

WITOLD JAROSZYŃSKI, BARTŁOMIEJ KWIATKOWSKI, PIOTR BOGUŚ

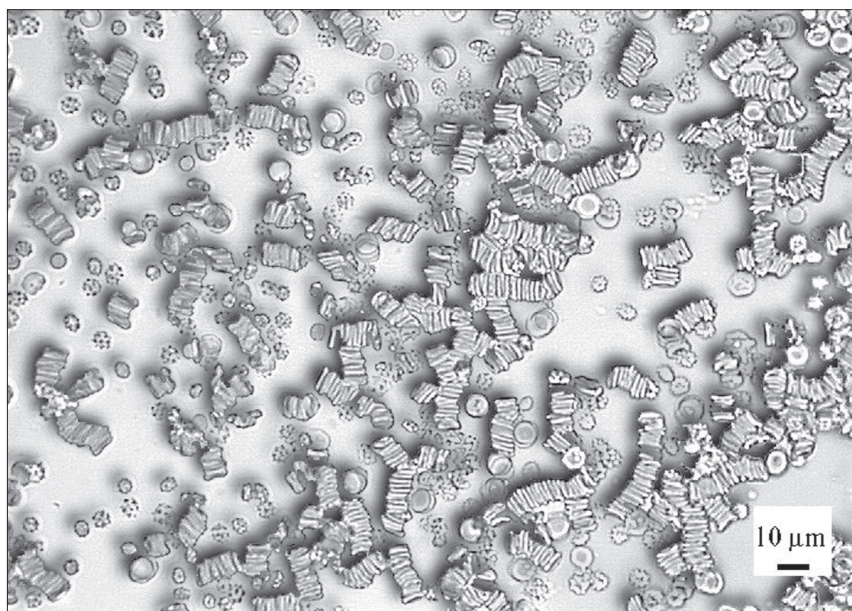
**WPLYW HEMATOKRYTU NA STOPIEŃ I KINETYKĘ  
AGREGACJI ERYTROCYTÓW LUDZKICH.  
BADANIA METODĄ SPEKTROSKOPII DIELEKTRYCZNEJ**

INFLUENCE OF HEMATOCRIT ON RATE AND KINETICS  
OF HUMAN ERYTHROCYTES AGGREGATION.  
DIELECTRIC SPECTROSCOPY METHOD RESEARCHES

Katedra i Zakład Fizyki i Biofizyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
kierownik: dr hab. inż. Piotr Boguś

Agregacja erytrocytów uważana jest za jeden z głównych czynników wpływających na lepkość krwi, a w zakresie niskich prędkości ścinania stanowi ona główny czynnik determinujący przepływ krwi. Z tych powodów agregacja erytrocytów odgrywa ważną rolę w reologii krwi. Wśród chorób, które w istotny sposób wiążą się ze zmianami właściwości reologicznych krwi (powodowanymi w znacznym stopniu agregacją erytrocytów) wymienia się: niewydolność naczyń wieńcowych serca, zawał mięśnia sercowego, zatory, chorobę niedokrwinną kończyn, cukrzycę, anemię, zaburzenia krążenia mózgowego i siatkówkowego, a także otyłość. Ponieważ wpływ hematokrytu (także decydującego o lepkości krwi) na stopień i kinetykę agregacji erytrocytów wciąż pozostaje nie w pełni wyjaśniony, problem ten stał się celem prezentowanej pracy. Realizowano go poszukując zależności stopnia agregacji (SA) erytrocytów od hematokrytu, a także związku między czasami relaksacji  $\tau_1$  i  $\tau_2$  (charakteryzującymi kinetykę tego procesu) i hematokrytem. Na podstawie uzyskanych w przedstawianej pracy wyników można wnioskować, że wraz ze wzrostem hematokrytu wartości  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  oraz SA maleją nieliniowo.

Erytrocyty ludzkie w obecności białek osoczowych (fibrynogen,  $\alpha_2$ -globuliny, immunoglobuliny) i przy braku naprężenia ścinania (braku przepływu krwi) mogą łączyć się w pojedyncze, elastyczne pakiety (podobne do stosu monet) określane mianem rulonów (*rouleaux*). Liniowe rulony (w zależności od naprężenia ścinania) łącząc się bokami mogą z kolei utworzyć rozgałęzione przestrzenne sieci (*3D-networks*) (ryc. 1). To dynamiczne i odwracalne zjawisko zwane agregacją odgrywa ważną rolę w hemoreologii i można go obserwować zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*.



Ryc. 1. Erythrocyty zawieszone w 0,9% roztworze NaCl zawierającym 1,5% HAES (zdjęcie ze zbiorów własnych)

Fig. 1. Erythrocytes suspended in 0.9% NaCl solution containing 1.5% HAES (photography from own collection)

O zdolności erythrocytów do agregacji decyduje nie tylko skład białek osocza i naprężenie ścinania. Wpływ na nią mają także właściwości samych erythrocytów np. ich kształt, wielkość powierzchni, elektryczny ładunek powierzchniowy i biomechaniczne właściwości błony komórkowej. Należy zaznaczyć, że erythrocyty mogą utworzyć agregaty jeśli zostaną zawieszone w roztworze elektrolitu zawierającym np. dekstran [15] lub hydroksyetyloskrobię [10-13].

Miejscami szczególnie podatnymi na tworzenie się agregatów erythrocytarnych są małe naczynia krwionośne, w których prędkości ścinania osiągają zazwyczaj niewielkie wartości. Powoduje to spadek prędkości przepływu krwi, a nawet jego zahamowanie czego konsekwencją jest niedotlenienie komórek i tkanek. Wzmoczoną agregację erythrocytów obserwowano u osób m.in. z hipercholesterolemią [6], cukrzycą [21] i sepsą [3].

Ponieważ agregację erythrocytów uważa się za jeden z głównych determinantów lepkości krwi, która jest jej podstawowym parametrem reologicznym dlatego zjawisko to jest od kilkudziesięciu lat przedmiotem zainteresowania wielu badaczy. Wykonywane są eksperymenty nie tylko z krwią ludzką i zwierzęcą, ale również z roztworami polimerów o właściwościach reologicznych zbliżonych do krwi. Pomimo rozwoju techniki pomiarowej i obliczeniowej, wpływ tego zjawiska na właściwości reologiczne krwi w warunkach normalnych i patologicznych wciąż nie jest dokładnie poznany.

