

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

### **Изменение параметров биоимпедансной спектроскопии цельной крови в начальный период оседания эритроцитов**

В работе изучаются изменения параметров биоимпедансной спектроскопии (БИС) цельной крови в начальный период оседания эритроцитов. Установлено, что изменения параметров БИС отражают изменение структуры крови в начальный период оседания эритроцитов. Показатели БИС отражает оседание эритроцитов, а также их взаимодействие друг с другом – агрегацию.

**Ключевые слова:** биоимпедансная спектроскопия, оседание эритроцитов, агрегация эритроцитов, гематокрит, белки плазмы, фибриноген, глобулины.

**M.V.Malakhov, A.A.Melnikov, A.D.Vikulov**

### **Changes of Whole Blood Bioimpedance Spectroscopy Parameters During the Beginning of Erythrocyte Sedimentation**

Changes of whole blood bioimpedance spectroscopy (BIS) parameters during the beginning of erythrocyte sedimentation were studied. We found that the alterations of BIS parameters reflected the blood structure changes. The BIS indices depend on erythrocyte sedimentation and aggregation processes.

**Key words:** bioimpedance spectroscopy, erythrocyte sedimentation, erythrocyte aggregation, hematocrit, plasma proteins, fibrinogen, globulins.

**Введение.** Метод биоимпедансной спектроскопии широко используется в биологии и медицине для оценки состава тела и определения объёма внеклеточной и внутриклеточной жидкости [1]. Суть этого метода заключается в измерении суммарного сопротивления (импеданса) биологических объектов на разных частотах переменного тока. С помощью метода БИС можно рассчитать следующие параметры: сопротивление внеклеточной  $R_e$  и внутриклеточной  $R_i$  жидкости, характеристическую частоту  $F_{char}$ , показатель  $\alpha$  и ёмкость клеточных мембран  $C_m$  [1, 2].  $R_e$  и  $R_i$  позволяют оценить объёмы соответственно внеклеточной и внутриклеточной жидкости в измеряемом биологическом объекте [3], характеристическая частота и ёмкость мембран зависит от суммарной площади клеточных мембран и их целостности. Физиологический смысл параметра  $\alpha$  до конца не ясен. Предполагают, что параметр  $\alpha$  связан с неоднородностью клеточных элементов измеряемого биообъекта, с их размерами [4, 5].

Таким образом, параметры биоимпедансной спектроскопии отражают структуру измеряемого биологического объекта. Можно предположить,

что при её изменении будут меняться параметры БИС.

Данные, полученные в ряде исследований, подтверждают это предположение. В работе [6] установлено, что вследствие экспериментальной ишемии миокарда (окклюзия коронарных артерий более 20 мин.) происходили необратимые изменения в кардиомиоцитах (набухание клеток и их органелл, дезорганизация миофибрилл и т. д.), что сопровождалось ростом значений  $R_e$  и  $R_i$ . В исследовании [7] производилось воздействие на ткань печени ультразвуком высокой интенсивности, при этом наблюдалось набухание клеток, разрушение органелл, клеточные мембраны становились более хрупкими и проницаемыми. Такие изменения ткани приводили к росту  $R_e$  и  $C_m$ , а также к снижению  $R_i$ .

Представляет интерес изучение динамики параметров БИС непосредственно в процессе изменения структуры биообъекта. В качестве ткани, структура которой быстро меняется, может быть использована кровь. В неподвижной крови с первых секунд происходит процесс агрегации эритроцитов. Формируются агрегаты в виде монетных столбиков, которые затем оседают под действием силы тяжести [8]. Можно предполо-

жить, что эти процессы в крови повлияют на значения параметров БИС.

Работ, посвящённых изучению параметров БИС крови, достаточно много. В исследованиях Zhao установлены связи Re, Ri и Cm с гематокритом, СОЭ, содержанием белков [9, 10, 11]. Есть работы, где изучается изменение параметров биоимпедансной спектроскопии крови в процессе её хранения [12, 13].

