

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И  
БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

На правах рукописи



Генералов Константин Владимирович

**ИЗМЕРИТЕЛЬНО-ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ  
ПАРАМЕТРОВ ЭРИТРОЦИТОВ В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЯХ**

2.2.12 – Приборы, системы и изделия медицинского назначения

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата технических наук

Научный руководитель:

доктор технических наук

Сафатов А. С.

Научный консультант:

доктор медицинских наук,

доцент Кручинина М.В.

Новосибирск – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ. . . . .	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. . . . .	18
1.1 Методы исследования вязкоупругих свойств клеток и аппараты для их реализации. . . . .	18
1.2 Этапы развития метода диэлектрофореза. . . . .	25
1.3 Основы теории диэлектрофореза клетки. . . . .	28
1.4 Основы теории электроориентации и вращения клетки. . . . .	31
Выводы по главе 1 . . . . .	34
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ . . . . .	36
2.1 Перечень оборудования и материалов. . . . .	36
2.2 Методика подготовки эритроцитов и латексных частиц к измерениям. . . . .	38
2.3 Анализ сил действующих на эритроциты в неоднородном переменном электрическом поле. . . . .	39
2.4 Анализ движения эритроцита в неоднородном переменном электрическом поле. . . . .	42
2.5 Алгоритм определения поляризуемости, индуцированного заряда, индуцированного дипольного момента и индуцированной электрической ёмкости эритроцита. . . . .	47
ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА АППАРАТНО-МЕТОДИЧЕСКОЙ БАЗЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАРАМЕТРОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ИЗМЕРИТЕЛЬНО-ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО КОМПЛЕКСА. . . . .	49
3.1 Разработка измерительно-вычислительного комплекса для единовременного измерения параметров эритроцитов в медико-биологических исследованиях и их изучения. . . . .	49
3.2 Разработка конструкции измерительной ячейки. . . . .	52
3.3 Стандартная неопределённость типа Б измерительно- вычислительного комплекса коэффициента поляризуемости эритроцитов. . . . .	56
3.4 Стандартная неопределённость типа А вязкости клеточной суспензии. . . . .	57

3.5 Обоснование выбора объектива микроскопа измерительно-вычислительного комплекса. . . . .	60
3.6 Анализ зависимости динамических вязкоупругих характеристик эритроцита от частоты действующей внешней силы. . . . .	65
3.7 Исследование зависимости скорости поступательного движения эритроцита от его радиуса и градиента квадрата напряжённости неоднородного переменного электрического поля. . . . .	69
3.8 Оценка прироста температуры клеточной суспензии за счёт работы, затраченной электрическим полем на трение между эритроцитом и средой. . . . .	71
3.9 Обоснование времени измерения поступательного движения эритроцита в измерительной камере. . . . .	72
3.10 Программное обеспечения измерительно-вычислительного комплекса. . . . .	75
3.11 Разработка опытного образца государственного эталона величины поляризуемости 1-го разряда. . . . .	82
3.12 Разработка способа определения массы эритроцита. . . . .	84
Выводы по главе 3 . . . . .	91
ГЛАВА 4 НЕЛИНЕЙНАЯ ПОЛЯРИЗУЕМОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ В НЕОДНОРОДНОМ ПЕРЕМЕННОМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ. . . . .	94
Выводы по главе 4. . . . .	106
ГЛАВА 5 ПИЛОТНЫЕ РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ ПОЛЯРИЗУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С УЧЕТОМ ПОЛОВЫХ И ВОЗРАСТНЫХ РАЗЛИЧИЙ. . . . .	107
Выводы по главе 5. . . . .	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ. . . . .	114
ВЫВОДЫ. . . . .	118
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ. . . . .	119
СПИСОК ТЕРМИНОВ. . . . .	121

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. ....	122
ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное) Патент на изобретение № 261435 Способ определения массы микрочастицы в переменном электрическом поле . . . .	137
ПРИЛОЖЕНИЕ Б (справочное) Акт о внедрении измерения массы микрочастицы микронного размера неоднородным переменным электрическим полем. ....	138
ПРИЛОЖЕНИЕ В (справочное) Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ . . . . .	139
ПРИЛОЖЕНИЕ Г (справочное) Удостоверение образца государственного эталона электрической поляризуемости биологических частиц (эритроцитов) . . . . .	140
ПРИЛОЖЕНИЕ Д (справочное) Сертификат калибровки государственного эталона единицы электрической поляризуемости биологических объектов 1-го разряда. . . . .	141
ПРИЛОЖЕНИЕ Е (справочное) Свидетельство об аттестации государственного эталона единицы величины поляризуемости биологических объектов 1-го разряда. . . . .	143
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж (справочное) Сертификат калибровки измерительной ячейки . . . . .	144
ПРИЛОЖЕНИЕ И (справочное) Патент на полезную модель № 174320 измерительная ячейка для диэлектрофоретических исследований. . . . .	146
ПРИЛОЖЕНИЕ К (справочное) Свидетельство № 467-RA.RU.311735-2019 об аттестации первичной методики измерений поляризуемости биочастиц. . . . .	147
ПРИЛОЖЕНИЕ Л (справочное) Алгоритм работы программы. . . . .	148
ПРИЛОЖЕНИЕ М (справочное) Листинг программы. Функция обход контура. . . . .	149

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

В медицинской практике применяются многочисленные методы и измерительные приборы, в которых электрическое поле используется для зондирования и исследования клеток. В комплексе они предоставляют в распоряжение врачей и исследователей ряд различных измеряемых и рассчитываемых параметров клеток, в том числе и эритроцитов. Среди них, например, радиус, объем, концентрация, жёсткость, вязкость, электрическая ёмкость, проводимость и другие. Именно в своей совокупности параметры эритроцитов наиболее точно отражают состояние здоровья пациента. Одномоментное измерение как можно большего числа параметров эритроцитов из одной пробы предоставляют более ценную информацию, чем совокупность отдельных, полученных в разное время.

Одним из свойств эритроцитов, которое они приобрели в процессе эволюции, является непрерывная адаптация к внешним условиям. Эритроциты чутко реагируют на изменения внешних условий. Например, объем, радиус, водно-солевой баланс, напряжённость электрического поля на мембране изменяются в ответ на воздействия со стороны вирусов или бактерий, свойств внешней среды. В результате повторные измерения параметров одних и тех же эритроцитов, степень близости их результатов друг к другу, полученные одним и тем же оператором и методом, на идентичном оборудовании могут не совпадать.

В последнее десятилетие в области медицины все более востребованными становятся методы диэлектрофореза, электроротации, электроориентации эритроцитов и аппаратные комплексы, построенные для практической реализации этих методов [1–3]. Они позволяют в короткие сроки с минимальными материальными и временными затратами измерить ряд параметров эритроцитов и дать ответы на вопросы, которые являются важными для верификации диагноза, своевременной диагностики, правильности определения тактики лечения, ведения пациента, фактически – прогноза для больного [4–6].

В соответствии с Федеральным законом Российской Федерации № 102–ФЗ «Об обеспечении единства измерений», в России с 2008 г. установлены правовые основы обеспечения единства измерений. Согласно указанному закону, сфера государственного регулирования обеспечения единства измерений предусматривает обязательные метрологические требования при осуществлении деятельности в области здравоохранения [7]. Как с позиции метрологии, так и позиции медицины, величины параметров эритроцитов должны приводиться с указанием неопределённости, которая позволяет метрологу быть уверенным, что измерения осуществляются правильно, а врачу давать объективную оценку динамики течения заболевания, эффективности назначенного лечения. Метрологическое обеспечение сложных технических средств, каким является измерительно-вычислительный комплекс (ИВК), предполагает обязательное наличие системы их контроля, калибровки, которые включают: теоретические знания; единые методы и способы измерений; опытно-конструкторские решения и технологические процедуры.

### **Степень разработанности темы исследования**

В настоящее время в клинко-диагностических лабораториях для исследования параметров эритроцитов используют гематологические анализаторы, использующие импедансный метод подсчёта (известный также как счетчик Коултера), позволяющие анализировать перечень показателей клеток крови: количество эритроцитов, уровень гемоглобина, средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (MCH), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроцитах (MCHC), гематокрит (Hct), коэффициент вариации объема эритроцитов (RDW), распределение эритроцитов по объёму [8]. Среди приведённых параметров отсутствуют те, которые характеризуют вязкоупругие характеристики клеток красной крови.

В научных целях используется ряд методов и устройств исследования вязкоупругих характеристик эритроцитов. Одним из них служит метод втягивания части мембраны эритроцита в микропипетку [9; 10], который, однако, не даёт полного представления о вязкости клетки и является достаточно

трудоёмким для получения статистически достоверного результата для каждого пациента.

Другим способом определения упругости клетки красной крови является метод атомной силовой микроскопии (Grimellec С.,1998). Для определения упругости клетки производят микроскопию одной и той же клетки с различным давлением датчика на нее и измеряют изменение высоты поверхности клетки. Недостатком этого способа является также большая трудоёмкость измерения для получения статистически достоверного результата.

Для измерения локальных упругих характеристик клетки применяется способ использования оптического пинцета, описанный Guillaume L. (2001). Метод заключается в том, что на поверхности клетки приклеиваются кварцевые бусинки, затем к этим бусинкам прикладывается контролируемая диэлектрофоретическая сила и измеряется смещение положения бусинок. Отношение силы прикладываемой к бусинкам к величине деформации позволяет определить упругость отдельных областей клетки.

Известен способ и устройство для измерения вязкоупругих характеристик клетки, например, форменных элементов крови в электрическом поле, создаваемым высокочастотным генератором в последовательности электродов [73]. Этот способ включает стадии: пропускание суспензии клеток через рабочий объем камеры с последовательно установленными в ней электродами, наложение неоднородного переменного электрического поля на суспензию, компьютерное распознавание размеров и формы клеток притянувшихся к электроду, расчёт силы растягивающей клетку по модели проводящего эллипсоида. Недостатком описанного способа является низкая точность измерения жёсткости и вязкости клетки, обусловленная погрешностью при расчёте растягивающей силы по модели проводящего эллипсоида и погрешностью, связанной с тем, что клетка имеет непосредственный контакт с поверхностью электрода. Это изменяет физиологическое состояние мембраны клетки. Кроме того, этот способ имеет малую производительность процесса измерения вязкоупругих характеристик клетки.

**Цель работы**

Разработка измерительно-вычислительного комплекса для одномоментного изучения совокупности параметров эритроцитов человека в медико-биологических исследованиях.

**Задачи исследования:**

1. Составить и решить дифференциальное уравнение поляризуемости эритроцита в неоднородном переменном электрическом поле.

2. На основании решений дифференциального уравнения поляризуемости эритроцита в неоднородном переменном электрическом поле разработать измерительно-вычислительный комплекс для изучения параметров эритроцитов в медико-биологических исследованиях.

3. На базе измерительного вычислительного комплекса:

а) разработать способ определения массы отдельно наблюдаемого эритроцита в неоднородном переменном электрическом поле;

б) создать программное обеспечение одномоментного измерения совокупности параметров эритроцита человека;

в) разработать опытный образец государственного эталона электрической поляризуемости 1-го разряда;

г) исследовать пилотные референтные значения поляризуемости эритроцитов человека с учётом половых и возрастных различий.

**Объект исследования:** совокупность параметров эритроцитов, измеренных одномоментно.

**Предмет исследования:** измерительно-вычислительный комплекс для изучения параметров эритроцитов в медико-биологических исследованиях.

**Научная новизна:**

1. Впервые разработан измерительно-вычислительный комплекс для одномоментного исследования совокупности электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов.

На базе измерительно-вычислительного комплекса впервые:



2. Разработано программное обеспечение «Определение параметров эритроцитов с помощью неоднородного переменного электрического поля» свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2016618155 (см. приложение В).

3. Разработан способ определения массы микрочастицы, частицы микронного размера с помощью измерительно-вычислительного комплекса – патент на изобретение № 261435 (см. приложение А).

4. Создан опытный образец государственного эталона электрической поляризуемости биологических частиц, аттестован государственный эталон единицы величины электрической поляризуемости биологических объектов 1-го разряда (удостоверение государственного эталона физической величины поляризуемости, сертификат калибровки, свидетельство об аттестации государственного эталона единицы электрической поляризуемости (см. приложения Г, Д, Е). Государственный эталон электрической поляризуемости биологических объектов 1-го разряда позволит создать метрологическую систему передачи величины поляризуемости в России.

6. Экспериментально доказана и теоретически обоснована нелинейность поляризации эритроцита путём анализа частоты его вращения вокруг собственной оси в неоднородном переменном электрическом поле. Впервые установлено, что нелинейная поляризация эритроцитов человека возникает после превышения трансмембранного потенциала клетки 26,2 мВ.

7. Определены пилотные референтные значения поляризуемости эритроцитов человека с учётом половых и возрастных различий с использованием разработанных подходов.

### **Практическая ценность и реализация результатов работы**

Государственный эталон электрической поляризуемости биологических объектов 1-го разряда позволит реализовать метрологическую систему передачи величины поляризуемости в России (см. приложение Г.)

Программное обеспечение «Определение параметров эритроцитов с помощью неоднородного переменного электрического поля» является

неотъемлемой частью первичной методики измерений (ПРМИ) поляризуемости биочастиц (эритроцитов). Свидетельство № 467-RA.RU.311735-2019 (см. приложение К).

Полученные в диссертационной работе результаты используются при проведении научных исследований в Научно-исследовательском институте терапии и профилактической медицины – филиале Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», ООО «Центр профилактики тромбозов».

Внедрение измерительно-вычислительного комплекса исследования эритроцитов неоднородным переменным электрическим полем в практику позволит:

- а) осуществлять измерения массы эритроцитов, частиц микронного размера, диспергированных в жидкость, с минимальными временными и материальными затратами;
- б) изучать влияния биологических, физических и химических воздействий на эритроциты с учётом их нелинейных свойств.

Пилотные референтные значения поляризуемости эритроцитов помогут врачам оптимизировать и индивидуализировать диагностику и лечение заболеваний человека.

## Методы исследования

В диссертационной работе использовались теоретические и экспериментальные исследования, методы численного анализа и статистической обработки результатов.

## Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный измерительно-вычислительный комплекс для одномоментного измерения и изучения параметров эритроцитов в медико-биологических исследованиях, в состав которого входят генератор переменного напряжения; усилитель переменного напряжения, измерительная ячейка, микроскоп с комплексом визуализации, компьютер, осциллограф. В предложенной конструкции измерительной ячейки контактные площадки электродов в области подключения к электрическому разъёму покрыты золотом, расстояние между электродами составляет 150 мкм, ширина электродов не менее 4–5 мм. Конструкция электродов и измерительной камеры позволяет сформировать область поля в измерительной камере со стабильными пространственными характеристиками неоднородного переменного электрического поля и минимизировать влияние переходного сопротивления на участке электрод измерительной камеры - электрический разъем со стороны генератора напряжения, индуцированных объёмных зарядов клеток друг на друга.

2. Измерительно-вычислительный комплекс определяет и производит расчет следующих параметров клетки:

–  $m_{\text{кл}}$  – массы клетки, стандартная неопределенность типа Б (СНБ) для клетки с массой  $2,4 \times 10^{-13}$  кг не превышает 4,4 %;

–  $r_{\text{кл}}$  – радиуса клетки в диапазоне от 2 до  $5 \times 10^{-6}$  [м], СНБ для клетки с радиусом 3,8 мкм составляет не более 6,8 %;

–  $v_{\text{кл}}$  – скорости движения клетки  $10^5$ – $10^4$  [м/с], СНБ для клетки с радиусом 3,8 мкм составляет не более 1,1 %;

–  $\alpha_{\text{кл}}$  – коэффициента объёмной поляризуемости клетки (эритроцита) в диапазоне  $10^{-16}$ – $10^{-13}$  [ $\text{м}^3$ ], СНБ для клетки с радиусом 3,8 мкм не превышает 17,3 %;

–  $\tau_{\text{рел}}$  – расчётного времени релаксации [с] ( $\tau_{\text{изм}}$  – время измерения параметров клетки выбирается в диапазоне  $\tau_{\text{изм}}$  от 5 до 10 с);

–  $x_{\text{кл}}$  – амплитуды деформации клетки в диапазоне  $1,2 \times 10^{-6}$  –  $3,0 \times 10^{-6}$  [ $\text{м}$ ], СНБ для клетки с радиусом 3,8 мкм составляет не более 6,8 % ( $dr_{\text{кл}}$  – разрешимое расстояние объектива микроскопа не менее 0,26 мкм).