Wszystkie obecnie dostępne metody badań agregacji erythrocytów można sklasyfikować w dwóch grupach. Do pierwszej należą metody bezpośrednio oparte na mikroskopowych obserwacjach tworzących się agregatów [4]. Drugą grupę stanowią metody pośrednie wykorzystujące pomiary optyczne (pomiary natężenia fali świetlnej przechodzącej lub rozpraszanej przez prób-

kę) [21, 22], impedancyjne (pomiaru oporu lub pojemności elektrycznej między elektrodami z próbką) [2, 7, 9-13, 17-19] oraz ultradźwiękowe (analiza sygnału dopplerowskiego) [14].

Należy zaznaczyć, że metody bezpośrednie posiadają istotne ograniczenie. Można je stosować tylko w odniesieniu do próbek o małym hematokrycie; poniżej 10%. Stosując metody wykorzystujące rozpraszanie fali świetlnej lub ultradźwiękowej na erytrocytach lub ich agregatach uzyskuje się wielkości fizyczne, które są funkcjami nie tylko rozmiaru cząstek rozpraszających. Zależą one również od innych właściwości fizycznych tych cząstek, jak i osocza powodując, że wyniki pomiarów nie są jednoznaczne [17].

Wymienionych wyżej ograniczeń nie posiada metoda spektroskopii dielektrycznej, którą z powodzeniem stosowano w monitorowaniu przebiegu agregacji erytrocytów w krwi pełnej [7, 9], a także w różnych środowiskach [7, 10-13]. Spośród bezpośrednio mierzalnych wielkości elektrycznych charakteryzujących proces agregacji erytrocytów najczęściej stosowaną jest pojemność elektryczna  $C_L$  zawiesiny erytrocytów. Pojemność  $C_L$  mierzy się w funkcji czasu tworzenia się agregatów, przy określonej częstotliwości pola elektrycznego np. przy 63 kHz [7], 100 kHz [9-13] lub 500 kHz [17-19]. Na podstawie zmierzonej w ten sposób pojemności  $C_L$  możliwe jest obliczenie przenikalności elektrycznej względnej  $\epsilon_L$  zawiesiny erytrocytów, która jest już wielkością niezależną od geometrii komory pomiarowej.

Wcześniejsze prace własne dotyczyły określenia stopnia [9, 11-13] i kinetyki agregacji [10, 11] erytrocytów w środowisku zawierającym płyn osoczozastępczy w postaci hydroksyetylowanej skrobi. Przedmiotem naszych zainteresowań był też wpływ rodzaju hydroksyetylowanej skrobi na agregację erytrocytów. Porównano skuteczność dwóch preparatów w generowaniu tego zjawiska: HAES-steril 200/0,5 oraz HES 130/0,4 [12]. Wzmiankowane badania wykonano w oparciu o metodę spektroskopii dielektrycznej.

W celu dokładniejszego poznania mechanizmów i uwarunkowań agregacji erytrocytów istotnymi wydają się być badania wpływu hematokrytu zarówno na stopień jak i na kinetykę ich agregacji. Obecnie znane są prace, w których zbadano tylko w sposób jakościowy wpływ hematokrytu na agregację erytrocytów przy czym stosowane w nich techniki pomiaru wykorzystywały: falę ultradźwiękową [14], spektroskopię impedancyjną [18] oraz metody optyczne [22].

## CEL PRACY

Celem przedstawianej pracy było ustalenie (za pomocą spektroskopii dielektrycznej) związku między:

1. czasami relaksacji  $\tau_1$  i  $\tau_2$  charakteryzującymi kinetykę agregacji erytrocytów ludzkich, a wartością hematokrytu,
2. stopniem agregacji erytrocytów i wartością hematokrytu.

## MATERIAŁ I METODY

### Sposób przygotowania próbek do pomiarów dielektrycznych

Badania przeprowadzono na krwi żyłnej pobranej na heparynę od zdrowego dawcy. Wyjściową porcję krwi pełnej przeniesiono do probówek typu Eppendorf, odwirowano przy 500×g przez 5 minut, a następnie ostrożnie odciągnięto osocze. W kolejnym etapie do probówek z osadem dodano odpowiednią objętość osocza uzyskując próbki krwi o hematokrytach 24%,

35%, 40% i 48%. Oznaczono je odpowiednio symbolami A, B, C oraz D. Hematokryt wyznaczano (z dokładnością  $\pm 1\%$ ) stosując mikrowirówkę hematokrytową typ 347S, P.Z. SEBA prod. krajowej. Czas jaki upływał od momentu pobrania krwi do zakończenia pomiarów dielektrycznych nie przekraczał 60 minut.

### Pomiary dielektryczne

Na podstawie prac [7, 9] przyjęto przenikalność elektryczną względną  $\epsilon_L$  krwi, wyznaczaną dla częstotliwości 100 kHz, jako wielkość użyteczną do monitorowania agregacji erytrocytów. Wartość  $\epsilon_L$  wyznaczano ze wzoru (1) na podstawie pomiarów pojemności elektrycznej  $C_L$  próbek krwi w funkcji czasu. Pojemność elektryczną  $C_L$  próbek mierzono analizatorem impedancji typ 4192A prod. Yokogawa-Hewlett-Packard (Japonia) z uchwytem pomiarowym typ 16047A. Pomiary wykonywano przy częstotliwości 100 kHz, napięciu 0,5 V oraz aktywnej opcji pomiaru 'Average'. Opcja ta zapewniała zmniejszenie fluktuacji wartości  $C_L$ , gdyż jej ostateczna wartość była średnią siedmiu pomiarów dla danej częstotliwości. Analizator połączono ze sterownikiem za pomocą interfejsu standardu HP-IB (IEEE-488). Sterownikiem był komputer osobisty z procesorem Pentium III 1 GHz, 384 MB RAM. W komputerze zainstalowano kartę interfejsu typ 82335A prod. Hewlett-Packard (USA). Program sterujący pomiarami pojemności  $C_L$  (w funkcji czasu) napisano w języku Turbo Pascal firmy Borland International Inc. (USA) w wersji 1.5 dla Windows.

Komora pomiarowa tworzyła kondensator płaski o okrągłych elektrodach umieszczonych w płaszczyźnie pionowej. Średnica tej części elektrody, która kontaktowała się z próbką wynosiła 2,5 mm, a odległość między elektrodami wynosiła 4 mm. Platynowe powierzchnie czołowe elektrod pokrywano galwanicznie czernią platynową w celu zmniejszenia wpływu polaryzacji elektrod na mierzoną pojemność elektryczną  $C_L$  próbki. Wymagana do pomiarów dielektrycznych objętość próbki wynosiła ok. 35  $\mu\text{l}$ .

