УДК 577.3

СВЯЗЬ ПАРАМЕТРОВ БИОИМПЕДАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ СУСПЕНЗИЙ КРАСНЫХ КЛЕТОК КРОВИ СО СРЕДНИМ ОБЪЕМОМ ЭРИТРОЦИТОВ

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

Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского

Поступила в редакцию 27.07.2010 г.

Аннотация. Исследована взаимосвязь показателей биоимпедансной спектроскопии (БИС) со среднеклеточным объемом эритроцитов (MCV). Проводилось измерение показателей БИС отмытых концентрированных эритроцитарных суспензий в гипо-, гипер- и изоосмотических растворах на приборе АВС-01 «Медасс». В гипотонических растворах отмечалось увеличение MCV и снижение концентрации эритроцитов, а в гипертонических — наоборот. Установлено, что все параметры БИС менялись в растворах с разной осмолярностью, однако по данным множественной регрессии только параметр Alpha оставался независимо связан с MCV. Таким образом, БИС может быть использована для оценки MCV, но для повышения точности метода необходимо исследовать отдельные эритроциты.

Ключевые слова. Среднеклеточный объем эритроцитов, биоимпедансная спектроскопия.

Abstract. We studied correlations between bioimpedance spectroscopy (BIS) parameters and mean cell volume of erythrocytes (MCV). The BIS parameters of washed concentrated erythrocyte suspensions in the hypo-, hyper- and isoosmotic solutions were measured by the BIA analyzer ABC-01 “Medass”. In the hypotonic solutions MCV increased and red blood cells concentration decreased, and in the hypertonic solutions — vice versa. We found that all BIS parameters changed in solutions with different osmolarity, but multiply regression show that only Alpha parameter was correlated with MCV independently. The BIS method can be used for estimation of MCV, but studying of single erythrocytes is necessary for more precise measurement.

Keywords: Mean cell volume, bioimpedance spectroscopy.

ВВЕДЕНИЕ

Оценка среднеклеточного объема эритроцита (MCV) имеет большое значение в биологии и медицине [1, 2]. В лабораторной диагностике этот показатель определяют либо расчетным путем, вычисляя отношение гематокрита к концентрации эритроцитов [3], либо измеряют непосредственно с помощью кондуктометрического метода или метода лазерного светорассеивания в поточных цитометрах [4]. В основе проточной цитометрии лежит исследование отдельных эритроцитов, проходящих через отверстие или канал в микрокамере. Определение MCV кондуктометрическим методом заключается в измерении электрического сопротивления между электродами, расположенными по обе стороны отверстия, через которое проходит эритроцит [5]. Принцип исследования MCV методом лазерного светорассеяния заключается в оценке степени рассеивания лазерного луча, проходящего через эритроцит [4]. В качестве альтернативного метода определения среднеклеточного объема эритроцитов может быть использована биоимпедансная спектроскопия (БИС). Суть этого метода заключается в измерении суммарного электрического сопротивления биологических объектов на разных частотах переменного тока. Ранее [6] нами установлено, что параметры БИС тесно коррелировали с показателями, отражающими свойства всего измеряемого образца крови (гематокритом — Ht, содержанием гемоглобина — Hb, концентрацией эритроцитов — RBC), и значительно слабее — с показателями, отражающими свойства отдельных форменных элементов (средним объемом эритроцитов — MCV, средним содержанием гемоглобина в эритроцитах — MCH, средней концентрацией гемоглобина в эритроцитах — MCHC). В данной работе изучалась возможность использования БИС для определения MCV. Целью нашего исследования было установить связь параметров биоимпедансной спектроскопии со среднеклеточным объемом эритроцитов.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для выявления зависимости параметров БИС от MCV мы измеряли концентрированные суспензии эритроцитов со стандартным гематокритом. Изменение объема клеток достигалось инкубацией

© Малахов М. В., Мельников А. А., Викулов А. Д., 2012

в гипотонических, изотонических и гипертонических растворах.