3. Разработанное программное обеспечение для ЭВМ «Определение параметров эритроцитов с помощью неоднородного переменного электрического поля», позволяющее одномоментно определять совокупность параметров клетки.

4. Нелинейная поляризация эритроцитов человека возникает после превышения трансмембранного потенциала клетки 26,2 мВ. Разработан эталон единицы измерения поляризуемости на основе сферических частиц из полистирола ОГС–09ЛМ со средним диаметром  $6,0 \times 10^{-6}$  м утвержденного типа ГСО 10050–2011. Пилотные референтные значения поляризуемости эритроцитов в частотном диапазоне  $(0,05 \div 1,00) \times 10^6$  Гц с учётом половых и возрастных различий находятся в пределах от  $-1,2 \times 10^{-14}$  до  $2,3 \times 10^{-14}$   $\text{м}^3$ .

5. Разработан способ определения массы эритроцита на основании данных о радиусе клетки, частоте и амплитуде ее колебания между электродами, скорости ее возвратно-поступательного движения.

**Достоверность результатов, выводов и научных положений диссертационной работы подтверждается** экспериментальными исследованиями; согласованностью экспериментальных и теоретических результатов между собой, их соответствием фундаментальным законам поляризации и теории электродинамики сплошных сред; публикациями результатов в рецензируемых научных изданиях и их обсуждением на Российских и международных конференциях; апробацией и внедрением измерительно-вычислительного комплекса в практическую медицину, метрологию;

использованием современных методов статистической обработки результатов исследований, отвечающих поставленным задачам.

### **Апробация работы**

Результаты работы докладывались на международных и отечественных конференциях: на практической конференции «Проблемы и пути совершенствования гражданской обороны в субъектах Российской Федерации Сибирского федерального округа» (Новосибирск, 2012); на первом Международном Форуме технологического развития «Технопром–2013» (Новосибирск, 2013); Medical Biodefense Conference (Munich, 2013); на Международном Форуме Технологического развития «ТЕХНОПРОМ–2014» и 8-й Сибирской венчурной ярмарке (Новосибирск, 2014); International Aerosol Conference (Korea, 2014); на 2-й международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины в современных условиях» (Санкт-Петербург, 2015); на 5-й Всероссийской конференции «Проблемы метрологического обеспечения в области здравоохранения и производства медицинской техники» (Сочи, 2015); на 13-м Всероссийском Конгрессе с международным участием «Профессия и здоровье» (Новосибирск, 2015); на Всероссийской выставке «Точные измерения – основа качества и безопасности» (Москва, 2016); на 13-й международной научно-технической конференции по актуальным проблемам электронного приборостроения (Новосибирск, 2016); на 12-й ежегодной международной конференции по информационным технологиям и информатике (Афины, 2016); на 7-й Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы радиофизики» (Томск, 2017); на 8-й Всероссийской научно-технической конференции «Проблемы метрологического обеспечения в здравоохранении и производстве медицинской техники» (Сочи, 2018); на 21-м Международном медицинском Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро–2019» и 21-м Съезде Научного общества гастроэнтерологов России (НОГР) (Санкт-Петербург, 2019); на Секции молодых учёных Российской научно-практической конференции, посвящённой 40-летию

НИИ онкологии Томского НИМЦ «Фундаментальная и клиническая онкология: достижения и перспективы развития» (Томск, 2019).

### **Внедрение результатов и рекомендации по их использованию**

Разработанный в диссертационной работе измерительно-вычислительный комплекс исследования клеток используется: в Научно-исследовательском институте терапии и профилактической медицины – филиале Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (разработка новых медицинских технологий: «Способ диагностики резистентной артериальной гипертензии методом диэлектрофореза эритроцитов» (2014), «Способ комплексной оценки степени фиброза печени: сопоставление оптического метода исследования эритроцитов и непрямой эластометрии печени» (2016); «Способ диагностики нарушений реологии у больных сахарным диабетом 2 типа» (2016); «Метод оценки степени тяжести гемореологических нарушений у больных кардиологического профиля (2018); – в Центре профилактики тромбозов г. Новосибирска; в учебном процессе кафедры пропедевтики внутренних болезней, факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки врачей Новосибирского государственного медицинского университета (ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России); в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, пос. Кольцово, Новосибирской области для исследования вирус-клеточного взаимодействия; в Федеральном государственном унитарном предприятии Сибирском научно-исследовательском институте метрологии для организации государственной системы поверки лабораторных измерительных комплексов физической величины поляризуемости медицинского назначения.

Результаты работы могут использоваться учреждениями занимающиеся диагностикой заболевания человека.

### **Связь работы с научными программами, темами**

Диссертационная работа обобщает результаты научных исследований, выполненных в рамках реализации мероприятий федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.:

– «Разработка метода неинвазивной диагностики и оценки эффективности лечения диффузной патологии печени». Контракт № 8041/1 от 30 ноября 2012 г. между Министерством образования и науки Российской Федерации, Российской академией медицинских наук и Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научно-исследовательский институт терапии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук;

– Комплекс работ, выполненных в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 гг.)»: «Разработка комплекса средств индикации патогенных биологических агентов для оснащения мобильных постов контроля окружающей среды». Контракт № 52–Д/1 от 26 июня 2012 г.;

– «Разработка и апробация систем обнаружения возбудителей особо опасных бактериальных и вирусных инфекций на основе модуля индикации патогенных биологических агентов». Контракт № 25–Д/1 от 9 сентября 2013 г.;

– Государственная подпрограмма «Развитие системы технического регулирования, стандартизации и обеспечения единства измерений» ГК № 120-108 от 13 мая 2015 г. «Разработка государственного стандарта для метрологического обеспечения биофизических измерений» (Шифр «Биофизик»);

– Государственная программа «Эпидемиологический мониторинг состояния здоровья населения и изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространённых терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их диагностике, профилактике и лечению» ГЗ № 0324-2018-0001, рег. № АААА-А17-117112850280-2 (2018–2022 гг.).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 33 печатных работы, из них 4 – в изданиях из списка ВАК, 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международной базе данных Scopus/Web of Science, 6 патентов на изобретение РФ, одно свидетельство о государственной регистрации программы ЭВМ.

### **Структура и объем работы**

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка терминов, списка литературы, состоящего из 132 наименований; содержит 27 рисунков; 13 таблиц, десять приложений и изложена на 150 страницах машинописного текста.

### **Личный вклад автора**

Автору принадлежит идея анализа вращения эритроцитов вокруг собственной оси как доказательство нелинейной поляризации в неоднородном переменном электрическом поле (НПЭП), использования измерительно-вычислительного комплекса для измерения массы поляризуемых частиц микронного размера с помощью НПЭП. Автором произведена интерпретация полученных результатов, подготовка материалов к публикации в отечественных и зарубежных изданиях, разработка программы анализа результатов поведения клетки в НПЭП и его регистрации в государственных органах. Автором лично представлены полученные результаты на международных и Российских конференциях и конгрессах.

### **Благодарности**

Автор благодарит коллег, принимавших участие в экспериментальных и теоретических исследованиях, анализе и обсуждении полученных результатов, поиске литературы. Среди них – Федеральное государственное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора: Г. А. Буряк, Ю. Н. Мистюрина; ООО «Центр профилактики тромбозов» г. Новосибирска – канд. мед. наук А. А. Громова; Федеральное государственное унитарное предприятие Сибирский научно-исследовательский



институт метрологии – канд. техн. наук Г. В. Шувалова, канд. физ.-мат. наук. Е. С. Коптева. Автор выражает признательность и благодарит д-ра техн. наук А. С. Сафатова и д-ра мед. наук, доцента М. В. Кручинину за руководство работой.

## ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Методы исследования вязкоупругих свойств клеток и аппараты для их реализации

В настоящее время в клиничко-диагностических лабораториях для исследования параметров эритроцитов используют гематологические анализаторы, использующие импедансный метод подсчёта (известный также как счётчик Коултера), позволяющие анализировать перечень показателей клеток крови: количество эритроцитов; уровень гемоглобина; средний объем эритроцитов (MCV); среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (MCH); среднюю концентрацию гемоглобина в эритроцитах (MCHC); гематокрит (Hct); коэффициент вариации объёма эритроцитов (RDW); распределение эритроцитов по объёму. Среди приведённых параметров отсутствуют те, которые характеризуют вязкоупругие характеристики клеток красной крови.

В научных целях используется ряд методов исследования вязкоупругих характеристик эритроцитов. Среди известных методов исследования деформируемости эритроцитов наибольшее распространение получили микропипеточные, эктацитометрические и фильтрационные. Кроме того, известны и другие методы, оценивающие данный показатель опосредованно, косвенно.

Наиболее объективным и теоретически обоснованным является микропипеточный метод [8], суть которого заключается в аспирации эритроцитов в микропипетку диаметром 3–4 мкм или около 1 мкм. Деформируемость эритроцитов оценивают по модулю эластичности мембраны, определяемому по величине отрицательного давления и размерам аспирируемой части клетки. Это «идеальный» метод для изучения влияния нарушений вязкостно-эластичных свойств мембраны на деформируемость эритроцитов. Однако с его помощью можно оценить данное свойство только лишь одного или нескольких

эритроцитов, что серьёзно ограничивает его возможности и широкое применение в практике [9; 10].

Эктацитометрический метод базируется на образовании дифракционной картины – паттерна после прохождения луча гелионеонового лазера через суспензию эритроцитов. Форма паттерна определяется деформабельными свойствами эритроцитов [11; 12]. Нормальные эритроциты при малых напряжениях сдвига имеют паттерн в форме концентрических окружностей, а при больших – в виде эллипсоида. Способность эритроцитов к деформации оценивается по изменению соотношения вертикальных и горизонтальных размеров паттерна [9]. Для жёстких эритроцитов оно изменяется незначительно. Для достижения необходимых значений напряжения сдвига, как правило, используются ротационные вискозиметры, внутренний и внешний цилиндры которых сделаны из прозрачного материала. Эктацитометрия в большей степени отражает нарушения деформируемости эритроцитов, обусловленные повышением внутриэритроцитарной вязкости [9]. Применяется также эктацитометрический метод исследования деформируемости эритроцитов, основанный на оценке изменения дифракционного паттерна, образующегося после прохождения монохроматических когерентных световых лучей ( $\lambda = 850$  нм) через ламинарный поток суспензии эритроцитов в термостатируемых условиях. Данный способ не требует получения суспензии эритроцитов. Индекс деформируемости эритроцитов определяется по величине горизонтальных и вертикальных размеров дифракционного паттерна. Уменьшение индекса деформируемости эритроцитов при измерении данным способом отражает ухудшение способности эритроцитов к деформации. Недостатками данного метода являются трудоемкость, неоднозначность при интерпретации полученных результатов, которые следует анализировать с учетом клинической картины и морфологии клеток.

Существуют приборы для таких измерений. Это лазерные эктацитометры ЛОРКА (Голландия) Реоскан (Корея), ЛАДЭ (Реомедлаб, Россия). Однако пока эти приборы недоступны для широкой клинической практики. Актуальна

проблема стандартизации этих приборов, повышения надёжности и точности измерений.

Ещё один важный аспект проблемы заключается в том, что в крови любого человека разные эритроциты обладают разной способностью к деформации. С этой точки зрения деформируемость следует рассматривать как статистическую характеристику ансамбля эритроцитов и использовать для её описания такие понятия как среднее значение, дисперсия, функция распределения и т.п. В принципе, эти параметры можно измерять методом прямого наблюдения за эритроцитами в сдвиговом потоке [13; 14]. Однако этот метод труден в реализации.

В нескольких работах ставилась задача измерения статистических характеристик деформируемости эритроцитов методом лазерной эктацитометрии. В работах [15–17] предложено определять долю слабдеформируемых эритроцитов в образце крови, измеряя интенсивность света в некоторой точке дифракционной картины как функцию сдвигового напряжения. В работе [18] обсуждается возможность измерения среднего значения и дисперсии деформируемости эритроцитов в предположении о том, что эритроциты имеют гауссово распределение по деформируемости. В работе [19] показано, что путём анализа дифракционной картины для бимодального ансамбля эритроцитов можно измерить долю слабо деформируемых эритроцитов, если при данном сдвиговом напряжении известны дифракционные картины для обеих компонент ансамбля. В работе [20; 21] предложена многопараметрическая модель, позволяющая промоделировать рассеяние лазерного пучка бимодальным по деформируемости ансамблем эритроцитов при произвольном сдвиговом напряжении.

В работах Nikitin S. Yu. et al. [22] проведено теоретическое моделирование рассеяния лазерного излучения клетками крови и на этой основе разработаны новые алгоритмы обработки данных. Предложены два таких алгоритма: алгоритм характеристической точки и алгоритм кривизны линии изоинтенсивности. Эти алгоритмы проверены экспериментально на специально подготовленных образцах крови крыс. Эти результаты относятся к периферической части дифракционной

картины, лежащей вблизи первого минимума интенсивности рассеянного света. В этой области интенсивность рассеянного света  $I$  примерно на порядок меньше интенсивности центрального дифракционного максимума  $I(0)$ . В работе Никитина С. Ю. и соавт. [23] была рассмотрена центральная часть дифракционной картины, определяемая условием  $(0,4 \leq I/I(0) \leq 0,6)$ . В этой работе получено уравнение, связывающее между собой дисперсию деформируемости эритроцитов и геометрические параметры дифракционной картины. Достоинством этого уравнения является то, что оно не содержит энергетических параметров. Это существенно упрощает процедуру измерений. Однако анализ, проведённый в работах [24–26], ограничен случаем ансамбля эритроцитов с симметричным распределением по деформируемости.

Как уже отмечалось выше, одним из наиболее удобных методов измерения деформируемости эритроцитов является лазерная дифрактометрия эритроцитов в сдвиговом потоке (эктацитометрия). Существуют разные типы эктацитометров. Общим для этих приборов является то, что деформация эритроцитов осуществляется силами вязкого трения, а информация о форме частиц извлекается из дифракционной картины, возникающей при рассеянии лазерного пучка на суспензии эритроцитов.

В ротационном эктацитометре сильно разбавленную суспензию эритроцитов заливают в зазор между стенками двух прозрачных коаксиальных стаканов, один из которых неподвижен, а другой может вращаться со ступенчато изменяемой угловой скоростью (так называемая ячейка Куэтта). Вращение подвижного стакана вызывает течение жидкости и появление в ней сдвиговых напряжений, которые ориентируют эритроциты определённым образом и вытягивают их в направлении потока. Для наблюдения за изменением формы частиц суспензию просвечивают лазерным пучком. Пучок рассеивается на эритроцитах и даёт на экране наблюдения дифракционную картину, которая содержит в себе информацию о форме исследуемых частиц. При малых скоростях вращения подвижного стакана центральное дифракционное пятно имеет круглую форму, а при больших скоростях оно становится близким к эллиптическому, что

свидетельствует о выстраивании эритроцитов в сдвиговом потоке и вытягивании их в направлении потока под действием сил вязкого трения.