Целью нашей работы было изучить динамику параметров БИС цельной крови в начальный период оседания эритроцитов. Поскольку как гематокрит, так и белки плазмы влияют на процесс агрегации эритроцитов и их оседание [14, 15, 16, 17, 18], нами была изучена связь изменений параметров БИС с этими показателями крови.

**Материалы и методы исследования.** *Материалы исследования.* Для исследований были взяты образцы венозной крови 18 добровольцев.

*Метод биоимпедансной спектроскопии крови.* Исследования выполнялись при комнатной температуре ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) на биоимпедансном анализаторе «ABC-01 Медасс» в диапазоне частот 5 – 500 кГц. Образцы крови объёмом 1 мл помещали в измерительную камеру, которая представляет собой неподвижно фиксированную в вертикальном положении пластиковую трубку диаметром 8 мм с закреплёнными в ней токовыми и потенциальными (измерительными) электродами из позолоченной медной проволоки. Измерительные электроды горизонтально располагаются в середине камеры. Расстояние между потенциальными электродами составляет 2,5 мм, между потенциальными и токовыми – 3 мм. Общее расстояние между токовыми электродами равно 9 мм. Такое расположение измерительных электродов позволяет регистрировать изменения структуры образца крови, которые происходят в межэлектродном пространстве вследствие агрегации и оседания эритроцитов во время измерения.

С использованием программного обеспечения «ABC01-024 Медасс» определялись параметры биоимпедансной спектроскопии: сопротивление внеклеточной (Re) и внутриклеточной (Ri) жидкости, характеристическая частота (Fchar), параметр Alpha, ёмкость клеточных мембран (Cm) на нулевой, первой, второй, третьей, четвёртой, пятой и шестой минутах измерения.

Нами были рассчитаны изменения показателей БИС в процентах на всех минутах ( $\Delta\text{Re}_1 - \Delta\text{Re}_6$ , %,  $\Delta\text{Ri}_1 - \Delta\text{Ri}_6$ , %,  $\Delta\text{Fchar}_1 - \Delta\text{Fchar}_6$ , %,  $\Delta\text{Alpha}_1 - \Delta\text{Alpha}_6$ , % и  $\Delta\text{Cm}_1 - \Delta\text{Cm}_6$ , %) относительно начала измерения (0 минута).

относительно начала измерения (0 минута).

*Анализ биохимических показателей.* Содержание альбуминов (Alb), глобулинов (Glob), общее содержание белка (Prot), концентрацию ионов натрия (Na) и калия (K) определяли на биохимическом автоматическом анализаторе Saphire 400 (Япония) с использованием реактивов «Diasys» (Германия). Содержание фибриногена (Fib) определялось по методу А. Клауса [19]. Величина гематокрита (Ht) была определена на гематологическом анализаторе МЕК-8222J/K (Япония). Скорость оседания эритроцитов (ESR) измерялась по методу Панченкова.

**Статистика.** Для подтверждения достоверности различий использовался парный критерий t-Стьюдента. Для выявления связей значений параметров биоимпедансной спектроскопии на всех минутах измерения, а также изменений этих параметров с содержанием общего белка, альбуминов, глобулинов, фибриногена, с концентрацией ионов калия и натрия, а также со значением гематокрита и скоростью оседания эритроцитов был использован метод простой корреляции Пирсона (r). Для выявления независимых корреляций использована стандартная множественная регрессия.

**Результаты.** В течение всего процесса измерения величина Re возрастала (рис. 1), что соответствует динамике оседания эритроцитов.

Результаты исследования показали, что  $\Delta\text{Re}_1 - \Delta\text{Re}_6$  были связаны с гематокритом ( $r=0.50 - 0.53$ ,  $p<0.05$ ), содержанием общего белка ( $r=0.57 - 0.65$ ,  $p<0.05 - 0.01$ ), фибриногена ( $r=0.60 - 0.70$ ,  $p<0.01$ ) и глобулинов ( $r=0.50 - 0.60$ ,  $p<0.05 - 0.01$ ). Таким образом, скорость изменения Re положительно связана с гематокритом и содержанием крупномолекулярных белков (глобулинов, фибриногена).