Pojemność elektryczną  $C_R$  przewodów łączących komorę pomiarową z analizatorem wyznaczono doświadczalnie uzyskując wartość  $C_R = 0,49$  pF. Odchylenie standardowe wartości średniej  $C_R$  było mniejsze niż 0,01 pF. Stałą ( $k$ ) komory wyznaczono na podstawie pomiarów dielektrycznych cieczy wzorcowej w postaci wody bidestylowanej i zdejonizowanej. Wykonano 10 pomiarów otrzymując wartość średnią  $k = (655 \pm 2) \text{ m}^{-1}$ . Pomiary wykonywano w temperaturze 25 °C. Stałą temperaturę pomiarów utrzymywano z dokładnością  $\pm 1$  °C za pomocą termostatu typ U1 prod. Veb MLW Prüfgerätee-Werk Medingen (Niemcy). Jako cieczy termostatującej użyto parafiny ciekłej (Parafinum liquidum FP IV, Laboratorium Galenowe PZF Cefarm).

Pomiary pojemności elektrycznej  $C_L$  próbek krwi w funkcji czasu wykonywano w następujący sposób. W pierwszym etapie przepuszczano próbkę przez komorę pomiarową (podłączoną do gotowego do pomiarów analizatora) tłocząc ją mikrostrzykawką zakończoną igłą o średnicy ok. 0,27 mm. W trakcie przepływu próbki następowała dezagregacja erytrocytów w następstwie naprężenia ścinającego występującego podczas przepływu krwi przez igłę. Wymuszano taką wartość natężenia przepływu krwi, aby uzyskać minimalną wartość mierzonej pojemności  $C_L$ , co świadczyło o całkowitej dezagregacji erytrocytów w próbce. Następnie wstrzymywano przepływ krwi (uzyskując warunki statyczne) i jednocześnie uruchamiano program sterujący pomiarami pojemności elektrycznej  $C_L$  w funkcji czasu oraz obliczający przenikalność elektryczną względną  $\epsilon_L$  próbki ze wzoru:

$$\varepsilon_L = \frac{k}{\varepsilon_0} (C_L - C_R) \quad (1)$$

gdzie:  $k$  – stała komory ( $k = 655 \text{ m}^{-1}$ );  $\varepsilon_0$  – przenikalność elektryczna bezwzględna próżni ( $\varepsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} \text{ F} \times \text{m}^{-1}$ );  $C_L$  – pojemność elektryczna próbki (F);  $C_R$  – pojemność elektryczna przewodów łączących komorę pomiarową z analizatorem 4192A ( $C_R = 0,49 \times 10^{-12} \text{ F}$ ).

Koniec pomiarów pojemności  $C_L$  następował po 250 s od momentu wstrzymania przepływu krwi przez komorę pomiarową, ponieważ wielkość ta nie podlegała już zmianom. Dla każdej z czterech próbek krwi różniących się hematokrytem (tzn. A, B, C i D) wykonano sześć pomiarów wartości  $C_L$  w funkcji czasu uzyskując serie odpowiednio:  $A_{\_1}, \dots, A_{\_6}$ ;  $B_{\_1}, \dots, B_{\_6}$  itd. z obliczonymi wartościami przenikalności elektrycznej względnej  $\varepsilon_L$  krwi.

### Obliczenia numeryczne

Wielkości charakteryzujące proces kinetyki agregacji erytrocytów uzyskiwano stosując metodę dopasowania funkcji. Jako funkcji teoretycznej użyto równania zaproponowanego przez Irimajiri'ego i wsp. [7], poddanego modyfikacji własnej. Modyfikacja polegała na wprowadzeniu do tego równania dodatkowego parametru ( $t_0$ ) oznaczającego czas początkowy w którym erytrocyty są w stanie dezagregacji, przez co lepiej aproksymowało ono dane doświadczalne. Postać zmodyfikowanego równania była następująca:

$$\varepsilon_L = \varepsilon_p + (\varepsilon_K - \varepsilon_p) \{ 1 - p \times \exp[-(t - t_0)/\tau_1] - (1 - p) \exp[(t - t_0)/\tau_2] \} \quad (2)$$

gdzie:  $t$  – godzina pomiaru [s];  $t_0$  – godzina pomiaru [s] odpowiadająca sytuacji, gdy  $\varepsilon_L = \varepsilon_p$ ;  $\varepsilon_L$  – przenikalność elektryczna względna próbki w chwili  $t - t_0$ ;  $\varepsilon_p$  – przenikalność elektryczna względna próbki w warunkach, gdy erytrocyty są w stanie dezagregacji (odpowiada to chwili  $t = t_0$ );  $\varepsilon_K$  – przenikalność elektryczna względna próbki dla  $t \rightarrow \infty$ ;  $p$  – stała ( $0 < p < 1$ );  $\tau_1, \tau_2$  – czasy relaksacji charakterystyczne dla etapów agregacji odpowiednio – szybko- i wolnozmienne [s]. Godziny pomiaru  $t$  oraz  $t_0$  zwraca (w postaci aktualnego czasu systemowego) pascalska procedura GetTime zawarta w programie sterującym pomiarami dielektrycznymi.

Funkcję doświadczalną stanowiły wartości  $\varepsilon_L$  uzyskane ze wzoru (1) na podstawie pomiarów pojemności  $C_L$  krwi w funkcji czasu, przy częstotliwości pola elektrycznego 100 kHz. Dopasowanie funkcji realizowano za pomocą programu MINUIT (wersja 93.08) [8], do którego dołączono podprogram użytkownika zawierający m.in. funkcję teoretyczną wyrażoną równaniem (2) oraz minimalizowaną funkcję celu, która miała następującą postać:

$$OF = \sum_{i=1}^n \left[ \frac{\varepsilon_D(i) - \varepsilon_T(i)}{\varepsilon_T(i)} \right]^2 \quad (3)$$

gdzie:  $\varepsilon_D(i)$  – przenikalność elektryczna względna próbki wyznaczona doświadczalnie;  $\varepsilon_T(i)$  – przenikalność elektryczna względna próbki wyznaczona teoretycznie;  $n$  – liczba pomiarów ( $n = 220$ ).