Дифракционную картину снимают на видеокамеру и в цифровом виде передают в компьютер, где она обрабатывается по определённому алгоритму. Обычная процедура обработки данных состоит в следующем. Компьютер выбирает на экране наблюдения точки, в которых интенсивность рассеянного света имеет некоторое определённое значение. Эти точки образуют линию, называемую линией изоинтенсивности. Как правило, эту линию выбирают на периферии центрального дифракционного максимума. Затем линию изоинтенсивности аппроксимируют эллипсом. Измеряют большую (L) и малую (S) полуоси эллипса и вычисляют параметр  $DI = (L-S)/(L+S)$ , называемый параметром (индексом) деформируемости (DI – Deformability Index) эритроцитов. Такие измерения повторяют при нескольких скоростях вращения подвижного стакана. В результате получают зависимость параметра деформируемости эритроцитов от сдвигового напряжения – так называемую функцию деформируемости или кривую деформируемости эритроцитов. Эта кривая выглядит по-разному для разных образцов крови. В частности, у пациентов с острым нарушением мозгового кровообращения деформируемость эритроцитов заметно ниже, чем у здоровых людей такого же возраста. В этом и в других случаях лазерная эктацитометрия эритроцитов позволяет выявить реологическое нарушение, оценить его степень и подобрать адекватное лечение. Подобные анализы необходимы при серповидно-клеточной анемии, наследственном сфероцитозе и малярии. В последние годы появляется все больше свидетельств того, что контроль деформируемости эритроцитов необходим при лечении таких социально значимых заболеваний как ишемия, артериальная гипертония и сахарный диабет. Достоинствами лазерной эктацитометрии по сравнению с другими методами измерения деформируемости эритроцитов являются простота, быстрота измерений и обработки данных, возможность получения данных сразу для больших ансамблей частиц при использовании минимальных количеств крови (2–3 микролитра).

Лазерная эктацитометрия эритроцитов была предложена в 1975 году Бессис и Мохандас [27; 28], и с тех пор используется без существенных изменений, позволяя измерять лишь среднюю деформируемость эритроцитов в исследуемом образце крови. Однако в крови здорового, а тем более больного человека, разные эритроциты имеют разную способность к деформации. Это даёт основание рассматривать деформируемость как статистическую характеристику ансамбля эритроцитов и использовать для её описания такие понятия как функция распределения, среднее значение, дисперсия и т. п.

В основе фильтрационных методов лежит изучение прохождения эритроцитов через поры фильтра. При этом создаётся модель, весьма близкая к естественным условиям микроциркуляции [29; 30]. Благодаря сравнительной простоте, общедоступности и относительной быстроте измерений данная группа методов значительно чаще применяется в экспериментальных лабораториях [11]. Впервые в 1967 г. P. Teitel [31] на бумажных и M. I. Gregersenetal [32] на поликарбонатных фильтрах предложили изучать фильтруемость эритроцитов. Для этих целей используются фильтры с диаметром пор 3–6 и 20–40 мкм. Последние получили менее широкое распространение, так как их применение отражает в большей степени агрегационные свойства эритроцитов [33] и требует использования эритроцитарных суспензий с большим гематокритным числом (60–90 %) [34], что соответственно требует больших объёмов крови для исследования. Фильтрационный метод позволяет учитывать влияние всех факторов на деформируемость эритроцитов, и особенно формирующих клеточную геометрию [10]. Измерение фильтруемости эритроцитов через поры диаметром 2–6 мкм более чувствительно к нарушению «клеточной геометрии», а через поры диаметром 6–9 мкм – к повышению клеточной вязкости [35; 36].

Для проведения исследования необходимо отделить эритроциты от других форменных элементов крови, и прежде всего от лейкоцитов, которые в десятки раз хуже фильтруются, чем эритроциты [37]. Определение деформируемости эритроцитов выполняется в различных режимах: при постоянном градиенте давления либо при постоянной скорости фильтрации. В первом случае критерием

деформируемости эритроцитов является величина возникающего давления [38], во втором – отношение эритроцитов, прошедших через фильтр, к их исходному числу или значение определённого объёма суспензии эритроцитов, прошедшего через поры фильтра в единицу времени [39]. Подавляющее количество методов, описанных в литературе, основано на последнем принципе. Его недостатком является необходимость использования больших объёмов крови, трудность точного определения времени фильтрации, особенно при использовании эритроцитарных суспензий с низким гематокритом, когда время фильтрации составляет всего несколько секунд [10].

Методы, основанные на регистрации давления при постоянной скорости фильтрации, являются более предпочтительными, так как их применение позволяет непрерывно контролировать процесс фильтрации, использовать суспензии эритроцитов с малой величиной гематокрита. Это существенно уменьшает объём крови, необходимый для исследования, снижает вероятность загрязнения суспензии лейкоцитами и закупорку пор фильтра [40]. Учитывая влияние температуры на гемореологические свойства, необходимо проводить измерение деформируемости эритроцитов в термостатированных условиях (в физиологическом диапазоне температур) [26; 30].

Teitel P. предложена методика определения деформируемости эритроцитов, основанная на регистрации давления, возникающего при прохождении с постоянной скоростью буфера и суспензии эритроцитов (1 %) через поры фильтра [31]. В описанном устройстве использовался трековый фильтр, представляющий собой лавсановую плёнку толщиной 16 мкм с диаметром пор 4 мкм [11]. Регистрируется давление, развивающееся при его прохождении через фильтр, величина пика кривой «давление от времени» зависит от способности эритроцитов к деформации. Величина индекса деформируемости эритроцитов рассчитывалась по отношению величин давления суспензии эритроцитов к давлению фильтрации буфера. Его увеличение в данном методе отражает ухудшение деформируемости эритроцитов.



Таким образом, в клинической практике используют устройства, определяющие морфологические характеристики клеток красной крови. Используемые в научных целях методы и устройства позволяют определить ограниченное число функциональных параметров эритроцитов. Внедрение их в клинику затруднено трудоёмкостью, низкой пропускной способностью, отсутствием стандартизованных методик по определению показателей. Остается актуальной проблема разработки измерительных устройств, которые одновременно позволят определить перечень структурно-функциональных параметров эритроцитов, в том числе тех, которые не доступны для определения рутинными методами (масса клетки, поляризуемость, амплитуда деформации и другие).

## **1.2 Этапы развития метода диэлектрофореза**

В 1978 г. профессор физики университета Оклахомы США Herbert Ackland Pohl обобщил и опубликовал материалы многолетних теоретических и экспериментальных исследований феномена поведения нейтральных материалов в неоднородном переменном электрическом поле (НПЭП) [41]. Автор отметил, что исследования в этом направлении имеют своим истоком научные идеи, заложенные открытиями Фарадея, Максвелла, Дебая. Некоторые исследователи феномен поступательного движения частиц в НПЭП ассоциировали с именем Н. Pohl, называя его «диполофорез» [42]. Со временем в научной литературе термин «диэлектрофорез» стал использоваться для описания лишь поступательного движения частиц в НПЭП.

В середине прошлого века работы по исследованию реакции клеток на внешнее электрическое поле проводились достаточно широко как за рубежом, так и в нашей стране. В Ленинградском государственном университете, в институте биофизики РАН в Пущино-на-Оке Мирошников А. И., Иванов А. Ю., Фомченков В. М. изучали свойства клеток, бактерий и электрофизический анализ их разделения. Отечественные исследователи Пастушенко В. Ф., Кузьмин П. И.,

Чизмаджев Ю. А. создали диэлектрофорез и электровращение клеток как единую теорию для сферически симметричных клеток с произвольной структурой мембраны [43–46]. Подобную теорию диэлектрофореза и электроротации опубликовал и Jones T. B. [47]. Schwan H. P. и Foster K. R. исследовали свойства биологических тканей, макромолекул и клеточные мембраны в диапазоне частот от крайне низких до сверхвысоких [48]. Диэлектрические свойства указанных биологических объектов рассматривались ими с позиции наблюдаемых эффектов релаксации. Понимание диэлектрических характеристик клетки позволили ряду авторов обратиться уже к прикладным разработкам. Так, Markx G. H., Talary M. S., Pethig R. использовали диэлектрофорез разделения живых и не живых дрожжей [49]. Hughes M. P., Morgan H. показали возможность осуществлять манипуляцию субмикронными частицами, вирусами [50]. Krueger M., и Thom F. изучали деформацию эритроцитов при воздействии высокочастотных полей при температуре, близкой к нулю градусов по Цельсию [51]. Работа имела практическую цель – увеличить срок хранения крови.

Pethig R., Markx G.H. в 1998 г. запатентовали аппаратуру для выполнения сепарации биочастиц, используя неоднородное переменное электрическое поле (диэлектрофорез) [52].

В совокупности перечисленные фундаментальные и другие многочисленные прикладные работы явились заметной вехой в развитии методов применения НПЭП в области исследования свойств клеток и послужили ориентиром для ряда научных коллективов [53–60].

В 1981 г. U. Zimmermann опубликовал работу [61] о вращении клетки в переменном электрическом поле, которая дала импульс к исследованию этого феномена в биологии. Лишь к концу 20-го века накопленные фундаментальные результаты в области физики поляризации диэлектриков, межмолекулярных взаимодействий, а также совокупность результатов экспериментальных наблюдений за поведением частиц в электрических полях позволили создать теорию вращения частиц в электрическом поле [62–65]. Явления поворота и вращения эритроцитов в электрическом поле относительно собственной оси

приобрели устойчивые научные термины – электроориентация и электроротации [66; 67].

В настоящее время диэлектрофорез, электрофорез и электроротации широко используются для:

- оценки жизнеспособности бактерий и дрожжевых клеток в микробиологии, паразитологии [68; 69];
- исследования лекарственных веществ [69];
- исследования вирус-клеточного взаимодействия [72; 73];
- изучения свойств человеческих лейкоцитов [74; 75];
- разработки методов диагностики заболеваний человека [76–78];
- исследования зависимости параметров клеток, частиц от внешних условий, воздействия электрического поля и др. [79–86];
- разделения, манипуляции частицами [87–93], а также – в области токсикологии [70].

Интенсивно развивается новое научное направление, связанное с разработкой и созданием биочипов, в которых управление микропотоками (microfluidic) крови и биочастиц осуществляется с помощью неоднородного переменного электрического поля [94–99].

С учётом указанных достижений в области практической медицины с нарастающим масштабом проводятся исследования и измерения ряда параметров эритроцитов, которые были не доступны для рутинных исследований традиционными методами. Среди них следует отметить:  $\alpha_{\text{кл}}$  – поляризуемость эритроцитов [ $\text{м}^3$ ];  $c_{\text{кл}}$  – жёсткость эритроцитов [ $\text{Н/м}$ ];  $\eta_{\text{кл}}$  – вязкость эритроцитов [ $\text{Па}\cdot\text{с}$ ];  $f_p$  – равновесную частоту [ $\text{Гц}$ ];  $C_m$  – ёмкость мембраны [ $\text{Ф}$ ] и др. Эти параметры уже используются в современной медицине в процессе постановки диагноза, оценки динамики течения заболевания и др. [76; 77].

Вместе с тем возникает необходимость измерения таких характеристик, как масса, величина которой напрямую коррелирует с объёмной поляризуемостью клетки; нелинейность величины поляризуемости эритроцитов в неоднородном переменном электрическом поле; поляризуемости эритроцитов в неоднородном

переменном электрическом поле; кроме того, существует потребность создания эталона единицы поляризуемости эритроцитов; разработки референтных значений этого показателя с учётом возрастных и гендерных различий, метрологической проработки параметров клеток.

С этой целью необходимо разработать измерительно-вычислительный комплекса для одномоментного измерения совокупности параметров эритроцитов в медико-биологических исследованиях, их изучения и создания новых способов измерений характеристик клеток.

### 1.3 Основы теории диэлектрофореза клетки

В объеме сферической клетки (частицы) с радиусом  $r_{кл}$  и относительной диэлектрической проницаемостью  $\epsilon_{кл}$  в неоднородном переменном электрическом поле формируется индуцированный дипольный момент  $\mathbf{d}(t)$ , который, вслед за полем, совершает вынужденные колебания. Клетка при этом в целом остается электрически нейтральной. Современная теория диэлектрофореза утверждает, что на электрический диполь клетки в НПЭП действует сила<sup>1</sup>, которая приводит ее в поступательное движение [43; 56]

$$\mathbf{F}(t) = \mathbf{d}(t) \cdot \nabla \mathbf{E}(t), \quad (1)$$

где:  $\mathbf{d}(t)$  – электрический диполь клетки [Кл м];

$\nabla \mathbf{E}(t)$  – градиент напряженности электрического поля [В/м<sup>2</sup>].

В уравнении (1) вектора индуцированного дипольного момента  $\mathbf{d}(t)$  клетки и напряженности электрического поля  $\mathbf{E}(t)$  с угловой частотой  $\omega$  в Декартовых координатах зависят от координат  $(x, y, z)$  и от амплитудно-частотных

---

<sup>1</sup> Эта сила не требует, чтобы клетка имела постоянный электрический заряд.

характеристик самого поля. Наибольшее распространение уравнение (1) получило без учета мнимой части<sup>2</sup> и фазы внешнего НПЭП [81]

$$\mathbf{F}_{\text{кл}} = 2 \cdot \pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_{\text{кл}} \cdot r_{\text{кл}}^3 \cdot \text{Re}[\mathbf{K}^*(\omega)] \cdot \nabla \mathbf{E}_{\text{ср}}^2, \quad (2)$$

где:  $[\mathbf{K}^*(\omega)] = \frac{\varepsilon_{\text{кл}} - \varepsilon_{\text{ср}}}{\varepsilon_{\text{кл}} + 2\varepsilon_{\text{ср}}}$  фактор Клаузиуса-Мосотти;

$r_{\text{кл}}$  – радиус клетки [м];

$\varepsilon_{\text{кл}}$  – относительная диэлектрическая проницаемость клетки, среды;

$\varepsilon_0$  – диэлектрическая постоянная  $8,85 \cdot 10^{-12}$  [Ф/м].

Как следует из (2) величина  $\mathbf{F}_{\text{кл}}$  при условии  $\varepsilon_{\text{кл}} = \varepsilon_{\text{ср}}$  принимает значения равные нулю. Частота электрического поля, на которой выполняется данное условие, называется равновесной (*crossover frequency*)  $\omega_p$  (рисунок 1).

Это соотношение позволяет с высокой точностью определить параметры клетки через измерение параметров среды, например,

$\sigma$  – проводимость клетки, среды [1/Ом].

Выражение фактора Клаузиуса-Мосотти с учетом  $\varepsilon_{\text{к}}^* = \varepsilon + \frac{j \cdot \sigma_{\text{к}}}{\varepsilon_0 \cdot \omega}$

в области низких частот ( $\omega \rightarrow 0$ ) преобразуется к виду  $\frac{\sigma_{\text{кл}} - \sigma_{\text{ср}}}{\sigma_{\text{кл}} + 2 \cdot \sigma_{\text{ср}}}$ ,

а в области высоких частот ( $\omega \rightarrow \infty$ ) соответственно  $\frac{\varepsilon_{\text{кл}} - \varepsilon_{\text{ср}}}{\varepsilon_{\text{кл}} + 2 \cdot \varepsilon_{\text{ср}}}$ .

где  $\sigma_{\text{кл}}$  – проводимость клетки (См/м)

$\sigma_{\text{ср}}$  – проводимость среды (См/м)

---

<sup>2</sup> Мнимая компонента используется в случае учета начальной фазы переменного электрического поля.

Анализ выражения (2) показывает – сила, действующая на клетку, определяется совокупностью физико-химических свойств ее вещества и амплитудно-частотными характеристиками действующего внешнего электрического поля. Важно отметить, что физико-химические свойства вещества являются частотно-зависимыми, в результате, клетка может одновременно обладать свойствами, как проводника, так и диэлектрика.