Приготовление суспензий эритроцитов. Образцы венозной крови (n = 8) объемом 9 мл делили на три порции по 3 мл. Первую порцию смешивали с 6 мл гипотонического 0,7 % раствора NaCl (осмолярность 240 мосмоль/л), вторую — с 6 мл изотонического 0,85 % раствора NaCl (осмолярность 290 мосмоль/л), третью — с 6 мл гипертонического 1,1 % раствора хлорида натрия (осмолярность 375 мосмоль/л). Затем эритроциты отмывались в указанных растворах трехкратным центрифугированием на 3000 об/мин по 10 минут. Отмывание эритроцитов от веществ, содержащихся в плазме, необходимо для исключения искажения результатов измерения, поскольку параметры БИС зависят от концентрации плазменных белков [7]. Время инкубации составило 1 час. После инкубации надосадочную жидкость полностью удаляли, доводили гематокрит до 92—93 % и далее проводили измерения полученных образцов отмытых концентрированных суспензий эритроцитов.

Определение среднего объема, гематокрита и концентрации эритроцитов в суспензиях. Гематокрит (Ht) суспензии определяли центрифугированием в гематокритном капилляре на центрифуге ОПн-8 со скоростью 5000 об/мин в течение 15 мин. Концентрация эритроцитов (RBC) в суспензии устанавливалась фотоколориметрическим методом на КФК-2М [8]. Среднеклеточный объем эритроцитов (MCV) вычислялся по формуле: MCV = Ht/RBC, где Ht — гематокрит, а RBC — концентрация эритроцитов.

Биоимпедансная спектроскопия. Электрические измерения суспензий эритроцитов выполнялись при комнатной температуре (21±1°C) на биоимпедансном анализаторе «АВС-01 Медасс» в диапазоне частот 5—500 кГц. Исследуемые образцы объемом 1 мл помещали в измерительную камеру, которая представляет собой пластиковую трубку с двумя парами потенциальных и токовых электродов. Методика измерения подробно описана в нашей предыдущей работе [6]. С использованием программного обеспечения «АВС01-024 Медасс» определялись параметры биоимпедансной спектроскопии: сопротивление внеклеточной (Re) и внутриклеточной (Ri) жидкости, характеристическую частоту (Fchar), параметр Alpha и емкость клеточных мембран (Cm). Re и Ri позволяют оценить объемы соответственно внеклеточной и внутриклеточной жидкости в измеряемом биологическом объекте [9]. Физиологическое значение характеристической частоты изучено недостаточно. Емкость мембран зависит от суммарной площади и целостности клеточных мембран [10]. Параметр Alpha связан с неоднородностью и размером клеточных элементов измеряемого биообъекта [11].

Статистика. Для выявления достоверности различий между параметрами БИС суспензий с разной осмолярностью использовался парный t-критерий Стьюдента. Для определения связей параметров биоимпедансной спектроскопии с гематологическими показателями использовалась простая корреляция Пирсона (r). Для выявления независимых корреляций (множественный регрессионный β-коэффициент) между MCV и показателями БИС использована стандартная множественная регрессия. Множественная регрессия позволяет выявить, какие именно параметры БИС связаны с MCV независимо.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

MCV, Ht и RBC в растворах с разной осмолярностью. Значения гематокрита, концентрации и среднеклеточного объема эритроцитов представлены табл. 1. При равном гематокрите в растворах с низкой осмолярностью объем эритроцитов увеличивается, их форма приближается к сферической, что связано с поступлением воды внутрь клеток. Количество форменных элементов в измеряемом образце при этом снижается. Наоборот, в гиперосмотических растворах растет концентрация форменных элементов, эритроциты сморщиваются, уменьшаются в объеме, что объясняется выходом из них воды [12, 13].

Параметры БИС в растворах с разной осмолярностью. На электрические свойства измеряемых суспензий основное влияние, по-видимому, оказывают три фактора: объем эритроцитов, их

Таблица 1

Значения гематокрита, концентрации и среднеклеточного объема эритроцитов в растворах с разной осмолярностью

осмолярность, мосмоль/л	240	290	375
Ht, %	92,4±2,5	93,6±2,5	91,9±2,0
MCV, фл	106,3±7,6***	94,7±7,1	85,8±6***
RBC, 10^{12}/л	13,1±0,8***	14,9±1	16,1±1,2***

Примечание: *** — $p < 0.001$ по сравнению с изотоническим раствором.

количество в измеряемом образце крови, а также концентрация ионов в суспендирующем растворе [6, 11].