Wyznaczeniu (metodą dopasowania funkcji) podlegały wielkości  $\varepsilon_p$ ,  $\varepsilon_k$ ,  $p$ ,  $\tau_1$  oraz  $\tau_2$ . Dla każdej serii pomiarowej z zestawu serii: A\_1,...,A\_6; B\_1,...,B\_6 itd. dopasowanie funkcji przeprowadzono pięć razy. W kolejnych dopasowywaniach zmieniano wartości startowe (początkowe) szukanych wielkości. Miało to na celu sprawdzenie, czy nie zostanie znaleziona mniejsza wartość funkcji celu, a tym samym lepsze dopasowanie między funkcjami. Następnie z każdego pięciu dopasowań wybierano to, któremu odpowiadała najmniejsza wartość funkcji  $CHI^2$ , przyjętej jako kryterium dopasowania funkcji. Wartość funkcji  $CHI^2$  obliczano ze wzoru [20]:

$$CHI^2 = \sum_{i=1}^n \frac{[\varepsilon_D(i) - \varepsilon_T(i)]^2}{\varepsilon_T(i)} \quad (4)$$

gdzie:  $\varepsilon_D(i)$  – przenikalność elektryczna względna próbki wyznaczona doświadczalnie;  $\varepsilon_T(i)$  – przenikalność elektryczna względna próbki wyznaczona teoretycznie;  $n$  – liczba pomiarów ( $n = 220$ ).

W wyniku obliczeń numerycznych uzyskano serie: A\_1\_1,...,A\_1\_5; A\_2\_1,...,A\_2\_5 itd. Na podstawie znalezionych wielkości  $\varepsilon_p$  oraz  $\varepsilon_k$  obliczano stopień agregacji erytrocytów ze wzoru:

$$SA = \frac{\varepsilon_K - \varepsilon_P}{\varepsilon_K} \quad (5)$$

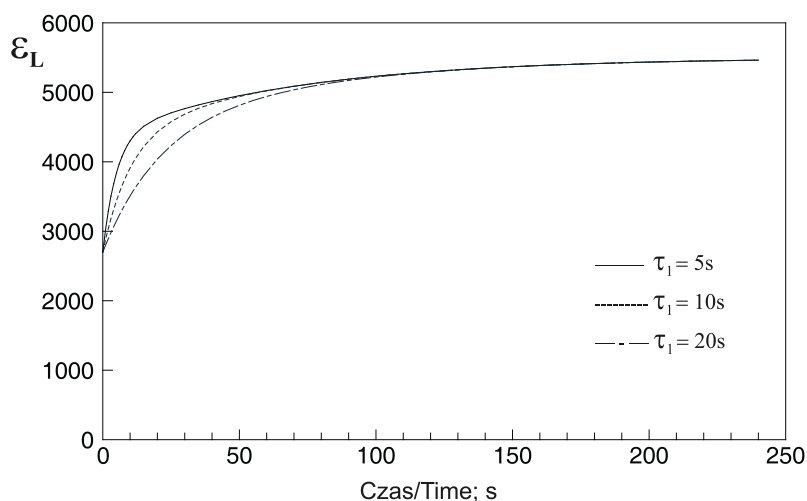
gdzie:  $\varepsilon_k$  – przenikalność elektryczna względna próbki dla  $t \rightarrow \infty$ ;  $\varepsilon_p$  – przenikalność elektryczna względna próbki w warunkach, gdy erytrocyty są w stanie dezagregacji.

Obliczenia numeryczne wykonano w języku FORTRAN 77, stosując kompilator gcc-g77-3.4.5 wchodzący w skład darmowego, dostępnego w internecie [dostęp: 2010-07-14; adres: <http://www.mingw.org/>] kompilatora MinGW (Minimalistic GNU for Windows) będącego portem zestawu kompilatorów GCC dla platformy Windows. Kod źródłowy podprogramu użytkownika napisano korzystając z darmowego, dostępnego w internecie [dostęp: 2010-07-14; adres: <http://www.geany.org/>] programu Geany (wersja 0.19) będącego połączeniem edytora tekstu z prostym środowiskiem programistycznym.

Błąd metody zminimalizowano przez wykonywanie dużej liczby (ok. 200) pomiarów pojemności  $C_L$  w przedziale czasu  $0 \div 250$  s oraz stosowanie opisanej powyżej opcji pomiaru 'Average' dostępnej w analizatorze HP 4192A. Rozważono także możliwość wpływu sedymentacji agregatów erytrocytarnych na mierzoną pojemność elektryczną  $C_L$ . Jednak jak wykazano w pracy [1] wpływ tego zjawiska na wartości mierzonych wielkości elektrycznych (pojemności i przewodności) zawiesiny komórek w przypadku czasu pomiaru krótszego niż 10 min uwidacznia się wtedy, gdy powierzchnie elektrod komory pomiarowej są równoległe i znajdują się w płaszczyźnie poziomej. Natomiast gdy powierzchnie elektrod są równoległe i umieszczone są pionowo, wówczas efekt ten jest zaniedbywalny (dla czasu krótszego niż 10 min). Zatem ze względu na stosowany w tej pracy pionowy układ elektrod i czas pomiaru krótszy niż 10 min, wpływ sedymentacji agregatów erytrocytarnych na mierzone wartości pojemności  $C_L$  można było pominąć. Przedstawione na wykresach odchylenie standardowe pojedynczego pomiaru wynikało z procedury napełniania komory pomiarowej.

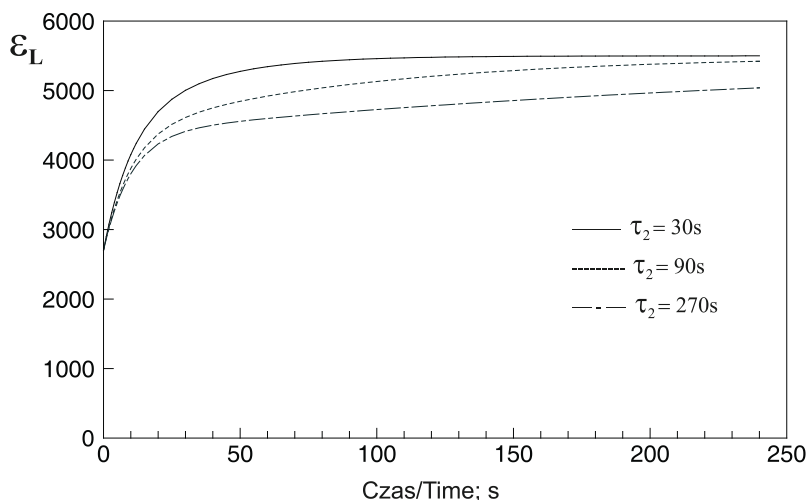
## WYNIKI

W celu analizy wpływu czasów relaksacji  $\tau_1$  oraz  $\tau_2$  na czasowe przebiegi funkcji  $\varepsilon_L$  wykonano odpowiednie symulacje. Na ryc. 2 przedstawiono wpływ wartości  $\tau_1$  na przebieg funkcji  $\varepsilon_L$ . Obliczenia wartości tej funkcji wykonano w przedziale czasu  $0 \div 250$  s dla wartości  $\tau_1 = 5$  s, 10 s oraz 20 s, przyjmując jednocześnie, że  $\tau_2 = 70$  s,  $\varepsilon_p = 2700$ ,  $\varepsilon_K = 5500$ ,  $p = 0,6$ .