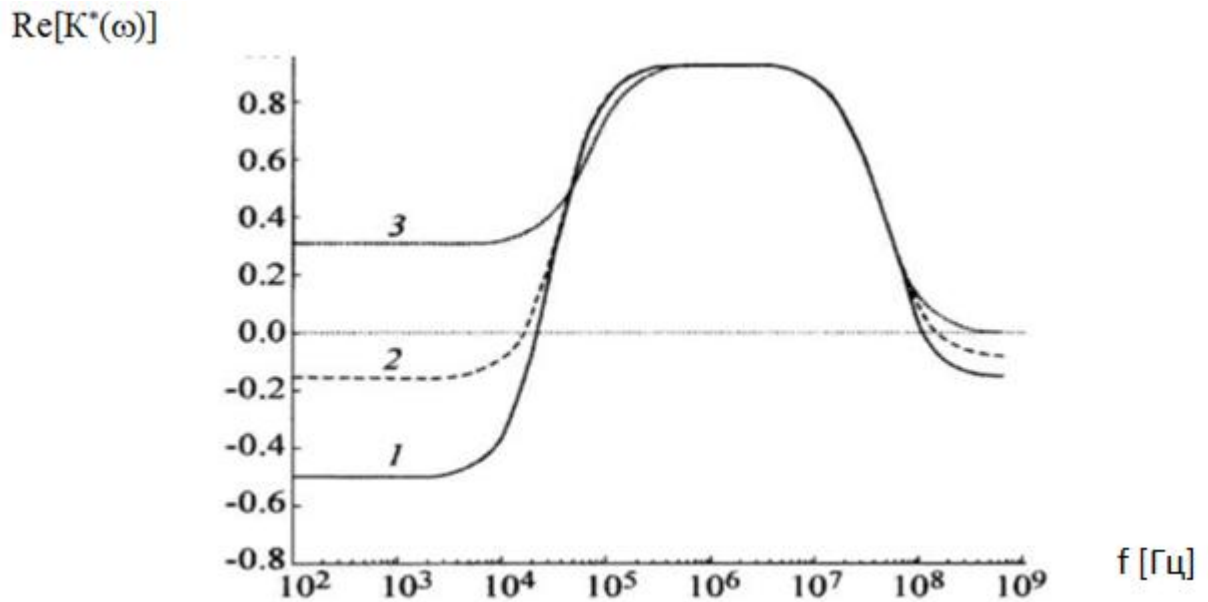


Рисунок 1 – Семейство амплитудно-частотных зависимостей  $\text{Re}[K^*(\omega)]$  с учетом внутренней диэлектрической проницаемости клетки и проводимости мембраны

1.  $\sigma = 0 \text{ См}$ ,  $\varepsilon = 50$ ; 2.  $\sigma = 500 \text{ См}$ ,  $\varepsilon = 60$ ; 3.  $\sigma = 2000 \text{ См}$ ,  $\varepsilon = 80$

### 1.4 Основы теории электроориентации и вращения клетки

На диполь, помещенный в электрическое поле с напряженностью  $\mathbf{E} = \text{const}$ , действуют равные по модулю, но противоположные по направлению две силы  $\mathbf{F}_1 = q^+ \mathbf{E}_{\text{cp}}$  и  $\mathbf{F}_2 = q^- \mathbf{E}_{\text{cp}}$  (рисунок 2). В результате происходит поворот (электроориентация) диполя вдоль силовых линий электрического поля [61; 62; 80; 81]. Вращающий момент каждой силы находится как векторное произведение модуля силы на соответствующее плечо, равное радиусу клетки.

$$\mathbf{H} = |q^+ \cdot \mathbf{E}_{\text{cp}}| \times r_{\text{ккл}}$$

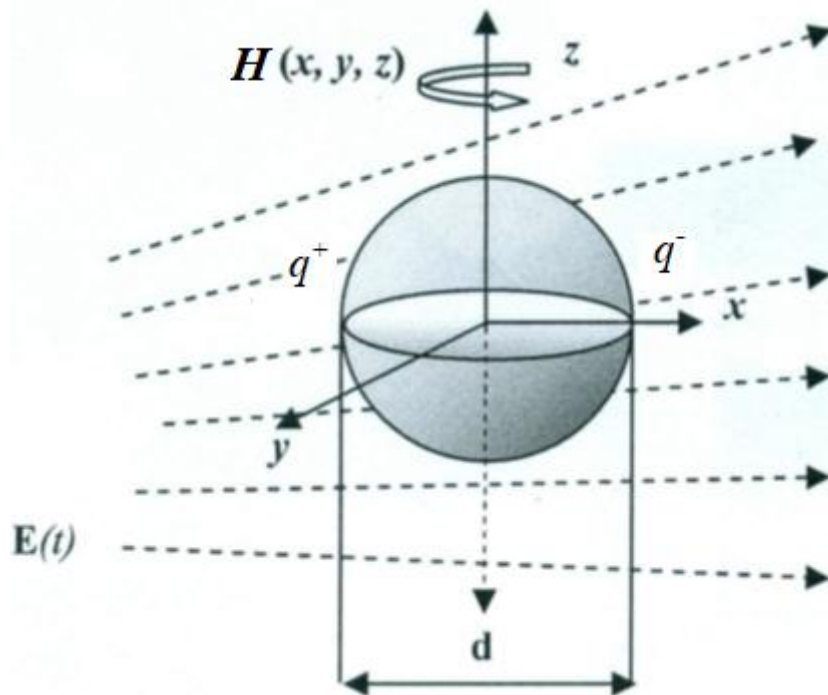


Рисунок 2 – Вращение электрического диполя сферической клетки вокруг собственной оси в неоднородном переменном электрическом поле

Под действием момента силы  $\mathbf{H}$  диполь стремится повернуться (происходит электроориентация) так, чтобы ее вектор поляризации совпадал с

вектором напряженности  $\mathbf{E}_{\text{ср}}$  внешнего поля. Такое положение соответствует устойчивому положению диполя в электрическом поле. Электроориентация диполя относительно силовых линий электрического поля по существу является частным случаем электровращения.

В НПЭП напряженность по модулю и направлению различна во всех точках пространства  $\mathbf{E}_{\text{ср}} \neq \text{const}$ . В результате силы  $\mathbf{F}_1$  и  $\mathbf{F}_2$  в произвольно выбранных точках 1 и 2 не равны между собой  $\mathbf{F}_1 \neq \mathbf{F}_2$ . Это условие приводит к возникновению пары сил, которая также стремится вращать клетку вокруг собственной оси (см. рисунок 2). Момент силы<sup>3</sup>, который приводит диполь к вращению вокруг собственной оси, в НПЭП находится как векторное произведение [81].

$$\mathbf{H}(t) = \mathbf{d}(t) \times \mathbf{E}_{\text{ср}}(t), \quad (3)$$

где:  $\mathbf{d}(t)$  – электрический диполь [Кл·м];

$\mathbf{E}_{\text{ср}}(t)$  – напряженность электрического поля в среде [В/м].

В научной литературе наиболее часто выражение (3) в системе СИ встречается в усредненном виде [80; 81]

$$\langle \mathbf{H}(t) \rangle = 4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_{\text{кл}} \cdot r_{\text{кл}}^3 \cdot \frac{\epsilon_{\text{кл}}^* - \epsilon_{\text{ср}}^*}{\epsilon_{\text{кл}}^* + 2 \cdot \epsilon_{\text{ср}}^*} \cdot \mathbf{E}_{\text{ср}}^2 \quad (4)$$

Теоретическая амплитудно-частотная зависимость мнимой части фактора Клаузиуса-Массоти, характеризующая вращение сферической модели клетки вокруг собственной оси, представлена на рисунке 3.

---

<sup>3</sup>  $\mathbf{H}(t)$  – момент силы (*torques*), векторная величина, определяет вращательное действие силы на тело и имеет размерность в электрическом поле [Кл В].



Вращение клетки вокруг собственной оси сопровождается силой трения со стороны окружающей ее жидкости

$$F_{\text{тр}} = -8 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{ср}} \cdot \omega \cdot r_{\text{кл}}^2,$$

где:  $\eta_{\text{ср}}$  – вязкость среды [Па·с];

$\omega$  – круговая частота вращения клетки [рад/с];

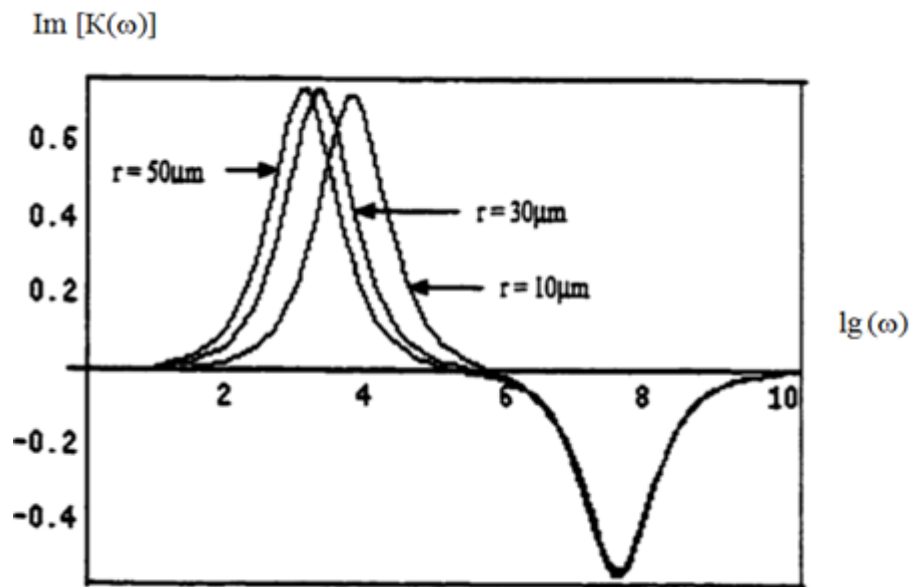
$r_{\text{кл}}$  – радиус клетки [м].

После умножения  $F_{\text{тр}}$  на  $r_{\text{кл}}$  находится момент силы трения.

$$-8 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{ср}} \cdot \omega \cdot r_{\text{кл}}^3 = |4 \cdot \pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_{\text{кл}} \cdot r_{\text{кл}}^3 \cdot [K^*(\omega)] \cdot E_{\text{ср}}^2|, \quad (5)$$

находится круговая частота вращения клетки вокруг собственной оси

$$\omega = \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_{\text{ср}}}{2 \cdot \eta_{\text{ср}}} \text{Im}[K^*(\omega)] E_{\text{ср}}^2 \quad (6)$$



Примечание:  $\varepsilon_{\text{ср}} = 80$ ,  $\varepsilon_0$ ,  $\varepsilon_{\text{кл}} = 60 \cdot \varepsilon_0$ ;  $C_{\text{мем}} = 0,5$  мкФ/см<sup>2</sup>;  $\delta_{\text{кл}} = 5000$  мкСм/см;  
 $\delta_{\text{мем}} = 0,0$  мкСм/см;  $r_{\text{кл}} = 10$  мкм

Рисунок 3 – Семейство типичных амплитудно-частотных зависимостей мнимой части фактора Клаузиуса-Массоти  $\text{Im}[K(\omega)]$ , характеризующих вращение сферической модели клетки вокруг собственной оси

## Выводы по главе 1

Анализ представленной литературы показал, что в России, как и за рубежом, интенсивно развиваются прикладные методы на основе диэлектрофореза и электроротации для нужд здравоохранения, биологии, вирусологии, микробиологии и ряда других отраслей [82–88]. Уже разработаны и используются аппаратно-методические комплексы, новые медицинские технологии как подходы к диагностике заболеваний человека. С их помощью проводят измерения таких параметров эритроцитов, которые ранее были не доступны для рутинных исследований другими методами. Среди них:  $\alpha_{\text{кл}}$  – поляризуемость эритроцита [ $\text{м}^3$ ],  $c_{\text{кл}}$  – жесткость эритроцита [ $\text{Н/м}$ ],  $\eta_{\text{кл}}$  – вязкость эритроцита [ $\text{Па}\cdot\text{с}$ ],  $f_p$  – равновесная эритроцита [ $\text{Гц}$ ],  $C_m$  – емкость эритроцита [ $\text{Ф}$ ] и др. [77; 78].

Вместе с тем, возможности методов диэлектрофореза электроротации и электроориентации полностью еще не раскрыты. Амплитудные, частотные, фазовые, спектральные, пространственные силовые характеристики поля по-прежнему предоставляют в распоряжение исследователей широкие возможности в изучение параметров эритроцитов.

Для изучения и внедрения этих методов в медицинскую практику предлагается решить следующие задачи:

1. Составить и решить дифференциальное уравнение поляризуемости эритроцита в неоднородном переменном электрическом поле.

2. На основании решений дифференциального уравнения поляризуемости эритроцита в неоднородном переменном электрическом поле разработать измерительно-вычислительный комплекс для одномоментного измерения и изучения параметров эритроцитов в медико-биологических исследованиях.

На базе измерительного вычислительного комплекса:

а) разработать способ определения массы отдельно наблюдаемого эритроцита в неоднородном переменном электрическом поле;

б) создать программное обеспечение одномоментного измерения совокупности параметров эритроцита человека;

в) разработать опытный образец государственного эталона электрической поляризуемости 1-го разряда;

г) исследовать пилотные референтные значения поляризуемости эритроцитов человека с учётом половых и возрастных различий.

В работе перечислены лишь некоторые теоретические и практические достижения диэлектрофореза и электроротации, а также сформулированы первоочередные задачи в области метрологии. В области медицины любые инструментальные методики измерения должны подтверждаться заключениями агентства Росстандарта. Перечисленные задачи частично решают проблемы развития метода диэлектрофореза и его применения в медицинской практике.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Перечень оборудования и материалов

Исследования выполнялись с использованием оборудования и материалов, представленных в таблице 1.

Таблица 1 – Перечень оборудования и материалов

Номер	Наименование	Кол-во	Примечание
1	Микроскоп медицинский МИКМЕД-6	1	
2	Объектив Plan 100x/1,25 ЛОМО	1	
3	Объектив Plan 60x/0,80 ЛОМО	1	
4	Окуляр WF 10x/22 с сеткой ЛОМО WF 10x/22	2	
5	Комплекс визуализации MC-14 (в комплекте с оптико-механическим адаптером для микроскопа Микмед-6 и ПО «MC-View») ЛОМО MC-14	1	
6	Вольтметра В7-37	1	
7	Осциллограф цифровой (100 МГц, 1 Гвыб/с, 2 кан., 10 млн. точек) Актаком ADS2111MV	1	
8	Генератор сигналов Актаком AWG-4110 (1 мкГц – 10 МГц, встроенный частотомер – до 200 МГц)	1	
9	Частотомер электронно-счетный Россия ЧЗ-63/1	1	
10	Компьютер: Процессор Intel® Core™ i7 6700K (3,4GHz) Мат. плата Asus Z170 PRO GAMING. FireWire/1394; Монитор 23 «ASUS VE239QLB»	1	
11	Линейка-эталон сравнения (мера длины) № 002	1	
12	Объект – микрометры ОМ-О, ОМ-П, предел допускаемой абсолютной погрешности (ОМ ± 0,0001) мм. ТУ 4381-018-02566540-2004	1	
13	Измерительная ячейка, расстояние между электродами – $(150 \pm 0,5) \times 10^{-6}$ м, высота $(0,2 \div 1,5) \times 10^{-6}$ м	6	Нестандартное изделие
14	Вискозиметр капиллярный стеклянный ВПЖ, заводской номер – 173	1	Диаметр капилляра 0,82 мм. Постоянная вискозиметра $(K = 0,03421) \text{ мм}^2/\text{с}^2$ . Паспорт (сведения о поверке). Годен до 31.01.2021

## Продолжение таблицы 1

15	Сферические частицы из полистирола утвержденного типа ГСО 10050-2011, ОГС-09ЛМ со средним радиусом, равным $6,0 \cdot 10^{-6}$ м		Плотность 1050 [кг/м <sup>3</sup> ], удельное сопротивление $1 \cdot 10^{15}$ [Ом·м], относительная диэлектрическая проницаемость 2,5–2,6 [б/р].
16	Термостат жидкостный ВТ-ро-03 заводской номер 238032	1	Диапазон температур от 0 до 100° С. Нестабильность поддержания температуры в течение 1 ч в пределах ( $\pm$ ) 0,1°С. Аттестат № 1698/11. Годен до 03.12.2020
17	Секундомер электронный СЧЕТ-1М 2059.12.14	1	Измеряемые интервалы времени: 0,010–999,999 с дискретностью 0,001 с 1000,00–9999,99 с дискретностью 0,01 с 10000,0–99999,9 с дискретностью 0,1 с ПГ при ( $25 \pm 5$ ) °С не более ( $\pm$ ) ( $1 \cdot 10^{-5} \cdot T + C$ ) с. Свидетельство о поверке № 8.2019.3-1. Годен до 05.02.2020
18	Камера «Тепло-холод» БСК-60/100-65 КТХ 100	1	Диапазон температур от минус 60 до плюс 100°С; погрешность не более 3°С. Аттестат № 1654/11. Годен до 14.06.2019
19	Дистиллятор лабораторный WD-2004F 08072928	1	Производительность 3,5 л/ч Диапазон измерения рН от – 2 до 20 ед. рН; ПГ не более 0,02 ед. рН. Диапазон по УЭП 0–20 См/м; ПГ ( $\pm$ ) 2,0 %. Аттестат № 06/25-19. Годен до 04.02.2020
20	Прибор комбинированный «Testo 622»53505-13	1	Диапазон температур от минус 10 до 60°С; погрешность не более 0,4°С. Диапазон относительной влажности от 10 до 95 %; погрешность не более 3 %. Диапазон атмосферного давления от 300 до 1200 гПа; погрешность не более 5 гПа. Свидетельство о поверке № 453061. Годен до 16.12.2019
21	Эритроциты человека <sup>4</sup>		НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН
22	Дозаторы с переменным объемом, одноканальные 100, 1000 мкл	2	Диапазон – 100, 1000 мкл; точность – ( $\pm$ 0,035); ( $\pm$ 0,10) мкл; воспроизводимость – стандартное отклонение, – 0,03; 0,08; – коэффициент вариации (%) – 0,8; 3,0

Во время выполнения исследования сроки годности оборудования, его аттестации и поверки не истекли.