Установлено, что значение Ri в течение измерения существенно не менялось (рис. 2), что выглядит неожиданным. Оседание эритроцитов должно приводит к снижению Ri, так как объём внутриклеточной жидкости растёт.

Величина Fchar снижалась в течение всего процесса измерения (рис. 3), что может отражать динамику оседания форменных элементов. Корреляционный анализ показал, что  $\Delta\text{Fchar}_1 - \Delta\text{Fchar}_6$  были отрицательно связаны с гематокритом ( $r=-0.50$ ,  $p<0.05$ ), т. е. чем больше гематокрит, тем медленнее менялась Fchar.

Отмечалось значительное снижение Alpha на первой минуте, а затем значение Alpha остава-

лось примерно на одном уровне (рис. 4). Установлено, что  $\Delta\text{Alpha}_2 - \Delta\text{Alpha}_6$  были положительно связаны с  $\text{Ht}$  ( $r=0.63 - 0.75$ ,  $p<0.01$ ), т. е. высокое значение гематокрита ускоряет изменение  $\text{Alpha}$ .

Величина  $\text{St}$  увеличилась в течение первой минуты, а затем существенно не менялась (рис. 5). Установлены корреляции  $\Delta\text{St}_1 - \Delta\text{St}_4$  с содержанием глобулинов ( $r=0.53 - 0.61$ ,  $p<0.05 - 0.01$ ),  $\Delta\text{St}_1 - \Delta\text{St}_6$  – с содержанием общего белка ( $r=0.51 - 0.58$ ,  $p<0.05$ ) и с гематокритом ( $r=0.51 - 0.66$ ,  $p<0.05 - 0.01$ ). Таким образом, скорость изменения  $\text{St}$  зависит от значения гематокрита и содержания крупномолекулярных белков в плазме.

### Обсуждение

Главными результатами нашего исследования были:

- 1) Изменения  $\text{Re}$  и  $\text{Fchar}$  зависят от процесса оседания эритроцитов в течение первых минут;
- 2) процесс оседания форменных элементов не влияет на значение  $\text{Ri}$ ;
- 3)  $\Delta\text{Alpha}$  и  $\Delta\text{St}$  отражают изменение структуры крови в первую минуту измерения.

*Изменения  $\text{Re}$  и  $\text{Fchar}$  в начальный период оседания крови.* Известно, что значение  $\text{Re}$  зависит от объёма внеклеточной жидкости [3]. Вследствие оседания эритроцитов происходит вытеснение межклеточной жидкости (в данном случае плазмы) из пространства между измерительными электродами, что и приводит к уменьшению её объёма и росту  $\text{Re}$ . Следует отметить, что значение  $\text{Re}$  непрерывно увеличивается в течение всего измерения, что соответствует динамике оседания форменных элементов.

Кроме того, отмечаются положительные корреляции  $\Delta\text{Re}$  с содержанием общего белка, глобулинов и фибриногена. Известно, что белки плазмы, особенно крупномолекулярные (глобулины и фибриноген), способствуют процессу оседания эритроцитов [14, 15]. Таким образом,  $\Delta\text{Re}$  может отражать процесс оседания эритроцитов в течение первых минут. Следует отметить, что в работах других авторов [9, 10] выявлены связи  $\text{Re}$  с  $\text{ESR}$ .

В связи с этим неясно происхождение полученной нами положительной корреляции  $\Delta\text{Re}$  с  $\text{Ht}$ , поскольку известно, что гематокрит уменьшает скорость оседания эритроцитов, а между  $\text{Ht}$  и  $\text{ESR}$  выявляют отрицательные связи [14, 15]. Проведение множественного регрессионного анализа показало, что  $\Delta\text{Re}$  оставалась связанной

с концентрацией белков, а связь  $\Delta\text{Re}$  с гематокритом становилась недостоверной. Следовательно, скорость изменения  $\text{Re}$  в большей степени зависит от содержания белков плазмы, чем от гематокрита.

