе хранения

Известно, что изменения, происходящие в хранящейся крови, существенно снижают её качество и пригодность для трансфузии. Следует отметить, что все параметры

биоимпедансной спектроскопии существенно меняются в процессе хранения крови, причём наибольший вклад в различия между её биоимпедансными показателями на разных сроках хранения вносит характеристическая частота (рис. 19). Используя значение характеристической частоты, полученное при измерении образца крови по предложенной нами методике, можно количественно оценить изменения, происходящие в ней в процессе хранения. Если F_{char} превышает 730 кГц, можно говорить о выходе ряда показателей крови за пределы физиологического диапазона и существенном снижении качества крови.

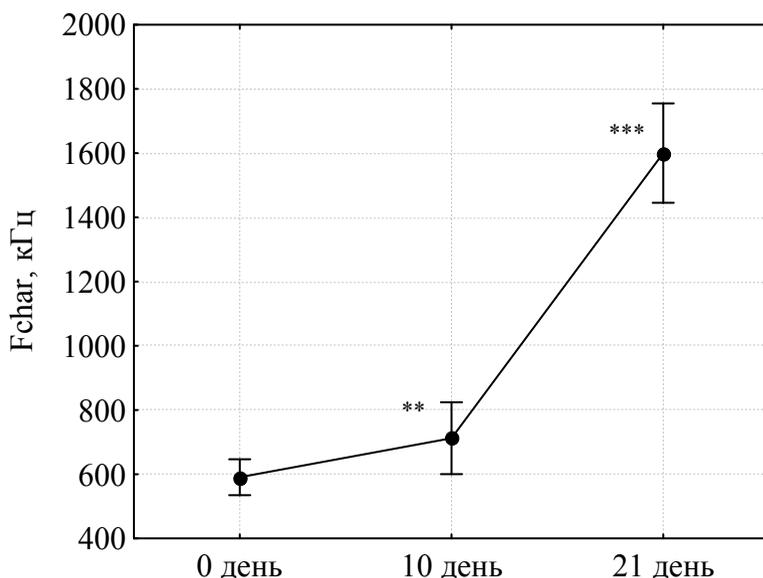


Рисунок 19. Изменение F_{char} в процессе хранения крови

Таким образом, метод биоимпедансной спектроскопии можно использовать для оценки пригодности донорской крови для трансфузии.

Перспектива использования метода БИС для исследования агрегации эритроцитов

Перспективным направлением применения метода биоимпедансной спектроскопии является исследование процесса агрегации красных клеток крови. Известно, что формирование агрегатов из эритроцитов существенно влияет на реологические свойства крови и состояние системы микроциркуляции, поэтому разработка методов исследования процесса агрегации и оценки агрегабельности красных клеток крови является важной задачей.

В работе [9] изучалось влияние процесса агрегации форменных элементов на показатели биоимпедансного анализа крови здоровых людей и больных миеломной болезнью. Проводимость (G , мС) образцов крови регистрировалась на частоте 200 кГц. Сначала измерительная камера с исследуемым образцом непрерывно вибрировала для разрушения уже существующих агрегатов, затем вибрация прекращалась, и камера оставалась неподвижной в течение всего процесса измерения.

Динамика проводимости измеряемых образцов представлена на рисунке 20. Прерывистой линией обозначена проводимость крови здоровых людей, сплошной – больных миеломной болезнью.

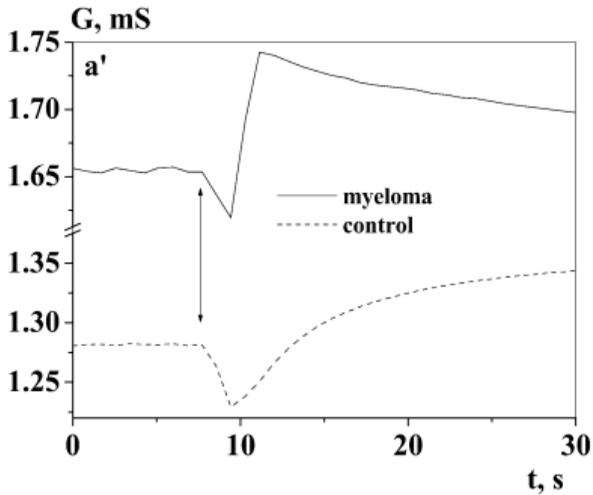


Рисунок. 20. Динамика проводимости образцов крови здоровых людей и больных миеломной болезнью в процессе агрегации эритроцитов. Пояснения в тексте.