<sup>4</sup> Все волонтеры дали информированное согласие на участие в работе, в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

## 2.2 Методика подготовки эритроцитов и латексных частиц к измерениям

В работе использовались эритроциты волонтеров с одобрения Этического Комитета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины» (протокол заседания от 15.06.2012). Волонтеры предоставляли информированное согласие на участие в работе в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Эритроциты получали из цельной крови, взятой из вены. Для проведения исследования методом диэлектрофореза кровь объемом 2 мл забирали вокутайнерами в 3,7 % цитратный буфер в соотношении 9:1. Непосредственно перед проведением эксперимента кровь в объеме 10 мкл разводилась в 0,3 М растворе сахарозы [70] в 30 раз. Удельное сопротивление раствора 0,3 М сахарозы составляло ( $\rho = 58,0 \pm 11,6 \cdot 10^3 \text{ Ом} \cdot \text{м}$ ; pH 7,0÷7,4. Клетки разводили в 0,3 М растворе сахарозы до получения концентрации  $10^7 \text{ см}^{-3}$ .

В работе использовались латексные частицы компании Dow Chemical (Indianapolis, США) с диаметром ( $\text{Ø} = 5,7 \cdot 10^{-6} \text{ м}$ ), стандартной девиацией ( $\delta = 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ м}$ ), а также сферические частицы из полистирола утвержденного типа ГСО 10050-2011, ОГС-09ЛМ со средним диаметром ( $\text{Ø} = 6,0 \cdot 10^{-6} \text{ м}$ ).

Частицы вносились в одноразовые пластиковые пробирки объемом  $0,25 \text{ см}^3$  и разводились дистиллированной водой. Путём последовательного разбавления добивались концентрации, при которой в поле зрения микроскопа между электродами измерительной ячейки наблюдалось 15÷50 частиц.

### 2.3 Анализ сил действующих на эритроциты в неоднородном переменном электрическом поле

НПЭП характеризуется различной величиной напряжённости в пространстве электрического поля. В результате для диаметрально противоположных точек А и Б, принадлежащих некоторому абстрактному эритроциту находящимся в таком поле, выполняется неравенство

$$\mathbf{E}_A \neq \mathbf{E}_B,$$

где:  $\mathbf{E}_A$  – вектор напряжённости электрического поля в точке А, отстоящей на некотором расстоянии от точки Б;

$\mathbf{E}_B$  – вектор напряжённости в точке Б.

В точках А и Б значения сил, действующих на эритроцит не равны между собой

$$q \mathbf{E}_A \neq q \mathbf{E}_B, \quad (7)$$

где:  $q$  – единичный заряд электрона ( $1,6 \cdot 10^{-19}$ ) [К].

Общий вектор вынуждающей силы  $\mathbf{F}_{кл}$ , действующий на эритроцит и приводящий его в поступательное движение записывается в виде разницы

$$\mathbf{F}_{кл} = \mathbf{F}_A - \mathbf{F}_B, \quad (8)$$

Усреднённая по времени вынуждающая сила (9) в развёрнутом виде записывается следующим образом [81]

$$\mathbf{F}_{эл} = \pi \cdot \epsilon_{ср} \cdot \epsilon_0 \cdot r_{кл}^3 \cdot \left[ \frac{\epsilon_{кл} - \epsilon_{ср}}{\epsilon_{кл} + 2 \cdot \epsilon_{ср}} \right] \cdot \nabla \mathbf{E}_{ср}^2, \quad (9)$$

где:  $\epsilon_{\text{ср}}$  – диэлектрическая проницаемость среды [б/р];

$\epsilon_{\text{ккл}}$  – диэлектрическая проницаемость эритроцита [б/р];

$r_{\text{ккл}}$  – радиус эритроцита [м];

$\nabla E_{\text{ср}}^2$  – градиент квадрата напряженности электрического поля среды [ $\text{В}^2/\text{м}^3$ ].

Под действием силы  $F_{\text{эл}}$  со стороны электрического поля эритроцит движется поступательно с ускорением. Эта первая сила  $F_1$  зависит от массы эритроцита и силы

$$F_1 = m_{\text{ккл}} \cdot \ddot{x}_{\text{ккл}}, \quad (10)$$

где:  $m_{\text{ккл}}$  – масса эритроцита [кг];

$\ddot{x}_{\text{ккл}}$  – ускорение эритроцита [ $\text{м}/\text{с}^2$ ].

В процессе поступательного движения на эритроцит действует также и вторая сила, которая определяется набегающим потоком со стороны клеточной суспензии. Возникает трение между внешней поверхностью эритроцита и поверхностью обтекающего потока. Эта сила вязкого трения  $F_2$  стремится остановить поступательное движение эритроцита. Для шара она записывается в виде [62]

$$F_2 = 6 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{ср}} \cdot \dot{x}_{\text{ккл}} \cdot r_{\text{ккл}}, \quad (11)$$

где:  $6 \cdot \pi$  – коэффициент пропорциональности для шара;

$\eta_{\text{ср}}$  – вязкость среды, клеточной суспензии [Па с];

$\dot{x}_{\text{ккл}}$  – поступательная скорость эритроцита [м/с];

$r_{\text{ккл}}$  – радиус эритроцита [м].

Третья сила растягивает эритроцит, приводит его к деформации ( $F_{\text{д}}$ ). Она находится как алгебраическая сумма двух слагаемых из уравнения (9) –



$$\mathbf{F}_d = \mathbf{F}'_A + \mathbf{F}_B,$$

где:  $\mathbf{F}'_A$  – сила реакции опоры [Н];

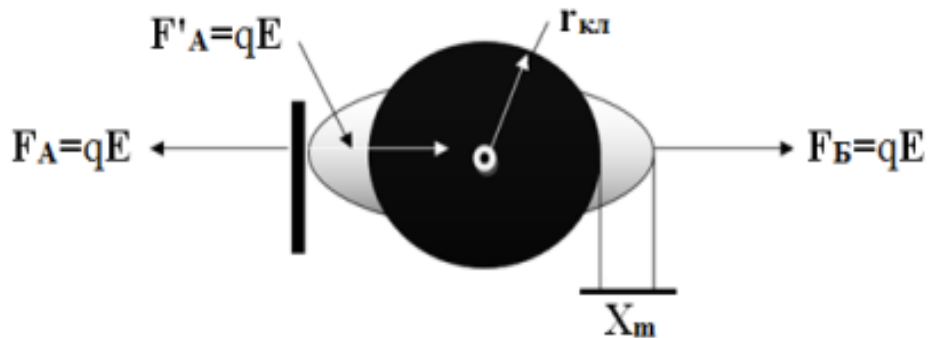
$\mathbf{F}_B$  – вынуждающая сила [Н];

В частном случае, если эритроцит оседает на грани электрода, то согласно третьему закону Ньютона<sup>5</sup>, общая сила деформации  $F_d$ , которая его растягивает, равна сумме ( $F_d = F'_A + F_B$ ) (рисунок 4). Амплитуда деформации эритроцита пропорциональна жёсткости эритроцита (клетки)

$$|F_d| = c_{\text{кл}} \cdot x_{\text{кл}}, \quad (12)$$

где:  $c_{\text{кл}}$  – жесткость эритроцита [Н/м];

$x_d$  – амплитуда деформации эритроцита [м].



Примечание:  $F_A$ ,  $F_B$  – вынуждающие силы [Н],  $F'_A$  – сила реакции опоры [Н],  $r_{\text{кл}}$  – радиус клетки [м],  $X_m$  – деформация клетки [м].

Рисунок 4 – Диаграмма сил, приложенных к клетке на грани электрода

<sup>5</sup>Силы, с которыми взаимодействуют два любых тела, всегда равны по величине и противоположны по направлению.

Общий баланс сил, который действует на эритроцит можно записать в следующем виде:

$$\mathbf{F}_{\text{кл}} + \mathbf{F}_2 + \mathbf{F}_d = \mathbf{F}_{\text{эл}}, \quad (13)$$

где:  $\mathbf{F}_{\text{кл}}$  – сила которая приводит эритроцит в поступательное движение;

$\mathbf{F}_2$  – сила вязкого трения, действующая со стороны набегающего потока среды на эритроцит;

$\mathbf{F}_d$  – сила приводящая эритроцит к деформации, вытягиванию;

$\mathbf{F}_{\text{эл}}$  – сила, действующая на эритроцит со стороны внешнего электрического поля.

#### 2.4 Анализ движения эритроцита в неоднородном переменном электрическом поле

Под действием вышеперечисленных сил (14), которые зависят от амплитудно-частотных характеристик внешнего электрического поля, эритроцит совершает следующие основные виды движения:

а) первое – разнонаправленное поступательное движение между электродами: в направлении к электродам, в область с наибольшей напряжённостью электрического поля – положительный диэлектрофорез; в направлении от электродов, в область с наименьшей напряжённостью электрического поля – отрицательный диэлектрофорез;

б) второе – вынужденные возвратно-поступательные колебания как единого целого в пространстве между электродами;

в) третье – вынужденные возвратно-поступательные колебания, связанные с деформацией клеточного объёма. Эритроцит вытягивается вдоль силовых линий электрического поля, после прекращения действия силы стремится вернуться к начальному состоянию равновесия [84];

г) четвёртое – вращение вокруг собственной оси [63; 65; 66].

В большинстве случаев реакцию эритроцита в ответ на действие линейной внешней вынуждающей силы можно проанализировать с помощью дифференциального уравнения колебания механической системы с одной степенью свободы. Оно позволяет подробно рассмотреть все вышеуказанные четыре вида движения. Наиболее часто встречается случай, когда сила сопротивления пропорциональна скорости движения [62].

В настоящей работе уравнение баланса сил (15), приложенных к эритроциту, составлялось из следующих положений. В левую часть уравнения включались силы, которые приводят эритроцит в движение с ускорением, деформации, направленные на преодоления трения между мембраной эритроцита и внешней средой, а также внутренними клеточными структурами. В правую часть уравнения записывается вынуждающая сила  $F_{эл}$ , действующая на эритроцит со стороны внешнего электрического поля.

При составлении уравнения для конкретного вида движения следует руководствоваться начальными условиями, которые учитывают фазы: амплитуды колебания; скорости; ускорения поступательного или возвратно-колебательного движение эритроцита в суспензии. Дополнительно следует различать между собой вязкость эритроцита  $\eta_{кл}$  и вязкость клеточной суспензии  $\eta_{ср}$  (например, 0,3 М раствора сахарозы).

Уравнение поступательного движения эритроцита в вязкой среде записывается следующим образом

$$m_{кл} \cdot \ddot{x}_{кл} + b_{ср} \cdot \dot{x}_{кл} + c_{кл} \cdot x_{кл} = F_{эл}, \quad (14)$$

где:  $m_{кл}$  – масса эритроцита [кг];

$\ddot{x}_{кл}$  – ускорение движения эритроцита [м/с<sup>2</sup>].

$b_{(ср)}$  – обобщённый коэффициент вязкости среды [Па·с];

$\dot{x}_{кл}$  – скорость движения произвольной материальной точки на поверхности эритроцита [м/с];

$c_{\text{кл}}$  – жёсткость эритроцита [Н/м];

$F_{\text{эл}}$  – сила, действующая на эритроцит со стороны электрического поля [Н].

Уравнение деформации эритроцита, как возвратно-поступательного колебания клеточного объёма записывается в виде

$$m_{\text{кл}} \cdot \ddot{x}_{\text{кл}} + b_{(\text{ср+кл})} \cdot \dot{x}_{\text{кл}} + c_{\text{кл}} \cdot x_{\text{д}} = F_{\text{эл}}, \quad (15)$$

где:  $m_{\text{кл}}$  – масса эритроцита [кг];

$\ddot{x}_{\text{кл}}$  – ускорение движения произвольной материальной точки [ $\text{м/с}^2$ ] на поверхности эритроцита;

$b_{(\text{ср+кл})}$  – суммарный обобщённый коэффициент вязкости среды и эритроцита [ $\text{Па} \cdot \text{с}$ ];

$\dot{x}_{\text{кл}}$  – скорость движения произвольной материальной точки на поверхности эритроцита [ $\text{м/с}$ ];

$c_{\text{кл}}$  – жёсткость эритроцита [Н/м];

$x_{\text{д}}$  – амплитуда колебаний материальной точки на поверхности эритроцита [м];

$F_{\text{кл}}$  – сила электрического поля, действующая на эритроцит [Н].

Общее решение дифференциального уравнения (16) с одной степенью свободы представлено в [100]

$$x = e^{-ht} \cdot (C_1 \cdot \sin(\omega t) + C_2 \cos(\omega t)) + \frac{|F_{\text{эл}}|}{m_{\text{кл}} \sqrt{\left(\frac{c_{\text{кл}}}{m_{\text{кл}}} \cdot \omega^2\right)^2 + 4 \cdot h^2 \cdot \omega^2}} \cdot \sin(\omega t - \gamma), \quad (16)$$

где:  $\omega = 2 \pi f$  - круговая частота внешней вынуждающей силы [рад/с];

$e$  – константа  $\approx 2.718$  [бр]

$\gamma$  – угол отставания фазы реакции эритроцита от фазы действия вынуждающей силы [рад];

$$h_{\text{кл}} = \frac{(6 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{кл}} \cdot r_{\text{кл}})}{2 \cdot m_{\text{кл}}} - \text{коэффициент пропорциональности вязкого трения}$$

эритроцита,

где:  $\eta_{\text{кл}}$  - вязкость клетки.

Свободные затухающие колебания эритроцита в уравнении (16) описывает первое слагаемое

$$x = e^{-ht} \cdot (C_1 \cdot \sin(\omega t) + C_2 \cos(\omega t)),$$

где:  $t$  – текущее время [с];

$C_1, C_2$  – постоянные, определяются из начальных условий колебания.

В процессе решения дифференциального уравнения следует иметь в виду, если на эритроцит действует внешняя вынуждающая сила электрического поля согласно гармоническому закону, то амплитуда возвратно-поступательного движения  $x_{\text{д}}$  эритроцита, его скорость  $\dot{x}_{\text{кл}}$  и ускорение  $\ddot{x}_{\text{кл}}$  строго следуют за полем [100]:

$$\begin{aligned} x_{\text{кл}} &= x_m \cdot \sin(\omega t), \\ \dot{x}_{\text{кл}} &= \omega \cdot x_m \cdot \cos(\omega t), \\ \ddot{x}_{\text{кл}} &= -\omega^2 \cdot x_m \cdot \sin(\omega t), \\ \omega &= 2 \cdot \pi \cdot f, \end{aligned} \tag{17}$$

где:  $\omega$  – круговая частота переменного электрического поля [рад/с];

$f$  – циклическая частота электрического поля [Гц].