Результаты исследования показали, что  $\text{Fchar}$  непрерывно уменьшалась в течение всего измерения, что также соответствует динамике оседания эритроцитов. Кроме того, установлено, что  $\Delta\text{Fchar}$  была отрицательно связана с  $\text{Ht}$ . Можно предположить, что высокое значение гематокрита замедляет оседание эритроцитов и уменьшает скорость изменения  $\text{Fchar}$ .

Таким образом, на основании динамики изменения  $\text{Fchar}$  и  $\text{Re}$ , положительных корреляций  $\Delta\text{Re}$  с гематокритом и с содержанием белков, отрицательной связи  $\Delta\text{Fchar}$  с гематокритом можно предположить, что  $\Delta\text{Fchar}$  и  $\Delta\text{Re}$  – оба отражают процесс оседания эритроцитов в течение первых нескольких минут. Вместе с тем, отсутствие корреляций  $\Delta\text{Re}$  и  $\Delta\text{Fchar}$  с  $\text{ESR}$  в нашем исследовании выглядит парадоксальным. Возможно, это объясняется тем, что скорость оседания эритроцитов определялась в течение часа, а электрические измерения проводились в течение нескольких минут. Действительно, в работе [15] указывается, что оседание эритроцитов протекает с разной скоростью в разные периоды измерения.

*Процесс оседания форменных элементов не влияет на значение  $\text{Ri}$ .* Поскольку  $\text{Ri}$  зависит от объёма внутриклеточной жидкости [3], можно ожидать, что в процессе оседания эритроцитов величина  $\text{Ri}$  будет уменьшаться, так как количество форменных элементов в межэлектродном пространстве будет расти. Однако, по данным нашего исследования, значение  $\text{Ri}$  в течение измерения не менялось. Очевидно, на значение  $\text{Ri}$  оказывают влияние и другие факторы. Можно предположить, что вследствие адсорбции белков на мембранах эритроцитов меняется электрическая ёмкость измеряемого образца крови [11], что приводит к росту  $\text{Ri}$ . По-видимому, вследствие разнонаправленного воздействия на величину  $\text{Ri}$  двух процессов она остаётся неизменной в течение всего измерения.

*Изменение  $\text{Alpha}$  и  $\text{St}$  в начальный период оседания крови.* Значение  $\text{Alpha}$  уменьшалось в течение первой минуты, а затем существенно не менялось. Как уже упоминалось, параметр  $\text{Alpha}$  отражает степень неоднородности структуры измеряемого биообъекта: чем меньше величина  $\text{Alpha}$ , тем большей неоднородностью структуры

обладает измеряемый объект [4, 5]. Нами установлена положительная связь  $\Delta\text{Alpha}$  с величиной гематокрита. Известно, что высокое значение гематокрита способствует процессу агрегации, поскольку форменные элементы расположены ближе друг к другу и легче взаимодействуют [18]. Агрегация эритроцитов в неподвижной крови наиболее интенсивно протекает в течение первых двух минут, при этом однородность крови нарушается: образуются разной формы и размеров агрегаты в форме монетных столбиков [8]. Таким образом,  $\Delta\text{Alpha}$  отражает изменение структуры крови в начальный период оседания эритроцитов. Учитывая динамику изменения  $\text{Alpha}$  в процессе измерения, а также положительную связь  $\Delta\text{Alpha}$  с  $\text{Ht}$ , можно предположить, что снижение параметра  $\text{Alpha}$  связано с формированием агрегатов из эритроцитов.

В нашей работе установлены корреляции  $\Delta\text{Ct}$  с концентрацией белков и с гематокритом. Необходимо подчеркнуть, что в используемом частотном диапазоне белки плазмы не влияют на параметры БИС непосредственно [20]. Очевидно, все корреляции параметров БИС с содержанием белков являются опосредованными через изменение электрических свойств клеточной мембраны вследствие адсорбции на ней белков [11], а также через межклеточные взаимодействия – агрегацию эритроцитов [10].