Re, Ri и MCV. Нами установлено, что с уменьшением осмолярности суспензии эритроцитов отмечается рост Re, а в растворах с высокой осмолярностью Re снижается. Ri, напротив, растет в гиперосмотических растворах и снижается в гипоосмотических (табл. 2). Известно, что величина Re отражает объем внеклеточной, а Ri — внутриклеточной жидкости [9]. Так как гематокрит эритроцитарных суспензий был стандартным, общий объем внеклеточной и внутриклеточной жидкости в измеряемых образцах не менялся. По-видимому, изменение Re и Ri связано с разницей концентраций ионов в суспендирующих растворах. Повышение содержания NaCl в растворе приводит к увеличению электропроводности и снижению Re, снижение концентрации ионов — наоборот. Однако известно, что при изменении осмолярности суспендирующего раствора концентрация осмотически активных частиц в цитоплазме эритроцита и во внеклеточной среде быстро выравниваются [14]. Таким образом, можно было бы ожидать, что Ri изменится так же, как Re, что не подтверждается нашими данными. Следует отметить, что выход жидкости из клеток в гипертоническом суспендирующем растворе вызывает увеличение концентрации гемоглобина, что приводит к уменьшению подвижности ионов в цитоплазме [15], снижению ее электропроводности и росту Ri. При снижении осмолярности раствора — наоборот. Следовательно, в данных условиях измерения Ri связано с изменением концентрации гемоглобина в эритроцитах и не отражает MCV и RBC.

Fchar и MCV. По данным литературы значение Fchar обратно пропорционально емкости и сопротивлению измеряемого объекта [11]. В биологических объектах электрическая емкость определяется количеством клеточных мембран, то есть, фактически числом клеточных элементов [16]. Поскольку с повышением осмолярности суспендирующего раствора концентрация эритроцитов в измеряемом образце растет, можно было бы ожидать уменьшение Fchar. В гипоосмотических растворах RBC, напротив, снижается, следовательно, Fchar должна увеличиваться. Однако нами установлено, что Fchar возрастала с увеличением осмолярности суспендирующего раствора и уменьшалась в гипотонических суспендирующих растворах (табл. 2). По-видимому, в данном случае на значение Fchar влияет сопротивление, которое в свою очередь зависит от концентрации ионов. Следовательно, можно предположить, что, как и в случае с Re, значение Fchar определяется концентрацией NaCl в суспендирующем растворе. В гипоосмотических растворах сопротивление увеличивается, вследствие чего Fchar снижается. В гиперосмотических растворах снижение сопротивления приводит к росту Fchar. Такое предположение подтверждается тесной отрицательной связью Re с Fchar, полученной как в нашем исследовании ($r = -0.94$, $p < 0.001$), так и в работе [17]. Таким образом, изменение Fchar, очевидно, не отражает вариации MCV и RBC, а в наибольшей степени зависит от концентрации ионов в суспендирующем растворе.

Cm и MCV. Результаты нашего исследования показали, что Cm увеличивалась в суспензиях с высокой осмолярностью и снижалась с уменьшением осмолярности суспендирующего раствора (табл. 2). С увеличением количества эритроцитов в гиперосмотическом растворе связан рост числа клеточных мембран, что, по-видимому, и приводит к увеличению Cm. В растворах с низкой осмолярностью — наоборот. В работе [10] отмечается связь Cm с гематокритом, что авторы также объясняют

Таблица 2

Значения параметров БИС эритроцитарных суспензий в растворах с разной осмолярностью

осмолярность, мосмоль/л	240	290	375
Re, Ом	660,0±102,5**	562,9±72,6	450,7±28,9**
Ri, Ом	64,3±4,6*	68,7±1,5	73,0±6,1*
Fchar, кГц	219,5±31,1*	245±31,3	291,4±19,3**
Alpha	0,318±0,002*	0,316±0,002	0,314±0,002*
Cm, пФ	47,4±5,6**	53,4±4,6	59,7±3,4**

Примечание: *,** — $p < 0.05$, <0.01 соответственно по сравнению с изотоническим раствором.

увеличением числа клеточных мембран в измеряемом образце крови. Таким образом, показатель Cm зависит от концентрации эритроцитов и, поскольку в данных условиях площадь поверхности мембран отдельных клеток оставалась неизменной, не связан со среднеклеточным объемом.