Ryc. 2. Symulacja przebiegu funkcji  $\varepsilon_L$  dla różnych wartości czasu relaksacji  $\tau_1$

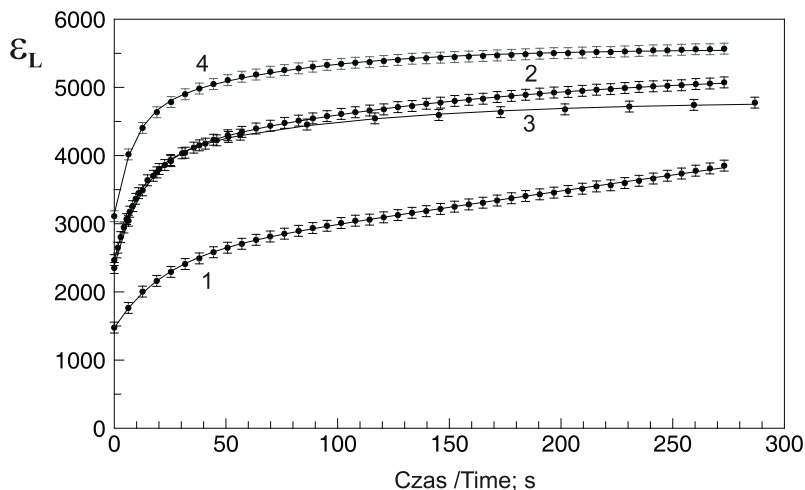
Fig. 2. Simulation of  $\varepsilon_L$  function graph for different values of relaxation time  $\tau_1$



Ryc. 3. Symulacja przebiegu funkcji  $\varepsilon_L$  dla różnych wartości czasu relaksacji  $\tau_2$

Fig. 3. Simulation of  $\varepsilon_L$  function graph for different values of relaxation time  $\tau_2$

Ryc. 3 obrazuje wpływ czasu relaksacji  $\tau_2$  na przebieg funkcji  $\varepsilon_L$ . Obliczenia wykonano dla tego samego przedziału czasu i tych samych wartości  $\varepsilon_p$ ,  $\varepsilon_K$ , oraz  $p$ , stosując wartości  $\tau_2$  odpowiednio: 30 s, 90 s oraz 270 s; ponadto przyjęto, że  $\tau_1 = 10$  s.



Ryc. 4. Zmiany  $\varepsilon_L$  krwi w funkcji czasu. Czas  $t_0$  odpowiada wstrzymaniu przepływu krwi przez komorę pomiarową. Linia ciągłą zaznaczono krzywe otrzymane w wyniku dopasowania funkcji. 1 – próbka A\_1\_1, Ht = 24%; 2 – próbka B\_3\_5, Ht = 35%; 3 – próbka C\_3\_5, Ht = 40%; 4 – próbka D\_5\_4, Ht = 48%

Fig. 4. The variation of blood  $\varepsilon_L$  in time. Time  $t_0$  corresponds to the moment of stopping blood flow through the measurement chamber. A solid line indicates curves obtained by function fitting. 1 – specimen A\_1\_1, Ht = 24%; 2 – specimen B\_3\_5, Ht = 35%; 3 – specimen C\_3\_5, Ht = 40%; 4 – specimen D\_5\_4, Ht = 48%

Na ryc. 4 przedstawiono (w postaci punktów) zmiany przenikalności elektrycznej względnej ( $\varepsilon_L$ ) próbek krwi różniących się hematokrytem w funkcji czasu. Linie ciągłe reprezentują wynik najlepszego numerycznego dopasowania równania (2) do wartości doświadczalnych uzyskanych na podstawie pomiarów dielektrycznych. Wartości  $\varepsilon_L$  wyznaczano na podstawie pojemności elektrycznej  $C_L$  krwi mierzonej w warunkach braku naprężenia ścinającego (po wstrzymaniu przepływu krwi przez komorę pomiarową). Wyznaczone (metodą dopasowania funkcji) czasy relaksacji dla składowej szybko- i wolnozmięnej agregacji erytrocytów wynosiły odpowiednio:  $\tau_1 = 22,2$  s i  $\tau_2 = 3151$  s dla próbki A\_1\_1 (Ht = 24%, linia 1 na wykresie),  $\tau_1 = 12,4$  s i  $\tau_2 = 138$  s dla próbki B\_3\_5 (Ht = 35%, linia 2 na wykresie),  $\tau_1 = 11,6$  s i  $\tau_2 = 91,5$  s dla próbki C\_3\_5 (Ht = 40%, linia 3 na wykresie) oraz  $\tau_1 = 6,2$  s i  $\tau_2 = 43,6$  s dla próbki D\_5\_4 (Ht = 48%, linia 4 na wykresie).

W tabeli I zestawiono wyniki obliczeń (metodą dopasowania funkcji) parametrów charakteryzujących stopień i kinetykę agregacji erytrocytów w próbkach krwi różniących się hematokrytem. Dane zawarte w tabeli pozwalają na stwierdzenie, że w miarę wzrostu hematokrytu skróceniu ulegają czasy relaksacji  $\tau_1$  i  $\tau_2$ , a stopień agregacji erytrocytów maleje.