Амплитудно-фазовая зависимость амплитуды колебания  $x$ , скорости и ускорения колебания эритроцита в переменном электрическом поле представлены на рисунке 9. Амплитуда колебания  $x_m$  произвольной материальной точки

эритроцита и её ускорение  $\ddot{x}_{кл}$  находятся в фазе между собой и в противофазе относительно скорости  $\dot{x}_{кл}$ . Это даёт основание упрощать и искать решение уравнения, исходя из начальных условий (16). Например, из рисунка 5 следует, что если угол равен  $90^\circ$ , то ( $F_{эл} = \max$ ); ( $x_{д-} = \max$ ); ( $\ddot{x}_{кл} = \max$ ); ( $\dot{x}_{кл} = 0$ ). Если угол равен  $0^\circ$ , то ( $F_{эл} = 0$ ); ( $\ddot{x}_{кл} = \max 0$ ); ( $\dot{x}_{кл} = 0$ ); ( $x_{д-} = 0$ ).

Возможен также ещё третий вариант искусственно созданных фазовых зависимостей и баланса сил. Если эритроцит оседает на жёсткой грани электрода, то согласно (14) ( $F_{д} = 2F_{эл}$ ) и ( $F_{эл} = \max$ ); ( $x_{д} = \max$ ); ( $\ddot{x}_{кл} = 0$ ); ( $\dot{x}_{кл} = 0$ ).

Руководствуясь обоснованным пренебрежением отдельных слагаемых, начальными условиями, фазовыми зависимостями, амплитуды колебания (деформации), скорости и ускорения движения эритроцита в НПЭП составляет баланс сил и решаются частные уравнение относительно жёсткости, массы эритроцита [100].

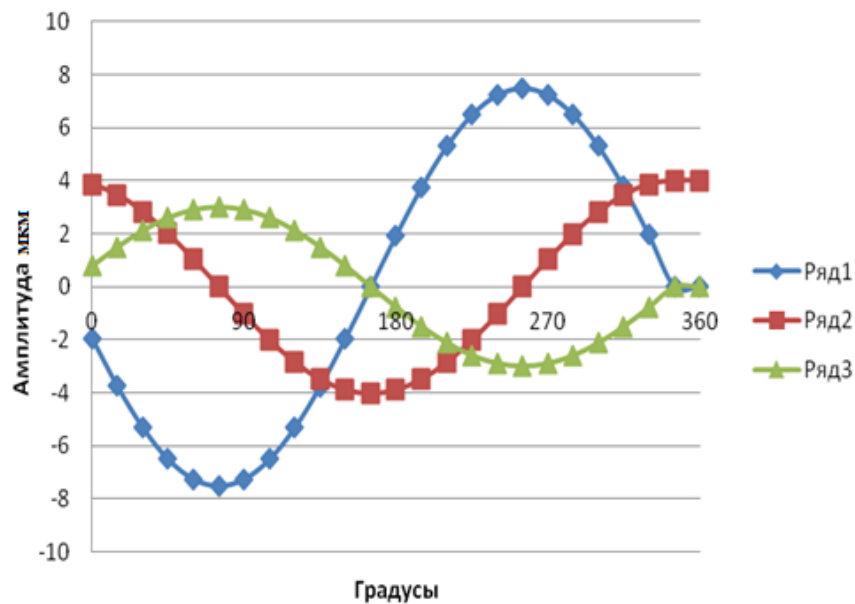


Рисунок 5 – Ряд 1 ( $\ddot{x}_{кл}$ ) – фазовая зависимость ускорения; Ряд 2 ( $\dot{x}_{кл}$ ) – фазовая зависимость скорости; Ряд 3 ( $x_{д}$ ) – фазовая зависимость амплитуды колебания (деформации) эритроцита в переменном электрическом поле

## 2.5 Алгоритм определения поляризуемости, индуцированного заряда, индуцированного дипольного момента и индуцированной электрической ёмкости эритроцита

В НПЭП на диполь сферической эритроцита действует вынуждающая сила (первая), которая приводит её в поступательное движение [47]. При составлении дифференциального уравнения установившегося поступательного движения остальными силами, которые приводят её к деформации и ускорению пренебрегали. Силы, приводящие эритроцит к ускорению ( $\mathbf{F}_a = m_{\text{кл}} \ddot{\mathbf{x}}_{\text{кл}}$ ) и сила, приводящая эритроцит к деформации ( $\mathbf{F}_d = c_{\text{кл}} \cdot \mathbf{x}_d$ ) в уравнении (16) принимались равными нулю. В результате уравнение приводится к виду [101]

$$6 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{ср}} \cdot \dot{\mathbf{x}}_{\text{кл}} \cdot \mathbf{r}_{\text{кл}} = \frac{1}{2} \cdot \varepsilon_0 \cdot \alpha_{\text{кл}} \cdot \nabla \mathbf{E}_{\text{ср}}^2, \quad (18)$$

где:  $\nabla \mathbf{E}_{\text{ср}}^2$  – вектор градиента квадрата напряженности электрического поля, действующий на эритроцит (расчетная величина);

$\varepsilon_0$  – справочная величина;

$\dot{\mathbf{x}}_{\text{кл}}, \eta_{\text{ср}}, r_{\text{кл}}$  – скорость поступательного движения эритроцита, вязкость клеточной суспензии и радиус (определяются экспериментально).

Из решения уравнения (19) находится величина объёмного коэффициента поляризуемости<sup>6</sup> эритроцита [78]

$$\alpha_{\text{кл}} = \frac{12 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{ср}} \cdot \dot{\mathbf{x}}_{\text{кл}} \cdot \mathbf{r}_{\text{кл}}}{\varepsilon_0 \cdot |\nabla \mathbf{E}_{\text{ср}}^2|}, \quad (19)$$

Модуль  $\nabla \mathbf{E}_{\text{ср}}^2$  - вектора есть скаляр, пропорциональный его длине [102; 103]

---

<sup>6</sup> В дальнейшем поляризуемость.

$$|\nabla \mathbf{E}_{\text{cp}}^2| = \sqrt{(\nabla_x \mathbf{E}_{\text{cp}}^2)^2 + (\nabla_y \mathbf{E}_{\text{cp}}^2)^2 + (\nabla_z \mathbf{E}_{\text{cp}}^2)^2},$$

где  $\nabla_x, \nabla_y, \nabla_z$  - компоненты векторного оператора  $\left[ \frac{\mathbf{B}^2}{\text{M}^3} \right]$  [101].

Знание величины поляризуемости позволяет определить индуцированный дипольный момент

$$\mathbf{d}_i = \alpha \cdot \varepsilon_0 \cdot \mathbf{E}, \quad (20)$$

индуцированный электрический заряд

$$q_i = \frac{\mathbf{d}_i}{2 \cdot \mathbf{r}}, \quad (21)$$

индуцированную электрическую ёмкость

$$C_i = \frac{q_i}{2 \cdot \mathbf{E} \cdot \mathbf{r}}, \quad (22)$$

Вышеперечисленные характеристики эритроцита, в отличие от поляризуемости, зависят от напряжённости внешнего электрического поля. Они отражают динамику движения электрических зарядов во всем клеточном объёме под действием возмущающей силы, а также изменения параметров эритроцита по абсолютной величине относительно начальных величин. Например, общий заряд эритроцита  $Q$  является суммой  $q_0$  постоянного (начального) и  $q_i$  индуцированного

$$Q = q_0 + q_i, \quad (23)$$

Таким образом, в работе найдены важные четыре характеристики эритроцита:

- объёмный коэффициент поляризуемости;
- индуцированный дипольный момент;
- индуцированный электрический заряд;
- индуцированная электрическая ёмкость.



## **ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА АППАРАТНО-МЕТОДИЧЕСКОЙ БАЗЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАРАМЕТРОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ИЗМЕРИТЕЛЬНО-ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО КОМПЛЕКСА**

### **3.1 Разработка измерительно-вычислительного комплекса для единовременного измерения параметров эритроцитов в медико- биологических исследованиях и их изучения**

Разработка ИВК осуществлялась с учётом предложений со стороны практикующих врачей, определялась потребностью в проведении фундаментальных исследований в области диагностики заболеваний человека, а также необходимостью организации метрологической системы калибровки, поверки в России приборов на основе метода диэлектрофореза и др.

В состав ИВК включались следующие устройства:

- генератор переменного напряжения;
- усилитель переменного напряжения, обеспечивающий подачу на электроды измерительной ячейки, переменного напряжения  $U$  с заданной амплитудой от задающего генератора;
- микроскоп для визуализации отдельности клетки и её реакции в измерительной ячейке в ответ воздействия НПЭП;
- видеокамера для регистрации потока видеоизображения от микроскопа о динамике движения эритроцитов в измерительной камере;
- компьютер для регистрации потока видеоизображения и обработки потока информации от видеокамеры, расчёта характеристик электрического поля в измерительной камере, расчёта параметров эритроцитов, хранения видеофайлов и результатов параметров эритроцитов, управления работой (включение/выключение) генератора по заданной программе;
- объект микрометр для калибровки ИВК и измерения линейных размеров эритроцитов, расстояние между электродами измерительной камеры.

Функциональная схема ИВК представлена на рисунке 6. Внешний вид измерительно-вычислительного комплекса, представлен на рисунке 7.

Комплектация ИВК высокоточными приборами, современным компьютером обеспечили более низкую суммарную СНБ измерения параметров эритроцитов, возможность создать референтную методику величины поляризуемости на основе латексных частиц – образца государственного эталона физической величины поляризуемости [104; 105].

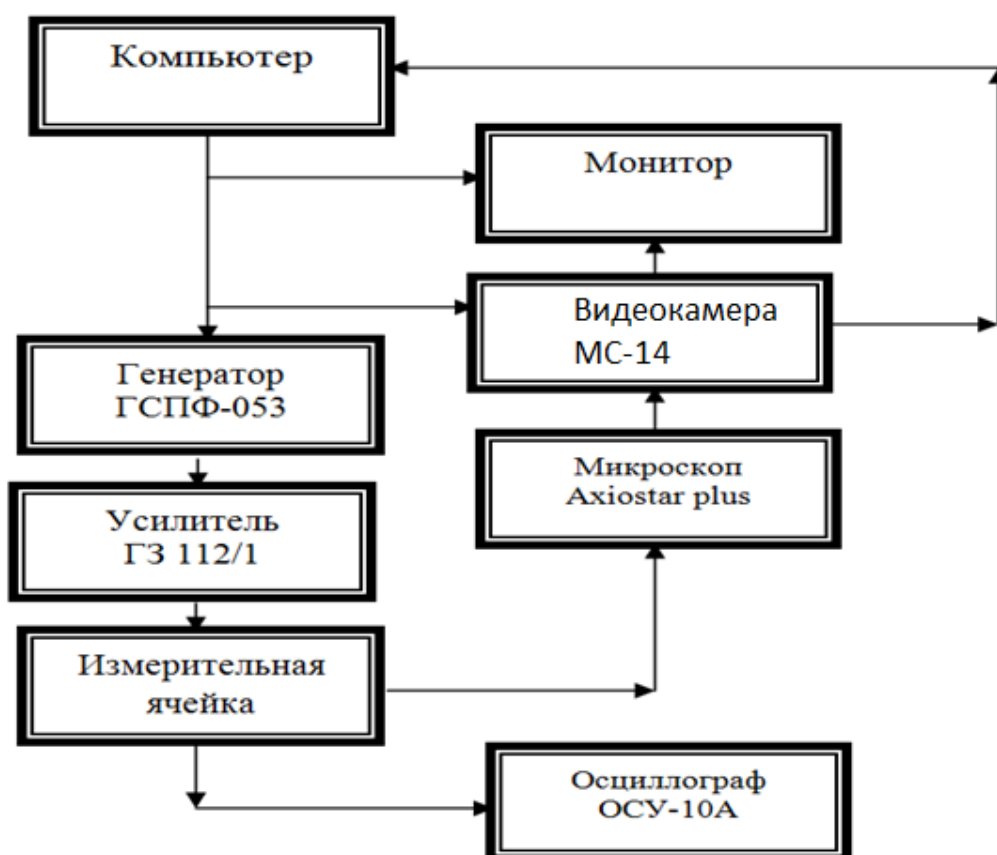


Рисунок 6 – Функциональная схема измерительно-вычислительного комплекса

Разработанное программное обеспечение позволяет получать параметры эритроцитов одновременно.



Рисунок 7 – Внешний вид измерительно-вычислительного комплекса

### 3.2 Разработка конструкции измерительной ячейки

Исследования осуществлялись с использованием оригинальной измерительной ячейки [106]. Она является одним из важных компонентов ИВК. Современные методы микро - и нано-технологий позволяют получить геометрию электродов практически любой сложности [107]. Самыми распространенными конструкциями являются: пластинчатые, игольчатые, объемные, комбинированные. Форма электродов позволяет формировать плоскую или объемную структуру электрического поля в измерительной камере. Конкретные задачи, стоящие перед исследователями, достигаются применением различных, в том числе оригинальных конструктивных решений измерительных ячеек [88–98; 104–110].

Недостатками представленных в литературе конструкций является:

а) наличие избыточных электродов для измерения величины поляризуемости;

б) большая собственная электрическая емкость, которая сокращает частотный диапазон применения измерительной ячейки;

в) применение графита в качестве материала электродов, в результате возможно наличие переходного сопротивления электрического контакта между электродом и контактными площадками в разъеме со стороны генератора напряжения;

г) узкая щель между электродами, малая ширина прямоугольных электродов, что приводит к ограниченному полю зрения микроскопа, сокращению количества наблюдаемых эритроцитов.

В результате:

а) частицы располагаются в измерительной камере близко друг к другу, что приводит к их взаимодействию. Реакция частицы в ответ на воздействие со стороны внешнего электрического поля зависит от характеристик соседних частиц и их местоположения;

б) не всегда возможно наблюдать одновременно более 30 частиц с радиусом  $r$  (2–4) мкм и получать их представительную выборку.

Малая ширина прямоугольных электродов приводит к сокращению области поля с идентичными пространственными характеристиками неоднородного переменного электрического поля. В результате возрастает суммарная стандартная неопределённость типа Б (СНБ) [ГОСТ Р 54500.3-2011] градиента напряжённости электрического поля между электродами в плоскости X-Y, а также суммарная СНБ измеряемых характеристик поля и как следствие – частиц, клеток.

Проектирование и разработка выше указанных конструкций осуществлялась без учёта образования индуцированного объёмного заряда совокупности клеток, который искажает структуру электрического поля между электродами в измерительном объёме. В результате, индуцированный объёмный заряд способен влиять на процесс поляризации отдельной клетки, её реакцию в широком амплитудно-частотном диапазоне в ответ на воздействие со стороны НПЭП. Таким образом, такой подход, без сомнения, является общим недостатком

всех выше указанных конструкций. Учёт наличия объёмного заряда в дисперсных средах (суспензии микрочастиц) требует сбалансированных комплексных конструктивных решений при создании измерительной камеры и электродов.