Параметр Alpha и MCV. Нами установлено, что Alpha уменьшалась в суспензиях эритроцитов с высокой осмолярностью и возрастала в гипоосмотических суспензиях (табл. 2), а также выявлена положительная связь Alpha с MCV ($r = 0.65$, $p = 0.001$, рис. 1), и отрицательная — с RBC ($r = –0.56$, $p = 0.005$). Результаты множественного регрессионного анализа показали, что связь Alpha с MCV остается достоверной, а с RBC — становится недостоверной. Кроме того, по данным множественной регрессии из всех параметров БИС именно Alpha оставалась связана с MCV ($\beta = 0.77$, $p = 0.01$), а связь остальных параметров БИС со среднеклеточным объемом эритроцитов становилась недостоверной ($p = 0.56$, $p = 0.07$, $p = 0.4$, $p = 0.85$ для Re, Ri, Fchar и Cm — соответственно). В работе [11] указывается на связь Alpha с размером клеток. Известно, что параметр Alpha также связан с неоднородностью клеточных элементов по форме и размерам [16, 18]. В нашем исследовании изменение однородности эритроцитов в измеряемых суспензиях было вызвано увеличением и снижением осмолярности суспендирующих растворов. В гипотоническом растворе форма эритроцитов приближалась к сферической, суспензии становились более однородными, что приводило к увеличению Alpha. В гипертоническом растворе эритроциты сморщивались, однородность измеряемых суспензий снижалась, что вызывало уменьшение Alpha. Таким образом,

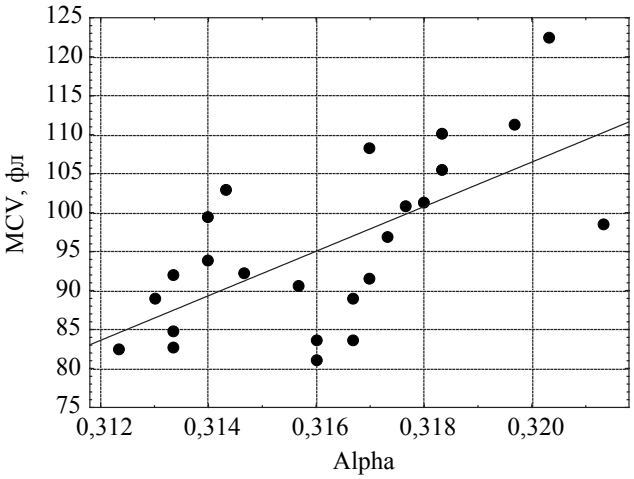

Рис. 1. Корреляция между среднеклеточным объемом эритроцитов и Alpha

литературные данные и результаты нашего исследования позволяют предположить, что параметр Alpha связан как со среднеклеточным объемом эритроцитов, так и с неоднородностью измеряемых суспензий.

Следует отметить, что серьезным препятствием к изучению MCV в крови и эритроцитарных суспензиях с помощью метода БИС является большое количество клеточных элементов в измеряемом образце, а также неоднородность эритроцитов по форме и размеру, взаимодействие между ними и т. д. По-видимому, уменьшение измеряемого образца крови до нескольких клеток или исследование отдельных эритроцитов позволит устранить влияние этих факторов. Измерение электрических параметров отдельных клеток имеет ряд преимуществ: снижается величина подаваемого напряжения, облегчается контроль температуры в измерительной камере [19]. Использование микропористых фильтров для исследования электрических свойств единичных эритроцитов значительно повышает точность измерений, поскольку существенно уменьшаются шунтирующие токи. Кроме того, эритроциты, находящиеся в порах фильтра, имеют одинаковую форму, что значительно облегчают интерпретацию результатов измерений [20].

Результаты нашей работы показали, что параметр Alpha отражает объем эритроцитов в концентрированных суспензиях со стандартным гематокритом. Вместе с тем, невысокий коэффициент корреляции между Alpha и MCV вызывает необходимость проведения исследования отдельных эритроцитов, что возможно позволит повысить точность определения MCV методом БИС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Davidson R. J.* High mean red cell volume: its incidence and significance in routine haematology / R. J. Davidson, P. J. Hamilton // J. Clin. Pathol. — 1978. — V. 31. — P. 493—498.

2. *Monzon C. M.* Evaluation of erythrocyte disorders with mean corpuscular volume (MCV) and red cell distribution width (RDW) / C. M. Monzon, B. D. Beaver, T. D. Dillon // Clin. Pediatr. (Phila). — 1987. — V. 26. — P. 632—638.