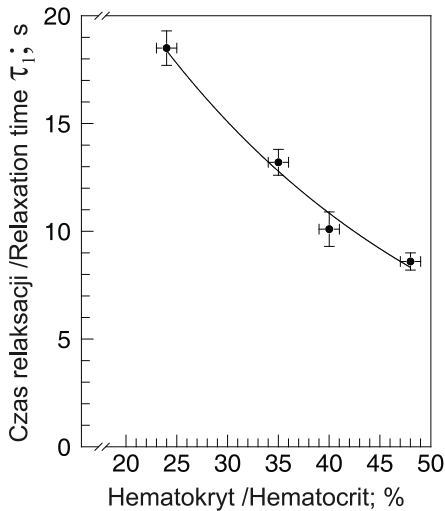


Tabela I. Parametry charakteryzujące stopień i kinetykę agregacji erytrocytów ludzkich (Wyniki przedstawiono jako wartość średnia  $\pm$  odchylenie standardowe wartości średniej)

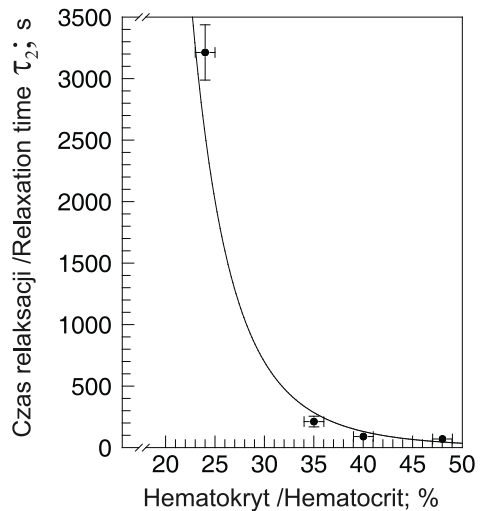
Table I. The parameters which characterize rate and kinetics of human erythrocyte aggregation (Results are presented as mean value  $\pm$  standard error)

Próbka Specimen	$\varepsilon_p$ (--)	$\varepsilon_k$ (--)	P (--)	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)	SA (--)
A (Ht=24%)	1518 $\pm$ 18	20349 $\pm$ 1402	0,0510 $\pm$ 0,0039	18,5 $\pm$ 0,8	3213 $\pm$ 225	0,92 $\pm$ 0,00
B (Ht=35%)	2279 $\pm$ 39	5372 $\pm$ 227	0,5128 $\pm$ 0,0345	13,2 $\pm$ 0,6	212 $\pm$ 43	0,57 $\pm$ 0,02
C (Ht=40%)	2394 $\pm$ 44	4652 $\pm$ 71	0,5584 $\pm$ 0,0293	10,1 $\pm$ 0,8	90,3 $\pm$ 3,9	0,49 $\pm$ 0,01
D (Ht=48%)	3012 $\pm$ 40	5470 $\pm$ 28	0,5916 $\pm$ 0,0058	8,6 $\pm$ 0,4	70,4 $\pm$ 2,5	0,45 $\pm$ 0,01

Na ryc. 5 pokazano zależność czasu relaksacji  $\tau_1$  od hematokrytu, natomiast ryc. 6 przedstawia zależność czasu relaksacji  $\tau_2$  od hematokrytu. Z wykresów tych wynika, że czasy relaksacji  $\tau_1$  i  $\tau_2$  maleją nieliniowo wraz ze wzrostem hematokrytu.

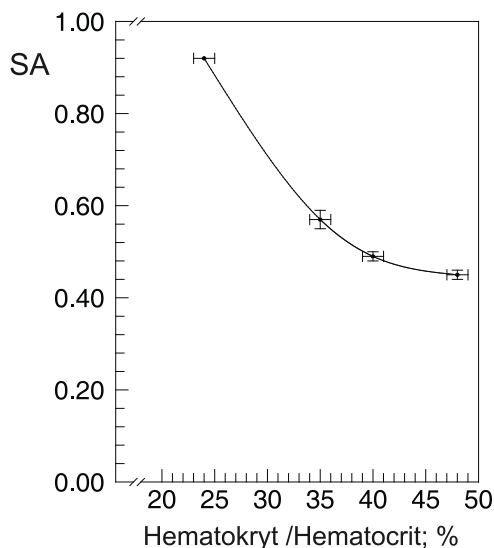


Ryc. 5. Zależność czasu relaksacji  $\tau_1$  od hematokrytu  
Fig. 5. The dependence of relaxation time  $\tau_1$  on hematocrit



Ryc. 6. Wpływ hematokrytu na czas relaksacji  $\tau_2$   
Fig. 6. The influence of hematocrit on relaxation time  $\tau_2$

Ryc. 7 przedstawia zależność stopnia agregacji od hematokrytu, która jest nieliniowa.



Ryc. 7. Zależność stopnia agregacji erytrocytów od hematokrytu

Fig. 7. The dependence of erythrocyte aggregation rate on hematocrit

## OMÓWIENIE

Monitorowanie agregacji erytrocytów z wykorzystaniem zależności przenikalności elektrycznej względnej  $\epsilon_L$  krwi od czasu (lub krócej funkcji  $\epsilon_L(t)$ ) opisali po raz pierwszy Irimajiri i wsp. [7]. Zaobserwowali oni różnicę w przebiegach tej funkcji dla krwi pełnej, zawiesiny erytrocytów w dwukrotnie rozcieńczonym osoczu i zawiesiny erytrocytów w PBS, którą uzasadnili różnicą w stopniu agregacji erytrocytów.

Tę metodę zastosowaliśmy w naszych poprzednich badaniach dotyczących agregacji erytrocytów w różnych środowiskach [10, 11] oraz w badaniach będących przedmiotem prezentowanej pracy. W pierwszym etapie badań (przedstawionych w tej pracy) dokonano analizy odpowiedzi funkcji  $\epsilon_L(t)$  na zmiany czasów relaksacji  $\tau_1$  i  $\tau_2$ . Temu celowi służyły symulacje, których wynik przedstawiono na ryc. 2 i 3. W obliczeniach symulacyjnych przyjęto czas obserwacji równy 250 s jako typowy dla agregacji erytrocytów. Na podstawie ryc. 2 można stwierdzić, że zmniejszanie wartości czasu  $\tau_1$  prowadzi do szybszego przyrostu wartości funkcji  $\epsilon_L(t)$  głównie w pierwszych 30 sekundach. Natomiast z przedstawionego na ryc. 3 przebiegu funkcji  $\epsilon_L(t)$  wynika, że skracanie czasu relaksacji  $\tau_2$  powoduje szybszy przyrost funkcji  $\epsilon_L(t)$  po upływie ok. 30 sekund. Powyższe symulacje potwierdzają fakt, że występujące w równaniu (2) czasy relaksacji  $\tau_1$  i  $\tau_2$  charakteryzują przebieg szybko- i wolno zmienny funkcji  $\epsilon_L(t)$ . Te dwa tempa zmian wartości funkcji  $\epsilon_L(t)$  w odniesieniu do monitorowania agregacji erytrocytów charakteryzują dwa etapy tego zjawiska [7]. Pierwszy z nich to agregacja prosta związana z formowaniem przez erytrocyty rulonów (rouleaux formation), a drugi to agregacja złożona odzwierciedlająca tworzenie form usieciowanych (3D-networks).