Достижение указанного результата обеспечивалось тем, что:

а) контактные площадки электродов измерительной ячейки в области подключения к электрическому разъёму покрываются золотом, в результате устраняется влияние переходного сопротивления на участке электрод – электрический разъем со стороны генератора напряжения;

б) ширина между электродами увеличивается до 150 мкм, что увеличивает объем измерительной камеры. В результате уменьшается отношение индуцированного объёмного заряда одной клетки к общему объёму всей измерительной камеры;

в) уменьшается степень диполь-дипольного взаимодействия клеток между собой;

г) углы электродов выполняются прямоугольными, ширина электродов выполняется размером не менее 4–5 мм;

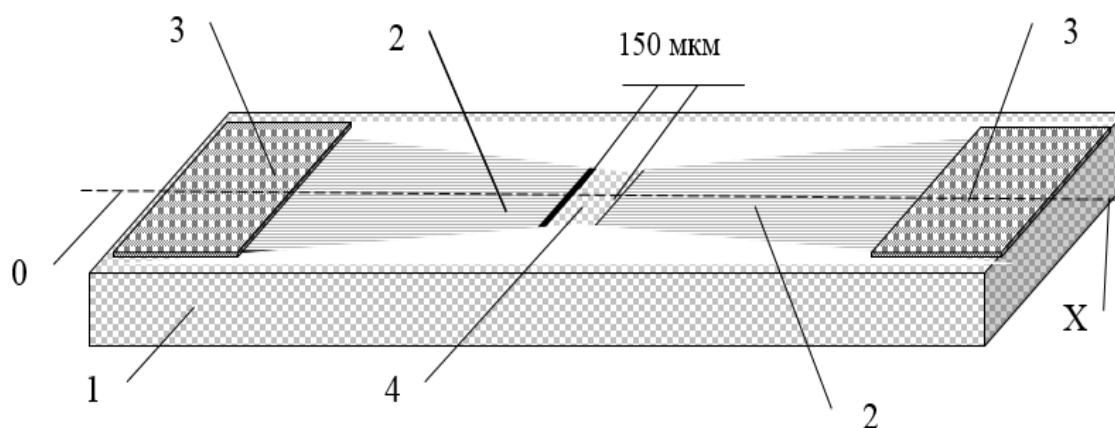
д) процесс измерения величины поляризуемости частиц осуществляется в центральной области между электродами.

Предлагаемые конструктивные решения поясняются рисунками 8, 9.

Конструкция электродов и измерительной камеры позволяет сформировать область поля в измерительной камере со стабильными пространственными характеристиками неоднородного переменного электрического поля, а также минимизировать влияние:

а) переходного сопротивления на участке электрод измерительной камеры – электрический разъем со стороны генератора напряжения;

б) индуцированных объёмных зарядов клеток друг на друга.



Примечание: 1 – стеклянная прозрачная пластина; 2 – металлические электроды; 3 – золотые контактные площадки, 4 – измерительная камера; ширина сторон электродов, примыкающих к измерительной камере 4 мм.

Рисунок 8 – Внешний вид измерительной ячейки

Конструкция ячейки защищена патентом на полезную модель № 174320 (Измерительная ячейка для диэлектрофоретических исследований) [108].

Она также имеет сертификат калибровки геометрических размеров измерительной ячейки (Приложение Ж).

Непосредственно перед экспериментом измерительная ячейка промывалась дистиллированной водой и высушивалась при комнатной температуре до полного испарения воды. Далее она жёстко закреплялась на подвижном столе микроскопа так, чтобы зазор между электродами находился в центре поля зрения микроскопа.

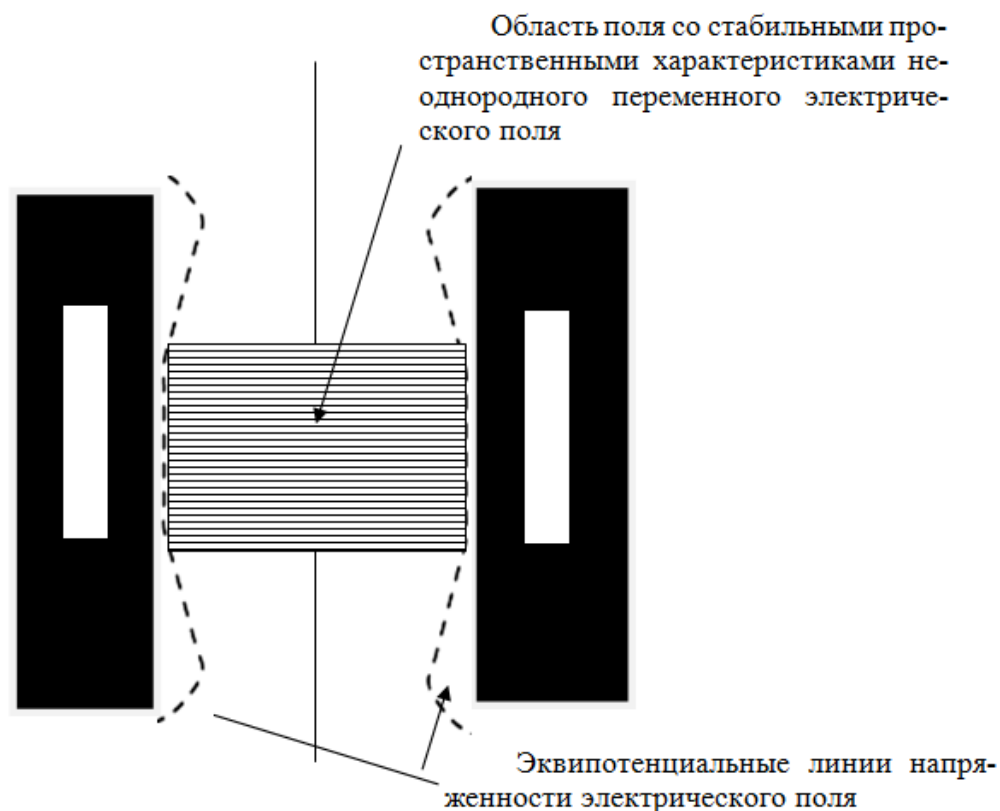


Рисунок 9 – Область поля со стабильными пространственными характеристиками неоднородного переменного электрического поля и эквипотенциальные линии напряжённости электрического поля между электродами в измерительной камере

Изображения эритроцитов, латексных частиц, полученных с помощью микроскопа и видеокамеры, которая устанавливалась в оптический ход микроскопа (тринокулярный путь), передавалось в компьютер. Путём настройки микроскопа на экране монитора добивались изображения с выраженной яркостью, контрастностью и равномерным освещением. На микроскоп устанавливали объектив  $\times 63$  и окуляр  $\times 10$ . Общая подготовка микроскопа к работе, фокусировка на объект (на грани электродов измерительной ячейки, частицы) осуществлялась в соответствии с инструкцией по его эксплуатации.

### 3.3 Стандартная неопределённость типа Б измерительно- вычислительного комплекса коэффициента поляризуемости эритроцитов

Поиск повышения точности измерения ИВК коэффициента поляризуемости эритроцитов осуществлялся путём анализа уравнения (19)

Множитель  $\nabla \mathbf{E}_{\text{cp}}^2$  в знаменателе уравнения (19) приводится к скалярной величине. Модуль произвольного вектора в трехмерном евклидовом пространстве есть скаляр, пропорциональный его длине [101; 102]:

$$|\nabla \mathbf{E}_{\text{cp}}^2| = \sqrt{(\nabla_x \mathbf{E}_{\text{cp}}^2)^2 + (\nabla_y \mathbf{E}_{\text{cp}}^2)^2 + (\nabla_z \mathbf{E}_{\text{cp}}^2)^2},$$

где  $\nabla_x, \nabla_y, \nabla_z$  - компоненты векторного оператора [101].

Суммарная неопределенность типа Б ИВК для поляризуемости  $\left| \frac{d\alpha}{\alpha} \right|$ , находится через частное дифференцирование функции по всем переменным в уравнение (20) [7]. Она не превышает суммы отдельных взятых по модулю неопределенностей типа Б измерения: вязкости суспензии эритроцитов, радиуса эритроцита, скорости его движения и градиента квадрата напряжённости электрического поля в месте его нахождения [103]

$$\delta(\alpha_{\text{кл}}) \leq \left| \frac{d\eta_{\text{cp}}}{\eta_{\text{cp}}} \right| + \left| \frac{dr_{\text{кл}}}{r_{\text{кл}}} \right| + \left| \frac{d\mathcal{E}_{\text{кл}}}{\mathcal{E}_{\text{кл}}} \right| + \left| \frac{d(\nabla \mathbf{E}_{\text{cp}}^2)}{\nabla \mathbf{E}_{\text{cp}}^2} \right|, \quad (24)$$

Слагаемые уравнения позволили обосновано установить вклад каждой частной СНБ в суммарную, сформулировать требования к приборам входящих в состав ИВК с целью повышения его точности [103].



### 3.4 Стандартная неопределённость типа А вязкости клеточной суспензии

Вязкость клеточной суспензии или суспензии латексных частиц существенно зависит от её температуры. С целью определения неопределенности измерения величины вязкости по типу А [103] (как случайной величины) в работе экспериментально проводились измерения вязкости дистиллированной воды и 0,3 М раствора сахарозы с помощью вискозиметра ВПЖ-4 (таблицы 2 и 3). Измерения проводили для 10 проб воды и раствора сахарозы при температуре 20°C, 22°C, 25°C, каждая проба содержала по 50 мл. Объем пробы определялся с помощью мерного стакана объёмом 100 мл. Термостат прогревался до целевой температуры (например, 20°C) не менее 40 минут. Затем в течение 30–40 минут контролировалась и удерживалась температура ручками управления с точностью в пределах  $(20 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ . Вискозиметр, заполненный дистиллированной водой, установили в термостат и осуществляли его нагрев в течение 15 мин. При помощи резиновой груши (спринцовки) 1/3 верхнего резервуара вискозиметра заполняли водой. Открывали канал истечения жидкости. Вода под действием силы тяжести вытекала через капилляр вискозиметра. В момент, когда уровень жидкости достигнет верхней метки мерного объёма вискозиметра, включали секундомер. При достижении уровнем воды нижней метки мерного объёма вискозиметра секундомер выключали.

Измеренное время истечения воды заносили в таблицу 2 и вычисляли среднее арифметическое значение времени истечения жидкости  $T_{\text{cp}}$  в секундах

$$T_{\text{cp}} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n T_i,$$

где ( $n = 10$ ) – количество измерений времени истечения жидкости;

$T_i$  – одно измерение времени истечения жидкости.

Кинематическую вязкость рассчитывают по формуле (из паспорта на вискозиметр)

$$V = \frac{g}{9,807} \cdot K \cdot T,$$

где:  $V$  – кинематическая вязкость жидкости, [м<sup>2</sup>/с];

$g$  – ускорение свободного падения, [м/с<sup>2</sup>];

9,807 – коэффициент пропорциональности, [м/с<sup>2</sup>];

( $K = 0,03421$ ) [м<sup>2</sup>/с<sup>2</sup>] – постоянная вискозиметра;

$T$  – время истечения жидкости, [с].

Таблица 2 – Результаты измерений кинематической вязкости дистиллированной воды

Номер измерения	Время истечения при заданной температуре, с		
	при 20°C	при 22°C	при 25°C
1	30,93	29,24	27,80
2	31,37	29,34	27,87
3	31,28	29,41	27,91
4	31,10	29,39	27,77
5	30,99	29,40	27,67
6	31,13	29,19	27,87
7	30,98	29,21	27,90
8	30,81	29,33	27,68
9	30,69	29,49	27,78
10	30,87	29,37	27,90
$T_{cp}$ , с	31,02	29,34	27,82
$V_{cp}$ , м <sup>2</sup> /с	1,061	1,004	0,952
Плотность воды кг/м <sup>3</sup> [113]	998,2	997,8	996,8
Динамическая вязкость воды Па с	1,06E-03	1,01E-03	9,55E-04

Таблица 3 – Результаты измерений кинематической вязкости 0,3 М раствора сахарозы

Номер измерения	Время истечения при заданной температуре, с		
	при 20°C	при 22°C	при 25°C
1	38,77	36,79	34,38
2	38,74	36,81	34,32
3	38,72	36,71	34,29
4	39,11	36,78	34,39
5	38,32	36,65	34,38
6	38,51	36,51	34,25
7	38,30	36,52	34,30
8	38,26	36,60	34,37
9	38,41	36,45	34,26
10	38,47	36,52	34,67
$T_{cp}$ , с	38,56	36,63	34,36
$V_{cp}$ , мм/с <sup>2</sup>	1,319	1,253	1,175
Плотность раствора 0,3 М сахарозы кг/м <sup>3</sup> [113]	1037,7	1036,8	1035,7
Динамическая вязкость раствора 0,3 М сахарозы воды [Па с]	1,27E-03	1,21E-03	1,13E-03

В работе СНБ измерения вязкости суспензии определялась погрешностью вискозиметра

$$\delta(\eta_{cp}) = \frac{d \cdot \eta_{cp}}{\eta_{cp}} \cdot 100\% = 1\%$$

### 3.5 Обоснование выбора объектива микроскопа измерительно-вычислительного комплекса

Численные оценки показали, что основную долю в суммарную СНБ измерения поляризуемости эритроцита вносит СНБ его радиуса. Это дало основание провести выбор объектива микроскопа с целью уменьшения указанной доли. Выбор объектива является значимым шагом в формировании технических характеристик ИВК и СНБ измерения радиуса эритроцита. Разрешимое расстояние объектива, по существу, есть абсолютная погрешность измерения линейного расстояния, которым характеризуется ИВК.

Разрешимое расстояние объектива, диаметр поля его зрения, количество наблюдаемых эритроцитов, между электродами измерительной ячейки вступают в противоречие между собой. Увеличение кратности и величины апертуры объектива приводит к улучшению разрешимого расстояния микроскопа, но количество наблюдаемых эритроцитов в поле его зрения сокращается. В результате, сокращается выборка наблюдаемых эритроцитов, увеличиваются значения ряда статистических характеристик эритроцитов, например, среднеквадратичного отклонения радиуса эритроцита.

Разрешимое расстояние в оптическом диапазоне между элементами структуры с помощью объектива находится с помощью выражения  $dr = \frac{\lambda}{2 \cdot A}$  и представлено в таблице 4.

Таблица 4 – Разрешимое расстояние в оптическом диапазоне между элементами структуры с помощью объектива [113]

n/n	Кратность увеличения объектива	Длина волны света $\lambda = 550$ нм (Желтый цвет)		Длина волны света $\lambda = 440$ нм. (синий цвет)	
		Апертура окуляра	Разрешимое расстояние $10^{-6}$ м	Апертура окуляра	Разрешимое расстояние $10^{-6}$ м
3	20	0,45	0,61	0,45	0,55
4	40	0,65	0,42	0,65	0,34
5	60	0,85	0,32	0,85	0,26

Среда, которая расположена между объективом и исследуемым эритроцитом, также сказывается на величине СНБ измерения линейного расстояния микроскопа. Увеличение коэффициента преломления среды улучшает разрешимое расстояние микроскопа. Коэффициенты преломления для наиболее часто встречаемых сред между объективом и предметом исследования приведены в таблице 5. Между объективом и препаратом располагается покровное стекло толщиной 0,17 мм. Отклонение толщины покровного стекла для объективов с большой апертурой (0,75–0,95) приводит к ухудшению качества изображения, из-за неполной коррекции сферической аберрации.

Таблица 5 – Коэффициенты преломления, для наиболее часто встречаемых сред между объективом и предметом исследования [113]

n/n	Наименование среды	Коэффициент преломления n
1	Воздух	1
2	Дистиллированная вода	1,33
3	Глицерин	1,49
4	Кедровое масло	1,55

Анализ данных, приведённых в таблицах 4, 5 позволяет сделать выводы:

а) для улучшения разрешимого расстояния микроскопа следует использовать коротковолновые излучения и объектив с большой кратностью увеличения и числовой апертурой, например (60×0,85);

б) между объективом и предметом исследования (эритроцитом) целесообразно использовать воздушную прослойку, что позволит увеличить производительность ИВК, снизить стоимость одного анализа. Устраняются операции подготовки и протирки (промывки водой, спиртом) объектива до наблюдения и после его завершения.

Совокупность представленных выше выводов с учётом расстояния между электродами измерительной камеры в 150 мкм, степенью разведения цельной крови в 30 раз раствором 0,3 М сахарозы, желательным количеством эритроцитов наблюдаемых в поле зрения микроскопа, позволили сделать выбор в пользу объектива с кратностью увеличения 60 и апертурой 0,85. Согласно таблице 4, разрешимое расстояние объектива  $dr_{\text{кл}}$  принимается равным 0,26 мкм, для синего цвета в диапазоне 440 нм.