3. *Bessman J. D.* Erythrocyte volume distribution in normal and abnormal subjects / J. D. Bessman, R. K. Johnson // Blood. — 1975. — V. 46. — P. 369—379.

4. Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering // N. Mohandas [et al.] // Blood. — 1986. — V. 68. — P. 506—513.

5. An assessment of the Coulter counter model S / P. H. Pinkerton [et al.] // J. Clin. Pathol. — 1970. — V. 23. — P. 68—76.

6. Bioimpedance spectroscopy as technique of hematological and biochemical analysis of blood / M. V. Malahov [et al.] // J. Phys.: Conf. Ser. 2010. doi224 (1). 0121302010.

7. *Zhao T. X.* Contributions of suspending medium to electrical impedance of blood / T. X. Zhao // Biochim. Biophys. Acta. — 1994. — V. 1201. — P. 179—185.

8. *Розенталь М. И.* Определение количества эритроцитов на аппарате ФЭК-М / М. И. Розенталь // Лаб. дело. — 1966. — Т. 3. — С. 170—173.

9. *Cornisht B. H.* Improved prediction of extracellular and total body water using impedance loci generated by multiple frequency bioelectrical impedance analysis / B. H. Cornisht, B. J. Tomst, L. C. Ward // Phys. Med. Biol. — 1993. — V. 38. — P. 337—346.

10. *Zhao T. X.* Electrical impedance and haematocrit of human blood with various anticoagulants / T. X. Zhao // Physiol. Meas. — 1993. — V. 14. — P. 299—307.

11. *Grimnes S.* Bioimpedance and bioelectricity basics / S. Grimnes, O. G. Martinsen // L.: Academic Press. — 2008. — P. 311—312.

12. *Lang F.* Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanisms / F. Lang, G. Busch // Phys. Rev. — 1998. — V. 78. — P. 247—306.

13. *Ponder E.* The measurement of red cell volume: II. Alterations in cell volume in solutions of various tonicities / E. Ponder, G. J. Saslow // Physiol. — 1930. — V. 70. — P. 169—181.

14. *McManus M. L.* Regulation of cell volume in health and disease / M. L. McManus, K. B. Churchwell, K. N. Strange // Engl. J. Med. — 1995. — V. 333. — P. 1260—1266.

15. *Pauly H.* Dielectric Properties and Ion Mobility in Erythrocytes / H. Pauly, H.P. Schwan // Biophys. J. — 1966. — V. 6. — P.621—639.

16. *Martinsen Ø. G.* Interface Phenomena and Dielectric Properties of Biological Tissue / Ø. G. Martinsen, S. Grimnes, H. P. Schwan // Encyclopedia of Surface and Colloid Science. — 2002. — P. 2643—2652.

17. *Poon C. S.* Frequency dispersions of human skin dielectrics / C. S. Poon, T. T. Choy // Biophys. J. — 1981. — V. 34. — P. 135—147.

18. *Ulgen Y.* Physiological quality assessment of stored whole blood by means of electrical measurements / Y. Ulgen, M. Sezdi // Med. Bio. Eng. Comput. — 2007. — Vol. 45. — P. 653—660.

19. Dielectric spectroscopy of single human erythrocytes at physiological ionic strength: dispersion of the cytoplasm / J. Gimsa [et al.] // Biophys. J. — 1996. — V. 71. — P. 495—506.

20. *Bao J. Z.* Frequency domain impedance measurements of erythrocytes. Constant phase angle impedance characteristics and a phase transition / J. Z. Bao, C. C. Davis, R. E. Schmukler // Biophys. J. — 1992. — V. 61. — P. 1427—1434.

Малахов Максим Викторович — аспирант, Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского

Malahov Maxim V. — the graduate of Ushinskii' State Pedagogical University

Мельников Андрей Александрович — зав. кафедрой физического воспитания, д.б.н., доцент; Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского; e-mail: a.melnikov@yspu.yar.ru

Melnikov Andrey A. — the head and lector of Department of physical education Ushinskii' State Pedagogical University, PhD; e-mail: a.melnikov@yspu.yar.ru

Викулов Александр Демьянович — декан факультета физической культуры, зав. кафедрой теории физической культуры, д.б.н., профессор, Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского

Vikulov Alexander D. — PhD, the dean of Faculty of physical culture, the head and lector of Department of physical culture Ushinskii' State Pedagogical University