Известно, что агрегация эритроцитов, в зависимости от содержания крупномолекулярных белков (глобулин, фибриноген) [16, 17], а также от гематокрита [18]. В работах других исследо-

вателей [9, 10, 11] выявлены корреляции  $\text{Ct}$  крови с гематокритом, содержанием белков, скоростью оседания эритроцитов. Полученные связи авторы объясняют тем, что белки, адсорбируясь на мембрану эритроцитов, влияют как на её электрическую ёмкость, так и на ESR.

Таким образом, изменение  $\text{Ct}$  отражает изменение структуры крови в начальный период оседания эритроцитов. Учитывая полученные связи  $\Delta\text{Ct}$  с показателями крови, а также динамику изменения  $\text{Ct}$  в процессе измерения ( $\text{Ct}$  увеличивалась в течение первой минуты, а затем существенно не менялась), можно предположить, что величина  $\Delta\text{Ct}$  связана с процессом агрегации эритроцитов и адсорбцией белков на поверхность мембран эритроцитов.

**Выводы.** Изменения параметров БИС отражают изменения структуры крови в начальный период оседания эритроцитов. Изменения  $\text{Re}$  и  $\text{Fchar}$  связаны с процессом оседания форменных элементов в течение первых нескольких минут.  $\Delta\text{Alpha}$  и  $\Delta\text{Ct}$  отражают изменения структуры крови в течение первой минуты измерения. Оба показателя, по-видимому, зависят от процесса агрегации эритроцитов, а  $\Delta\text{Ct}$ , вероятно, и от адсорбции белков на поверхности их мембран. Использование агрегометров позволит оценить возможность БИС для оценки процесса агрегации. Более того, дальнейшие исследования в этом направлении позволят глубже понять биофизические основы метода и выявить новые возможности для его использования.

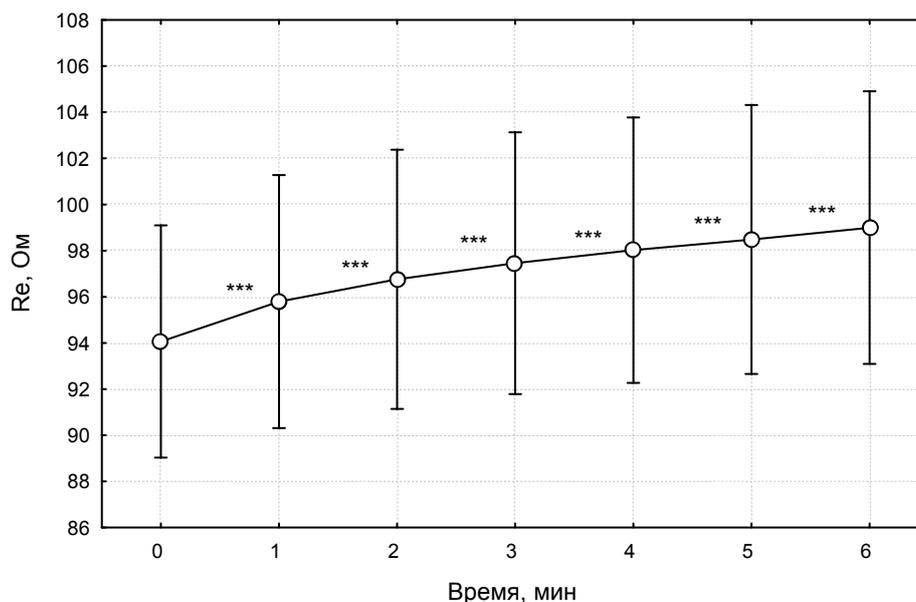


Рис. 1. Изменение величины  $\text{Re}$  в процессе измерения. (\*\*\*) –  $p < 0.001$  по сравнению с 0 минутой)