Na ryc. 4 przedstawiono przebiegi funkcji  $\epsilon_L(t)$  dla próbek krwi różniących się hematokrytem. Z ich analizy wynika, że wartość przenikalności elektrycznej względnej  $\epsilon_p$  próbek krwi rośnie wraz ze wzrostem hematokrytu (patrz także tabela 1). Uzasadnienie tego wzrostu jest następujące. Przenikalność elektryczna  $\epsilon_p$  odpowiada przenikalności elektrycznej  $\epsilon_L$  próbki

wyznaczanej w momencie wstrzymania przepływu krwi przez komorę pomiarową, a więc w warunkach dezagregacji erytrocytów. Jeśli erytrocyty nie tworzą agregatów to ich zawiesina spełnia założenia teorii Pauly'ego-Schwana [16]. Teoria ta zawiera równania, które znalazły zastosowanie do opisu m.in. zależności przenikalności elektrycznej względnej  $\epsilon$  zawiesiny komórek od częstotliwości pola elektrycznego, którą obserwuje się w zakresie 0,01-100 MHz. Zależność tą można krócej określić jako dyspersję przenikalności  $\epsilon$ , a w celu odróżnienia jej od dyspersji przenikalności  $\epsilon$  obserwowanych w innych zakresach częstotliwości nazwano ją  $\beta$ -dyspersją. Jedno z równań wynikowych tej teorii dotyczy przenikalności  $\epsilon_0$  zawiesiny komórek wyznaczonej dla częstotliwości początkowej zakresu  $\beta$ -dyspersji. Przy pewnych założeniach upraszczających ma ono postać:

$$\epsilon_0 = \epsilon_a + \frac{9vRC_m}{4\epsilon_v} \quad (6)$$

gdzie:  $\epsilon_0$  – przenikalność elektryczna względna zawiesiny komórek wyznaczona dla częstotliwości początkowej  $\beta$ -dyspersji;  $\epsilon_a$  – przenikalność elektryczna względna środowiska zewnątrzkomórkowego;  $v$  – stężenie objętościowe komórek w zawiesinie;  $R$  – promień komórki [m];  $C_m$  – pojemność elektryczna właściwa błony komórkowej [F/m<sup>2</sup>];  $\epsilon_v$  – przenikalność elektryczna bezwzględna próżni ( $\epsilon_v = 8,85 \times 10^{-12}$  F $\times$ m<sup>-1</sup>).

Wynika z niego, że wartość przenikalności elektrycznej  $\epsilon_0$  wzrasta wraz ze wzrostem m.in. stężenia objętościowego komórek w zawiesinie. Ponieważ przenikalność  $\epsilon_p$  wyznaczano dla 100 kHz czyli w początkowym zakresie  $\beta$ -dyspersji, stąd jej wartość zwiększała się wraz ze wzrostem hematokrytu zgodnie z równaniem (6).

Z dalszej analizy ryc. 4 wynika, że w miarę wzrostu hematokrytu zwiększało się tempo narastania wartości  $\epsilon_L$  co świadczyło o skracaniu czasów relaksacji  $\tau_1$  i  $\tau_2$  (patrz również tabela I). Oznacza to, że duża wartość hematokrytu przyspiesza agregację erytrocytów.

Na ryc. 5 i 6 przedstawiono zależności stałych czasowych  $\tau_1$  i  $\tau_2$  od hematokrytu z których wynika, że zależności te są nieliniowe. Do podobnego wniosku doszedł Yamamoto [22], który stosując własny (optyczny) układ pomiarowy wyznaczył czas relaksacji charakteryzujący agregację erytrocytów, którego wartość malała nieliniowo wraz ze wzrostem hematokrytu.

Z danych zawartych w tabeli I wynika, że stopień agregacji erytrocytów wyznaczony ze wzoru (5) maleje ze wzrostem hematokrytu, przy czym zależność ta jest nieliniowa (patrz ryc. 7). Ponieważ stopień agregacji erytrocytów odzwierciedla średnią liczbę komórek w agregacie, a przez to jego rozmiar, oznacza to, że w wyniku wzrostu hematokrytu powstające agregaty erytrocytarne są mniejsze. Można to wyjaśnić na podstawie równania (6) zakładając, w dużym przybliżeniu, że agregaty są sferyczne i mają takie same właściwości dielektryczne jak tworzące je erytrocyty. Z równania (6) wynika, że przenikalność  $\epsilon_0$  jest wprost proporcjonalna do m.in. promienia komórki. Ponieważ wzór zdefiniowanego przez nas stopnia agregacji zawiera w liczniku przyrost przenikalności  $\epsilon_K - \epsilon_p$ , to przyrost ten jest proporcjonalny do przyrostu promienia agregatu. Średnia wartość promienia agregatów rośnie od wartości równej średniemu promieniowi erytrocytów (gdy  $\epsilon_L = \epsilon_p$ ) do wartości równej średniemu promieniowi uformowanych (sferycznych) agregatów (gdy  $\epsilon_L = \epsilon_K$ ). Ujawniona zależność SA od hematokrytu pozostaje w zgodności z zależnością opadu od hematokrytu, którą opisał Fabry [5]. Wykazał on w swojej pracy, że wraz ze wzrostem hematokrytu opad maleje ponieważ

promień agregatów jest odwrotnie proporcjonalny do wartości hematokrytu. Tą zależność ustalił dwoma niezależnymi sposobami; analizując mikrofotografie agregatów oraz obliczając ich promienie ze wzoru Einsteina-Stokesa. Zaobserwowaną przez siebie zależność między promieniem agregatów, a wartością hematokrytu Fabry uzasadnił tym, że formowanie sferycznych agregatów ograniczone jest dostępnością (do powierzchni erytrocytów) fibrynogenu i innych makromolekuł osocza.

## WNIOSKI

W następstwie wzrostu hematokrytu maleją nieliniowo:

1. stopień agregacji SA erytrocytów, co pozostaje w zgodności z zależnością opadu od hematokrytu (ze wzrostem hematokrytu opad maleje),
2. czas relaksacji  $\tau_1$  charakteryzujący rulonizację erytrocytów,
3. czas relaksacji  $\tau_2$  charakteryzujący tworzenie przez erytrocyty ludzkie usieciowanych trójwymiarowych agregatów.

