

## МОНИТОРИНГ СОСТОЯНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ МЕТОДОМ БИОИМПЕДАНСОМЕТРИИ

© 2012 С. А. Акулов, Р. Ю. Дорошенко

Самарский государственный аэрокосмический университет имени академика С. П. Королёва  
(национальный исследовательский университет)

Предлагается оценить жизнеспособность клеточных суспензий с помощью оценки их биоэлектрических свойств. Разработана методика оценки состояния клеточных суспензий, основанная на методе импульсной импедансометрии.

*Клеточные суспензии, электрический импеданс, переходная функция, пространство состояний, функциональная идентификация.*

В современной медицине для заживления обширных ран и язв широко применяется метод активной терапии посредством клеточных суспензий (фибробластов, хондробластов, гемопоэтических клеток) – клеток соединительной ткани, определяющих активность процессов регенерации. Преимуществами этого метода лечения являются малое время культивирования, высокая степень заживления, возможность создания банка клеток. Однако эффективное лечение достигается при использовании качественного материала.

В настоящее время широко используются методики оценки жизнеспособности клеток, основанные на цитохимических, биохимических и цитоэнзиматических методах [1]. При этом предполагается предварительная обработка клеточного материала химическими препаратами для выявления различной степени интенсивности специфической окраски, позволяющей оценивать количество и локализацию исследуемых веществ в клетках. Основными недостатками вышеуказанных методов являются существенные временные затраты и субъективность получаемых результатов. Перспективным направлением является определение параметров биоэлектрического импеданса [2] исследуемых клеточных суспензий с целью дальнейшей оценки их степени жизнеспособности.

В последние годы измерения электрического импеданса используются для получения информации о внутренней структуре биологических тканей (определение уровня дегидратации организма человека, определение компонентного состава мышечной ткани, определение состояния клеточных структур). Актуальным направлением использования приборов измерения электрического импеданса является их включение в состав систем гемодиализа, а также создание приборов экспресс-определения состава крови. Важным направлением развития указанных приборов является также оценка концентрации клеточных суспензий с целью определения состояния жизнедеятельности клеточных суспензий в медицине клеточных технологий. Данная задача требует экспресс-определения биоэлектрического импеданса в широком диапазоне частот.

Существующие измерительные приборы биоэлектрического импеданса, построенные по распространённой схеме потенциометрических измерений, не позволяют проводить экспресс-измерение параметров электрического импеданса в широком диапазоне частот. Длительное воздействие электрическим током на биологический объект (клеточный материал), обусловленное использованием данных измерительных систем, может привести к необратимым изменениям его структуры и, как следствие, может внести ошибки в

определение частотных характеристик биоэлектрического импеданса, а, следовательно, привести к неточной оценке степени жизнеспособности клеточной суспензии.

В данной работе в качестве показателя степени жизнеспособности клеточной суспензии выбран показатель электрического импеданса, отражающий изменение структурного состава. В частности, предполагается, что снижение степени жизнеспособности клеточной суспензии обусловлено уменьшением концентрации дисперсной фазы суспензии, ввиду того, что нежизнеспособность клетки проявляется разрушением клеточной мембраны, и, как следствие, приводит к изменению структурного состава.

Предложена методика экспресс-оценки характеристик электрического импеданса клеточной суспензии путем анализа переходной функции импеданса [3]. В качестве переходной функции импеданса рассматривается реакция исследуемого объекта на тестовое воздействие. Для определения частотной характеристики составляющих электрического импеданса в качестве тестового воздействия используется ступенчатый ток, в качестве реакции – напряжение, возникающее на исследуемом объекте. После времячастотного преобразования данных частотная характеристика импеданса может быть преобразована в передаточную функцию импеданса. Операторный импеданс рассматривается в пространстве моделей, характеризующих электрические свойства многокомпонентных биологических тканей, что позволяет перейти к электрическим эквивалентам ее составляющих и, в частности, к структурной оценке исследуемых тканей [4]. Метод пространства состояний [5] позволяет представить модель, полученную в виде передаточной функции, в виде системы дифференциальных уравнений первой степени относительно переменных состояния, имеющих вполне определенный биофизический смысл.