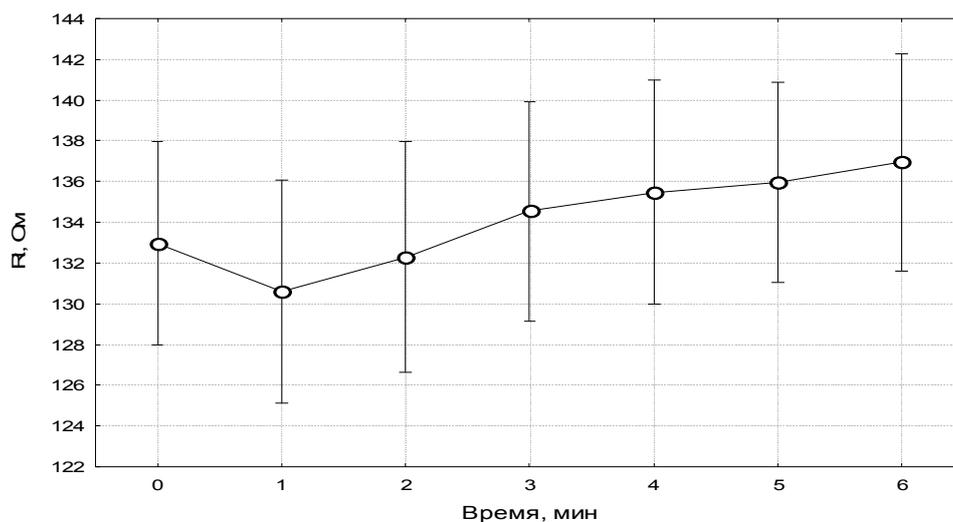


Рис. 2. Изменение Ri в процессе измерения

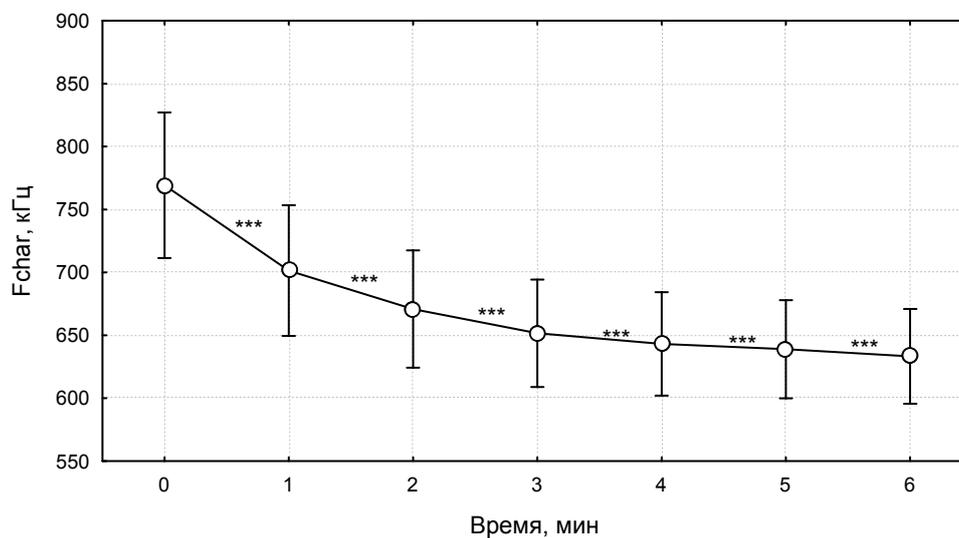


Рис. 3. Изменение Fchar в процессе измерения. (\*\*\*) –  $p < 0.001$  по сравнению с 0 минутой)