## PIŚMIENNICTWO

1. Asami K., Hanai T.: Dielectric monitoring of biological cell sedimentation. *Colloid Polym. Sci.* 1992, 270, 78. – 2. Baskurt O. K., Uyuklu M., Meiselman H. J.: Time course of electrical impedance during red blood cell aggregation in glass tube: comparison with light transmittance. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2010, 57, 4, 969. – 3. Berliner A. S., Shapira I., Rogowski O., Sadees N., Rotstein R., Fusman R., Avitzour D., Cohen S., Arber N., Zeltser D.: Combined leukocyte and erythrocyte aggregation in the peripheral venous blood during sepsis. An indication of commonly shared adhesive protein(s). *Int. J. Clin. Lab. Res.* 2000, 30, 27. – 4. Chen S., Gavish B., Zhang S., Mahler Y., Yedgar S.: Monitoring of erythrocyte aggregate morphology under flow by computerized image analysis. *Biorheology* 1995, 32, 487. – 5. Fabry T. L.: Mechanism of erythrocyte aggregation and sedimentation. *Blood* 1987, 70, 5, 1572. – 6. Hershovici T., Elishkevitz K., Rotstein R., Fusman R., Zeltser D., Shapira I., Arber N., Avitzour D., Berliner S., Beigel Y.: The erythrocyte adhesiveness/aggregation test to reveal real-time information of rheological relevance in patients with familial and primary hypercholesterolemia before and following plasma exchange. *Ther. Apher.* 2002, 6, 2, 140. – 7. Irimajiri A., Ando M., Matsuoka R., Ichinowatari T., Takeuchi S.: Dielectric monitoring of rouleaux formation in human whole blood: a feasibility study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996, 1290, 207. – 8. James F.: *Minuit, Function Minimization and Error Analysis. Reference Manual.* CERN Program Library Long Writeup D506, CERN Geneva, Switzerland, 1994. – 9. Jaroszyński W., Keslinka E., Terlecki J., Wujtewicz M., Suchorzewska J., Kwiatkowski B.: Metodyka oznaczania stopnia agregacji erytrocytów (in vitro) za pomocą spektroskopii dielektrycznej. *Ann. Acad. Med. Gedan.* 1999, 29, 9. – 10. Jaroszyński W., Keslinka E., Wujtewicz M., Suchorzewska J., Kwiatkowski B.: Badania szybkości agregacji erytrocytów metodą spektroskopii dielektrycznej. *Ann. Acad. Med. Gedan.* 2000, 30, 117.
11. Jaroszyński W., Keslinka E., Wujtewicz M., Suchorzewska J., Kwiatkowski B.: Effect of hydroxyethyl starch (HAES) on degree and kinetics of erythrocyte aggregation studied with dielectric spectroscopy. *Med. Sci. Monit.* 2002, 8, 7, BR272. – 12. Jaroszyński W., Keslinka E., Wujtewicz M., Suchorzewska J., Kwiatkowski B.: Określanie stopnia agregacji erytrocytów w obecności hydroksyetyloskrobii. *Ann. Acad. Med. Gedan.* 2003, 33, 69. – 13. Jaroszyński W., Wujtewicz M., Suchorzewska J., Kwiatkowski B.: Determination of erythrocytes aggregation in the presence of hydroxyethylated starch (HAES). *Polish J. Med. Phys. & Eng.* 1998, 4, 3, 111. – 14. Kitamura H., Sigel B., Machi J., Feleppa E. J., Sokil-Melgar J., Kalisz A., Justin J.: Roles of hematocrit and fibrinogen in red cell aggregation determined by ultrasonic

scattering properties. *Ultrasound Med. Biol.* 1995, 21, 6, 827. – 15. Meiselman H. J., Neu B., Rampling M. W., Baskurt O.: RBC aggregation: Laboratory data and models. *Indian J. Exp. Biol.* 2007, 45, 9. – 16. Pauly H., Schwan H. P.: Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale. *Z. Naturforsch* 1959, 14b, 125. – 17. Pribush A., Meiselman H. J., Meyerstein D., Meyerstein N.: Dielectric approach to the investigation of erythrocyte aggregation: I. Experimental basis of the method. *Biorheology* 1999, 36, 411. – 18. Pribush A., Meiselman H. J., Meyerstein D., Meyerstein N.: Dielectric approach to the investigation of erythrocyte aggregation. II. Kinetics of erythrocyte aggregation - disaggregation in quiescent and flowing blood. *Biorheology* 2000, 37, 429. – 19. Pribush A., Meyerstein D., Meyerstein N.: Study of red blood cell aggregation by admittance measurements. *Biorheology*. 1996, 33, 2, 139. – 20. Sawicki F.: *Elementy statystyki dla lekarzy*, Warszawa: PZWL 1982 s. 112.

21. Turczyński B., Michalska-Malecka K., Słowińska L., Szczęsny S., Romaniuk W.: Nieproliferacyjna retinopatia cukrzycowa a agregacja krwinek czerwonych. *Wiad. Lek.* 2004, 57, 11-12, 634. – 22. Yamamoto M.: Effects of fibrynogen, globulin, albumin and hematocrit on the kinetics of erythrocyte aggregation in man. *Angiology* 1986, 37, 9, 663.

W. Jaroszyński, B. Kwiatkowski, P. Boguś

#### INFLUENCE OF HEMATOCRIT ON RATE AND KINETICS OF HUMAN ERYTHROCYTES AGGREGATION. DIELECTRIC SPECTROSCOPY METHOD RESEARCHES

##### Summary

The paper presents results of the study on the influence of hematocrit on the rate and kinetics of human erythrocytes aggregation with the use of dielectric spectroscopy. The dependence of relative electrical permittivity  $\epsilon_L$  on time, while aggregates were created after starting disintegration (generated by a blood flow), was used in the study on kinetics of erythrocyte aggregation. The experimental results were approximated by Irimajiri equation which describes dependence of  $\epsilon_L$  on time. The values of relaxation times  $\tau_1$  i  $\tau_2$  of different hematocrit blood samples were obtained. They characterize two erythrocyte aggregation phases: simple (rouleaux formation) and creation of net forms (3-D network). It was demonstrated that the values of relaxation times  $\tau_1$  i  $\tau_2$  decrease in a nonlinear way with hematocrit increase. Additionally it was found that together with hematocrit increase aggregation erythrocyte rate decreases in a nonlinear way.

Adres: mgr Witold Jaroszyński

Katedra i Zakład Fizyki i Biofizyki GUMed  
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, tel. (0-58) 349-14-82  
e-mail: wjarosz@gumed.edu.pl