В настоящей работе для определения операторного импеданса использован

вычислительный метод прямой подгонки E.Levy [6], определяющий с заданной точностью операторный импеданс по данным частотной характеристики в виде отношения полиномов:

$$Z(s) = N(s)/D(s). \quad (1)$$

Если предположить, что корни знаменателя различны, то выражение для операторного импеданса может быть приведено к дробно-рациональному виду:

$$Z(s) = d_0 + \sum_{i=1}^n c_i / (s - a_i), \quad (2)$$

где  $d_0 = \lim_{s \rightarrow \infty} z(s)$ ,  $a_i, c_i$  – постоянные коэффициенты.

Соотношение между напряжением и током в операторной форме:

$$U(s) = d_0 \cdot I(s) + \sum_{i=1}^n I(s)c_i / (s - a_i). \quad (3)$$

Образует  $n$  – мерный вектор состояния:

$$q_i = I(s)/(s - a_i). \quad (4)$$

Теперь, переходя от изображений к оригиналам из (3) с учетом (4) получаем модель процессов, описывающих явление биоэлектрического импеданса с помощью уравнений вход – состояние – выход:

$$\begin{cases} Q' = A Q + i(t); \\ u(t) = C Q + d_0 i(t); \end{cases} \quad (5)$$

$$Q = \begin{bmatrix} q_1 \\ \mathbf{M} \\ q_n \end{bmatrix}, A = \begin{bmatrix} a_1 & \mathbf{K} & 0 \\ 0 & \mathbf{K} a_i \mathbf{K} & 0 \\ 0 & \mathbf{K} & a_n \end{bmatrix},$$

$$C = [c_{\mathbf{K}} c_n]. \quad (6)$$

Модель связывает входной ток, протекающий по исследуемому объекту, и выходное напряжение, регистрируемое на нем, через переменные состояния  $Q$ , которые, как нетрудно видеть, имеют размерность электрического заряда.

Коэффициент  $d_0$  в рассматриваемой задаче имеет размерность сопротивления и представляет собой не зависящую от частоты составляющую импеданса, то есть отражает свойства тканей, имеющих чисто активное сопротивление.

Дифференциальные уравнения (5) характеризуют импедансные свойства структур тканей, обладающих резистивно-емкостным сопротивлением. Эти уравнения, имеющие апериодические решения, описывают прохождение электрического тока через параллельное соединение активного и емкостного сопротивления.

Таким образом, схема моделирования, отвечающая уравнению (5), имеет вид электрической эквивалентной схемы, изображенной на рис.1. Параметры модели  $R_i$ ,  $C_i$  могут быть найдены из значений коэффициентов  $d_0$ ,  $a_i$ ,  $c_i$ .

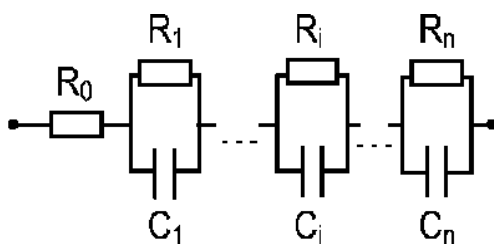


Рис. 1. Модель импеданса в виде эквивалентной электрической схемы

В данной работе в качестве экспериментального материала использовались клеточные суспензии хондробластов, взвешенных в растворе Хенкса. В результате исследований были получены частотные характеристики активной и реактивной составляющих электрического импеданса суспензии в различные моменты времени.

Для клеточных суспензий, имеющих многокомпонентную структуру, зависимость импеданса от частоты носит сложный характер. Для «низких» частот (< 1 Гц) абсолютная величина импеданса составляет сотни Ом и слабо зависит от частоты; далее, для «средних» частот (10 Гц...1 кГц), происходит спад импеданса до уровня десятков Ом, а затем, при увеличении частоты в область более «высоких» частот, импеданс изменяется слабо.