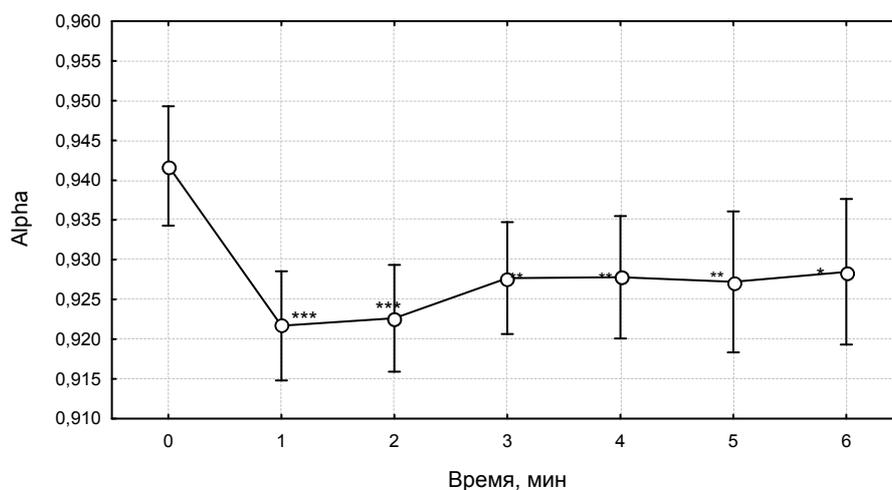


Рис. 4. Изменение параметра Alpha в процессе измерения (\*, \*\*, \*\*\* –  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  по сравнению с 0 минутой)

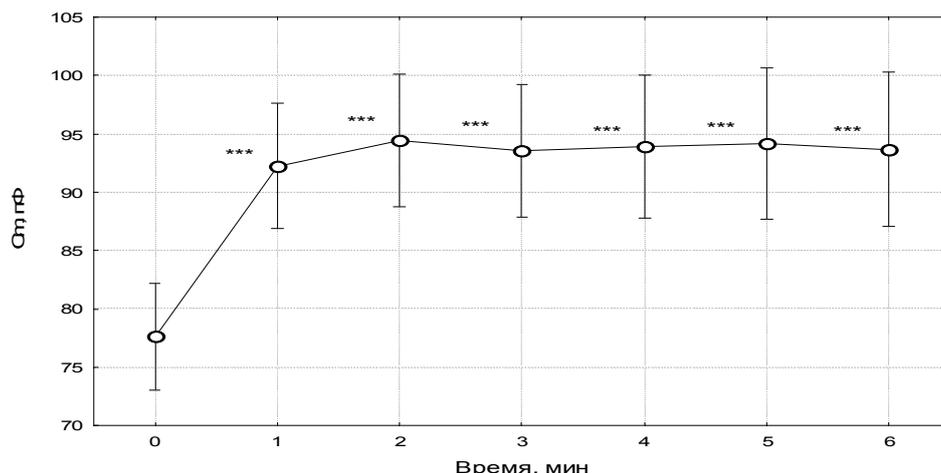


Рис. 5. Изменение величины Ст в процессе измерения (\*\*\*) –  $p < 0.001$  по сравнению с 0 минутой