Снижение проводимости сразу после прекращения вибрации, по мнению авторов, обусловлено восстановлением формы красных клеток крови. Затем происходит формирование линейных агрегатов, объём проводящей среды при этом увеличивается, что сопровождается ростом G . В образцах крови больных миеломной болезнью в дальнейшем вновь отмечается постепенное падение проводимости, что авторы связывают с формированием разветвлённых агрегатов красных клеток крови. Таким образом, метод БИА является чувствительным к изменениям в крови, происходящим при агрегации эритроцитов.

Результаты этого исследования дают существенные предпосылки для дальнейшей работы в области разработки быстрого и простого метода изучения агрегации красных клеток крови на основе биоимпедансной спектроскопии.

Темы учебных исследовательских самостоятельных работ студентов

1. Сравнение параметров биоимпедансной спектроскопии суспензий нативных и отмытых эритроцитов.

Эксперимент заключается в регистрации параметров БИС суспензий нативных и отмытых эритроцитов со стандартным гематокритом.

Задача: определить влияние удаления мембранных белково-липидных комплексов на параметры биоимпедансной спектроскопии.

2. Сравнение параметров биоимпедансной спектроскопии эритроцитарных суспензий в растворах с разной осмолярностью.

Эксперимент заключается в проведении электрических измерений суспензий эритроцитов в гипотоническом (0,7%), изотоническом (0,9%) и гипертоническом (1,1%) растворе хлорида натрия со стандартным гематокритом

Задача: выявить влияние осмолярности суспендирующего раствора на электрические свойства эритроцитарных суспензий.

3. Сравнение параметров биоимпедансной спектроскопии суспензий молодых и старых красных клеток крови

Эксперимент заключается в определении параметров БИС суспензий молодых и старых эритроцитов со стандартным гематокритом. Разделение красных клеток крови на молодые и старые осуществляется по градиенту плотности центрифугированием.

Задача: оценить влияние возрастных изменений красных клеток крови на параметры биоимпедансной спектроскопии

Библиографический список

1. Mohandas N., Kim Y.R., Tycko D.H., Orlik J., Wyatt J., Groner W. Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering //Blood. – 1986. – V. 68. – P. 506–513.
2. Трофимова, Т.И. Курс физики. – М. : Академия, 2006.— 560 с.
3. Николаев, Д.В., Смирнов, А.В., Бобринская, И.Г., Руднев, С.Г. Биоимпедансный анализ состава тела человека. – М. : Наука, 2009. – 392 с.
4. Schwan H.P. Electrical properties of tissue and cell suspensions // Adv. Biol. Med. Phys. – 1957. – V. 5. – P. 147–209.
5. Grimnes S., Martinsen O.G. Bioimpedance and bioelectricity basics (2nd ed.). –L.: Academic Press. 2008. – 391p.
6. Ulgen Y., Sezdi M. Physiological quality assessment of stored whole blood by means of electrical measurements //Med. Bio. Eng. Comput. - 2007. – V. 45. – P. 653–660.
7. Pauly H., Schwan H.P. Dielectric Properties and Ion Mobility in Erythrocytes //Biophys. J. – 1966. – V. 6. – P. 621–639.
8. Чижевский, А.Л. Биофизические механизмы реакции оседания эритроцитов. – Новосибирск : Наука, 1980. – 178 с.
9. Pribush A., Meyerstein D., Meyerstein N. Conductometric study of shear-dependent processes in red cell suspensions. I. Effect of red blood cell aggregate morphology on blood conductance // Biorheology. – 2004. – V. 41. – P. 13 – 28.

Учебное издание

**Максим Викторович Малахов
Андрей Александрович Мельников
Александр Демьянович Викулов**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
МЕТОДОМ БИОИМПЕДАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Редактор С.А. Викторова
Подписано в печать 22.09.2011
Формат 60х90/16
Объем 2,75 п.л.; 2.2 уч.-изд. л.
Тираж 50 экз.
Заказ № 314

Издательство ФГБОУ ВПО «Ярославский государственный
педагогический университет им. К. Д. Ушинского»
150000, г. Ярославль, ул. Республиканская, д. 108

Типография ЯГПУ
150000, г. Ярославль, ул. Которосльская наб., д. 44