Количество переменных состояния модели (5) определяет структуру эквивалентной схемы. При выборе ошибки аппроксимации экспериментальной частотной характеристики более 10% число переменных состояния модели уменьшается. Так, для  $n = 1$  полученная модель состоит из трех элементов. По своей структуре она отличается от вида трехэлементной модели  $Na_{na1}$ , используемой для моделирования биологических сред [7], однако, частотные характеристики моделей при определенных соотношениях элементов совпадают, так как описывают один и тот же процесс.

На основании предложенной методики оценки структурного состава суспензии с однокомпонентной дисперсионной фазой была получена электрическая эквивалентная схема замещения, показанная на рис. 2. Параметры эквивалентной схемы в различные моменты времени приведены в табл. 1.

Параллельно с вышеуказанным экспериментом осуществлялась оценка степени жизнеспособности цитохимическим методом с непосредственным подсчетом жизнеспособных клеток в камере Горяинова.

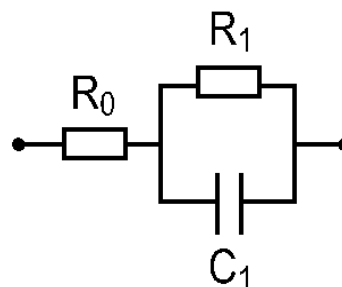


Рис. 2. Эквивалентная схема замещения клеточной суспензии

Зависимости изменения параметра  $C_1$  от момента времени измерения приведены на рис. 3.

Таблица 1. Изменение параметров эквивалентной схемы замещения электрического импеданса суспензии фибробластов в различные моменты времени

	$R_0$ , Ом	$R_1$ , Ом	$C_1$ , мкФ
Нач. момент	27	120	2341
Час спустя	25	115	2655
Два часа спустя	21	113	3012
Три часа спустя	19	110	3540
Четыре часа спустя	19	107	4335

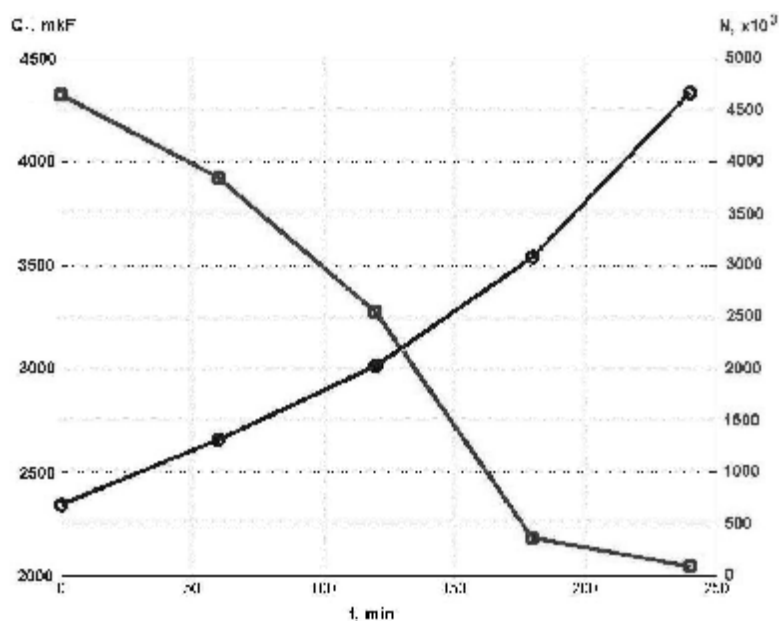


Рис. 3. Зависимость величины параметра  $C_1$  и количества живых клеток  $N$  от времени измерения  $t$

С течением времени происходит снижение количества жизнеспособных клеток. При этом отмечается возрастание параметра  $C_1$ . Увеличение параметра  $C_1$  может быть обусловлено продуктами распада клетки, вносящими существенный вклад в поверхностную площадь. На основании полученных данных можно предложить методику измерения степени жизнеспособности клеток по определению параметров эквивалентной схемы замещения клеточной суспензии.