### Библиографический список

1. Николаев, Д. В. Биоимпедансный анализ состава тела человека [Текст] / Д. В. Николаев, А. В. Смирнов, И. Г. Бобринская, С. Г. Руднев. – М.: Наука, 2009. – 392 с.
2. Смирнов, А. В. Методы и аппаратура электроимпедансной спектроскопии [Текст] / А. В. Смирнов, А. А. Цветков, С. А. Туйкин. // Диагностика и лечение нарушений регуляции сердечно-сосудистой системы: материалы. 8-й научно-практической конф. – М.: 2006. – P. 26-30.
3. Cornisht B. H. Improved prediction of extracellular and total body water using impedance loci generated by multiple frequency bioelectrical impedance analysis [Текст] / B. H. Cornisht, B. J. Tomst, L. C. Ward // Phys. Med. Biol. – 1993. – V. 38. – P. 337-346.
4. Martinsen, Ø. G. Interface Phenomena and Dielectric Properties of Biological Tissue [Текст] / Ø. G. Martinsen, S. Grimnes, H. P. Schwan // Encyclopedia of Surface and Colloid Science. - Marcel Dekker Inc. – 2002. – P. 2643-2652.
5. Ivorra A. Bio-Impedance dispersion width as a parameter to monitor living cells [Текст] / A. Ivorra, M. Genesca, G. Hotter, J. Aguilo // Proceedings of the XII International Conference on electrical Impedance & V electrical Impedance Tomography. - 2004. - Gdansk, Poland. - Vol. 1. - P. 87-91.
6. Wtorek J. Change of myocardial impedance during experimental ischemia [Текст] / J. Wtorek, J. Siebert, A. Nowakowski // Proceedings of the XII International Conference on electrical Impedance & V electrical Impedance Tomography. - 2004. - Gdansk, Poland. - Vol. 1. - P. 115-119.
7. Jossinet J. Impedance changes in liver tissue exposed to high-energy ultrasound [Текст] / J. Jossinet, C. Trillaud, Chesnais S. // Proceedings of the XII International Conference on electrical Impedance & V electrical Impedance Tomography. - 2004. - Gdansk, Poland. - Vol. 1. - P. 83-87.
8. Каро, К. Механика кровообращения [Текст] / К. Каро, Т. Педли, Р. Шротер, У. Сид. – М.: Мир, – 1981, – 621.
9. Zhao T. X. Electrical impedance and erythrocyte sedimentation rate (ESR) of blood. [Текст] / T. X. Zhao, D. Lockner // Biochim. Biophys. Acta. – 1993. –V. 1153. – P. 243-248.
10. Zhao T. X. Quantitative correlations among fibrinogen concentration, sedimentation rate and electrical impedance of blood. [Текст] / T. X. Zhao, B. Jacobson // Med Biol. Eng. Comput. - 1997. – V. 35. – P. 181-185.
11. Zhao T. X. Contributions of suspending medium to electrical impedance of blood. [Текст] / Zhao T. X. // Biochim. Biophys. Acta. – 1994. – V. 1201. – P. 179-185.
12. Ulgen Y. Physiological quality assessment of stored whole blood by means of electrical measurements [Текст] / Y. Ulgen, M. Sezdi // Med. Bio. Eng. Comput. – 2007. – V. 45. – P. 653-660.
13. Zhao T. X. Electrical impedance alterations of red blood cells during storage [Текст] / T. X. Zhao, A. Shanwell // Vox. Sang. – 1994. – V. 66. – P. 258-263.
14. Чижевский, А. Л. Биофизические механизмы реакции оседания эритроцитов [Текст] / А. Л. Чижевский – Новосибирск: Наука, 1980. - 178с.
15. Woodland N.B. Erythrocyte sedimentation in columns and the significance of ESR [Текст] / N. B. Woodland, K. Cordatos, W. T. Hung, A. Reuben, L. Holley // Biorheology. - 1996. – V. 33. - №6. – P. 477-488.
16. Мельников, А. А. Реологические свойства крови у спортсменов [Текст] / А. А. Мельников, А. Д. Викулов – Ярославль: – Изд-во ЯГПУ, 2008. – 491 с.
17. Ben-Ami R. A synergistic effect of albumin and fibrinogen on immunoglobulin-induced red blood cell aggregation [Текст] / R. Ben-Ami, G. Barshtein, T. Mardi, V. Deutch, O. Elkayam, S. Yedgar, S. Berliner // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. - 2003. – V. 285. – P. 2663-2669.
18. Mutrynowska J. Optical analysis of red blood cell sediment formation [Текст] / J. Mutrynowska // Biorheology. – 2007. – V. 44. – № 4. - P. 285-297.
19. Clauss A. Measure of fibrinogen [Текст] / A. Clauss // Acta. Haematol. -1957. - V. 17. - P. 237-238.
20. Lisin R. Time domain dielectric spectroscopy study of human cells. I. Erythrocytes and ghosts [Текст] / R. Lysin B. Z. Ginzburg, M. Schlesinger, Y. Feldman // Biochim. Biophys. Acta. - 1996. - V. 1280. - №1 - P. 34-40.