Данный метод позволяет оценить степень жизнеспособности клеточных

суспензий с течением времени. При этом процесс измерения, т.е. воздействия на пробу клеточной суспензии, осуществляется в течение действия тестирующего импульса электрического тока, что позволяет получить быструю оценку степени жизнеспособности клеточной суспензии.

#### Библиографический список

1. Fletcher, D. Instrumental methods in electrochemistry [Текст] /D. Fletcher, R. Greef, R. Peat et al.// Horwood Publishing Ltd, Coll House, Westergate, Chichester, England, 2001. - P. 445.

2. Fricke, H. The Maxwell-Wagner dispersion in a suspension of ellipsoids [Текст]/H. Fricke // J. Phys. Chem. 1993. – P. 934-937.

3. Акулов, С.А. Оценка частотной характеристики биоэлектрического импеданса тканей методом анализа переходных функций [Текст] /С.А. Акулов,

Л.И. Калакутский // Сборник трудов Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Современные техника и технологии» в 3-х томах. Т.1. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2007. – С. 499-501.

4. Bragos, R. Cell growing and differentiation monitoring system using electrical bioimpedance spectroscopy measurement on interdigitated microelectrodes [Текст] / R. Bragos, E. Sarro, H. Estruch, J. Farre//

The 3rd European Medical and Biological Engineering Conference November 20-25, 2005, EMBEC'05 Prague, Czech Republic IFMBE Proc. 2005 11(1). – P. 247-248.

5. Лошилов, В.И. Биотехнические системы электронейростимуляции [Текст] / В.И. Лошилов, Л.И. Калакутский // – М.: МГТУ, 1991. - 168 с.

6. Sanathanan, C. Transfer function synthesis as a ratio of two complex polynomials [Текст] / C. Sanathanan, J. Koerner // Automatic Control, IEEE Transactions on Volume 8, Issue 1, Jan 1963. – P. 56 – 58.

7. Smyet, S. Comparison of extracellular fluid volume measurement in children by  $^{99}\text{Tc}^m$  – DPTA clearance and multi-frequency impedance techniques [Текст]/

S. Smyet, H. Nonvoedt// Physiol. Meas. 1994 (15). – P. 251-260.

## CELL SUSPENSIONS STATUS MONITORING BY BIOIMPEDANCE METHOD

© 2012 S.A. Akulov, R.J. Doroshenko

Samara State Aerospace University named after academician S. P. Korolyov  
(National Research University)

In this paper we evaluate the viability of cell suspensions with the assessment of their bioelectric properties. A method for evaluation of cell suspensions, based on the method of pulse impedance.

*Cell suspensions, electrical impedance, transfer function, state space, the functional identification.*

### Информация об авторах

**Акулов Сергей Анатольевич**, кандидат технических наук, ассистент кафедры радиотехники и медицинских диагностических систем, Самарский государственный аэрокосмический университет имени академика С. П. Королёва (национальный исследовательский университет). E-mail: [sakulov1981@mail.ru](mailto:sakulov1981@mail.ru). Область научных интересов: моделирование биотехнических систем, исследование биоэлектрического импеданса, измерительные преобразователи биологической информации.

**Дорошенко Роман Юрьевич**, студент, Самарский государственный аэрокосмический университет имени академика С. П. Королёва (национальный исследовательский университет) E-mail: [RDssau@yandex.ru](mailto:RDssau@yandex.ru). Область научных интересов: цифровая обработка биосигналов, программирование микроконтроллеров.

**Akulov Sergey Anatoljevich**, candidate of technical sciences, assistant professor of radioengineering and biomedical engineering department. Samara State Aerospace University named after academician S. P. Korolyov (National Research University). E-mail: [sakulov1981@mail.ru](mailto:sakulov1981@mail.ru). Area

of scientific: modeling of biotechnical systems, the study of bioelectric impedance transducers of biological information.

**Doroshenko Roman Jurjevich**, student, Samara State Aerospace University named after academician S. P. Korolyov (National Research University). E-mail: [RDssau@yandex.ru](mailto:RDssau@yandex.ru). Area of scientific: digital processing of biosignals, programming microcontrollers.