В результате, СНБ измерения линейного расстояния с помощью ИВК (эритроцитов, латексных частиц) с радиусом ( $r = 3,8$ ) мкм составляет

$$\delta(r_{\text{кл}}) = \frac{dr_{\text{кл}}}{r_{\text{кл}}} = \frac{0,26 \cdot 10^{-6}}{3,8 \cdot 10^{-6}} \cdot 100\% ; 6,8\%$$

СНБ скорости поступательного движения эритроцита является суммарной СНБ измерения расстояния  $\delta(S_{\text{кл}})$  и времени  $\delta(t)$

$$\delta(v_{\text{кл}}) = \frac{dv_{\text{кл}}}{v_{\text{кл}}} = \delta(s_{\text{кл}}) + \delta(t)$$

СНБ измерения расстояния и радиуса эритроцита равны между собой ( $\delta(s_{\text{кл}}) = \delta r_{\text{кл}}$ ). Они определяются разрешающей способностью микроскопа

( $dr_{\text{кл}} = 0,26$ ) мкм. Из условия минимально расстояния, пройденного эритроцитом ( $S_{\text{min}} = 3(r_{\text{кл}})$ ), находится ее СНБ

$$\delta(s_{\text{кл}}) = \frac{dr_{\text{кл}}}{3 \cdot r_{\text{кл}}} = \frac{0,26 \cdot 10^{-6}}{3 \cdot 3,8 \cdot 10^{-6}} \cdot 100\% ; 2,3\% \quad (25)$$

СНБ измерения времени зондирования эритроцита определяется характеристиками частотомера ЧЗ-64, которые приводятся в инструкции по эксплуатации. СНБ длительности зондирования эритроцита равна 1 нс в НПЭП равной 1 нс можно пренебречь. Суммарная СНБ поступательной скорости движения эритроцита составляет

$$\delta(\mathbf{x}_{\text{кл}}) = \delta(s_{\text{кл}}) + \delta(t) = 1,1\% \quad (26)$$

СНБ градиента квадрата напряженности электрического поля (ГКНЭП)  $\left| \frac{d(\nabla \mathbf{E}_{\text{cp}}^2)}{\nabla \mathbf{E}_{\text{cp}}^2} \right|$  складывается из суммы СНБ напряжения на электродах измерительной ячейки и расстояния между электродами в измерительной камере.

Под действием ГКНЭП эритроцит 1 относительно электродов 3, 4 (рисунок 10) приобретает поступательное движение в плоскости сечения X-Y, поэтому ГКНЭП находят из выражения только по двум координатам. Перемещение эритроцита по координате Z не регистрируется.

$$|\nabla \mathbf{E}_{\text{cp}}^2| = \sqrt{(\nabla_x \mathbf{E}_{\text{cp}}^2)^2 + (\nabla_y \mathbf{E}_{\text{cp}}^2)^2} \quad (27)$$

В отличие от эритроцита 1, эритроцит 2 находится непосредственно между электродами 3, 4 и в плоскости X-Y. В этом случае ГКНЭП по направлению Y равен нулю, в результате (28) можно упростить до вида

$$|\nabla \mathbf{E}_{cp}^2| = \sqrt{(\nabla_x \mathbf{E}_{cp}^2)^2}.$$

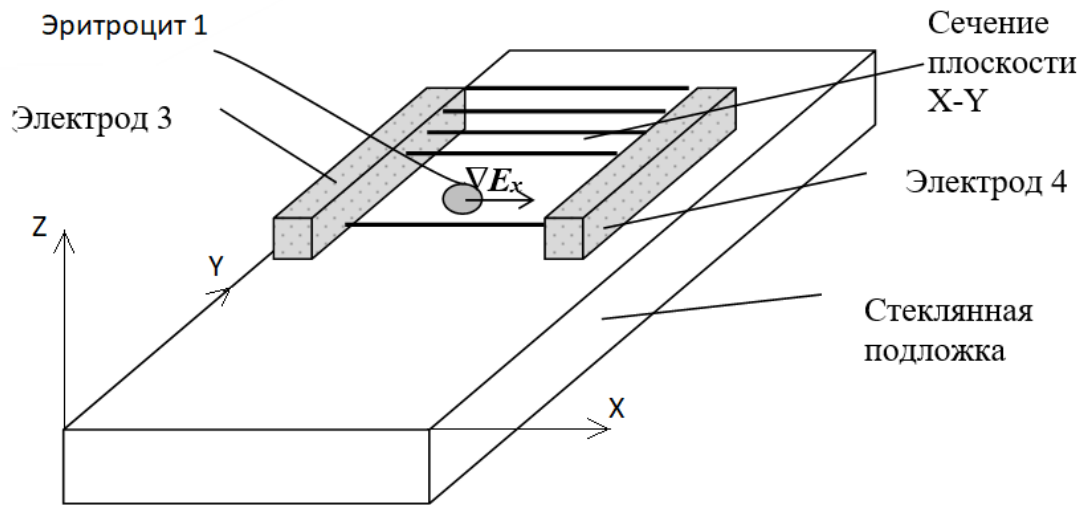


Рисунок 10 – Плоскость X-Y с постоянным градиентом напряжённости электрического поля между электродами

В плоскости между электродами 3, 4 на уровне их граней (рисунок 10) ГКНЭП постоянно, зависит от напряжения  $U$  на электродах и расстояния  $L$  между

ними и описывается функцией  $|\nabla \mathbf{E}_{cp}^2| = \frac{U^2}{L^3}$

Суммарная СНБ ГКНЭП находится из уравнения

$$\left| \frac{d(\nabla \mathbf{E}_{cp}^2)}{\nabla \mathbf{E}_{cp}^2} \right| = \left| 2 \cdot \frac{du}{U} + 3 \frac{dl}{L} \right| \cdot 100\%, \quad (28)$$

где  $\frac{du}{U}$  – СНБ измерения переменного напряжения на электродах измерительной ячейки (для вольтметра В7-37 она составляет 1,0 %);

$dl$  – СНБ измерения расстояния между электродами измерительной ячейки.

СНБ измерения расстояния  $L$  между электродами в измерительной камере рассчитывается следующим образом:



$$\delta(l) = \frac{dl}{L} = \frac{0,26 \cdot 10^{-6}}{150 \cdot 10^{-6}} \cdot 100\% = 1,7\%, \quad (29)$$

где  $dl$  принимается равным разрешающей способности оптического микроскопа – 0,26 мкм.

Таким образом, суммарная СНБ измерений поляризуемости не превышает 17,3 %

$$\delta(\alpha_{\text{кл}}) \leq 6,8\% + 2,3\% + 1,1\% + 2 \cdot 1,0\% + 3 \cdot 1,7\% \leq 17,3\%, \quad (30)$$

Наибольшую долю (~39 %) в СНБ величины поляризуемости вносят измерения радиуса эритроцита.

Для уменьшения суммарной СНБ измерения поляризуемости следует:

- а) проводить измерения поляризуемости эритроцита, если он находится в пространстве между электродами на уровне их граней;
- б) уменьшать СНБ измерения напряжения;
- в) увеличивать расстояние между электродами.

### **3.6 Анализ зависимости динамических вязкоупругих характеристик эритроцита от частоты действующей внешней силы**

Показателями вязкоупругих характеристик эритроцита в уравнения (15) являются его жесткость  $C_{\text{кл}}$  и  $b_{(\text{ср} + \text{кл})}$  – суммарный обобщенный коэффициент вязкости среды и эритроцита.

Под действием внешней силы электрического переменного электрического поля упругие элементы (мембрана, гемоглобин, эндоплазматическая сеть, внутриклеточные белки и др.) накапливают энергию, которая реализуется в виде амплитуды деформации эритроцита. Амплитуду деформации вынужденных колебаний эритроцита описывает уравнение [100]

$$x_{\text{кл}} = \frac{|F_{\text{эл}}|}{m_{\text{кл}} \cdot \sqrt{\left(\frac{c_{\text{кл}}}{m_{\text{кл}}} \cdot \omega^2\right)^2 + 4 \cdot h^2 \cdot \omega^2}} \cdot \sin(\omega t - \gamma), \quad (31)$$

$$\text{где: } h = 6 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{кл}} \cdot \frac{r_{\text{кл}}}{2 \cdot m_{\text{кл}}} \left[ \frac{1}{c^2} \right].$$

Анализ выражения (31) показал, на частоте ( $\omega = 0$ ) находится параметр статической жёсткости  $c_{\text{кл}}$  эритроцита. Знаменатель уравнения (31) позволяет провести анализ динамической жёсткости эритроцита в зависимости от частоты внешнего воздействующего электрического поля. Из решения (31) относительно жёсткости находится квадратное уравнение, корни которого и есть жёсткость эритроцита  $c_1$  и  $c_2$  (см. таблицу 6, рисунок 11).

$$c_{\text{кл}}^2 + 2 \cdot c_{\text{кл}} \cdot m_{\text{кл}} \cdot \omega^2 + m_{\text{кл}}^2 \cdot \omega^4 + (6 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{кл}} \cdot r_{\text{кл}})^2 + \frac{F_{\text{кл}}^2}{x_{\text{д}}^2} = 0, \quad (32)$$

где:  $c_{\text{кл}}$  – жесткость эритроцита;

$x_{\text{д}}$  – амплитуда деформации эритроцита.

Таблица 6 – Зависимость жесткости эритроцита от частоты внешнего воздействия НПЭП

Жесткость $c_1$ [Н/м]	Жесткость $c_2$ [Н/м]	Вязкость $\eta_{\text{кл}}$ [Па·с]	Круговая частота внешнего НПЭП $\omega$ [рад/с]	Амплитуда деформации и $x_{\text{д}}$ [м]	Радиус $r_{\text{кл}}$ [м]	Масса $m_{\text{кл}}$ [кг]	Сила деформации и НПЭП [Н]
$1,2 \cdot 10^{-5}$	$-1,2 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	3,1	$3,0 \cdot 10^{-6}$	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-13}$	$7,1 \cdot 10^{-11}$
$1,2 \cdot 10^{-5}$	$-1,2 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	9,4	$2,9 \cdot 10^{-6}$	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-13}$	$7,1 \cdot 10^{-11}$
$1,8 \cdot 10^{-5}$	$-1,8 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$1,9 \cdot 10^1$	$2,0 \cdot 10^{-6}$	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-13}$	$7,1 \cdot 10^{-11}$

Продолжение таблицы 6

$3,0 \cdot 10^{-5}$	$-3,0 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$3,8 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-13}$	$7,1 \cdot 10^{-11}$
$6,0 \cdot 10^{-5}$	$-6,0 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$6,3 \cdot 10^1$	$6,0 \cdot 10^{-7}$	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-13}$	$7,1 \cdot 10^{-11}$
$1,2 \cdot 10^{-4}$	$-1,2 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^{-7}$	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-13}$	$7,1 \cdot 10^{-11}$
$1,2 \cdot 10^{-4}$	$-1,2 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^{-7}$	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-13}$	$7,1 \cdot 10^{-11}$
$1,2 \cdot 10^{-4}$	$-1,2 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^{-7}$	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-13}$	$7,1 \cdot 10^{-11}$
Примечание: Отрицательное значение жёсткости $c_2$ не имеет физического смысла.							

Как следует из уравнения (32), динамические показатели вязкоупругих свойств эритроцита (жёсткость, вязкость) взаимозависимые. На рисунке 11 приведён график зависимости динамической жёсткости эритроцита при фиксированной  $\eta_{\text{кл}}$  вязкости эритроцита.

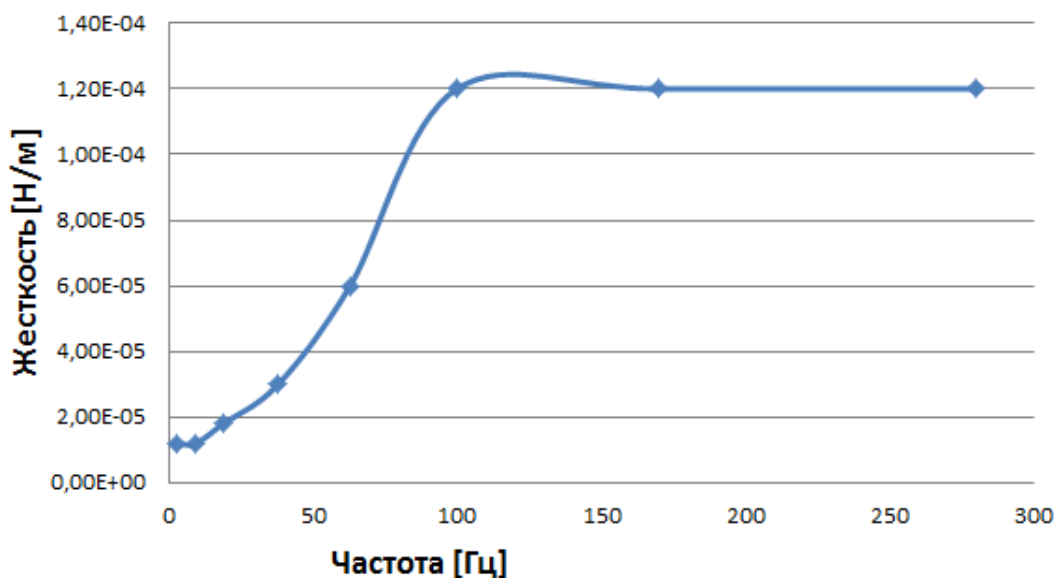


Рисунок 11 – Зависимость жёсткости эритроцита от частоты внешнего воздействия НПЭП с учётом начальной вязкости

В процессе деформации эритроцита, между отдельными её частями объёма и поверхности возникает трение, которое является причиной рассеивания энергии

во внешнюю среду. Линейная сила трения с одной степенью свободы может быть представлена в виде

$$\mathbf{F}_{\text{эл}}(\dot{\mathbf{x}}_{\text{кл}}) = \mathbf{b}_{\text{кл}} \cdot \dot{\mathbf{x}}_{\text{кл}},$$

где:  $\mathbf{b}_{\text{кл}} = 6 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{кл}} \cdot \mathbf{r}_{\text{кл}}$  – коэффициент пропорциональности вязкого трения эритроцита [кг/с].

Известная величина жёсткости  $c_{\text{кл}}$  позволяет определить следующую важную характеристику эритроцита  $\eta_{\text{кл}}$  – динамическую вязкость [Па·с]. В процессе восстановления формы эритроцита при начальном условии ( $\mathbf{F}_{\text{эл}} = 0$ ) слагаемое  $m_{\text{кл}} \ddot{\mathbf{x}}_{\text{кл}}$  в (16) становится равным нулю. Величина вязкости эритроцита, как и его жёсткость зависит от частоты. В результате уравнение для параметра вязкости эритроцита

$$\eta_{\text{кл}} = \frac{c_{\text{кл}}}{12 \cdot \pi^2 \cdot \mathbf{r}_{\text{кл}} \cdot f}, \quad (33)$$

где  $f$  – циклическая частота НПЭП [Гц].

Вывод – найдены динамические показатели вязкоупругих свойств эритроцита, жёсткости и вязкости, а также суспензии.

### 3.7 Исследование зависимости скорости поступательного движения эритроцита от его радиуса и градиента квадрата напряжённости неоднородного переменного электрического поля

Одним из важных параметров в исследовании свойств эритроцита является его скорость поступательного движения в НПЭП. Ожидаемая величина абсолютной величины и динамического диапазона скорости поступательного движения эритроцита позволяет правильно сформулировать требования к техническим характеристикам ИВК, например, к расстоянию между электродами измерительной ячейки. Очевидно, если в своём поступательном движении эритроцит будет перекрывать расстояние между электродами за условную единицу времени, то это приведёт к серьёзным ошибкам измерения поляризуемости и работе ИВК в целом. Зависимость скорости поступательного движения эритроцита от радиуса находится из решения равенства

$$6 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{ср}} \cdot r_{\text{кл}} \cdot \mathcal{K}_{\text{кл}} = 2 \cdot \pi \cdot \varepsilon_{\text{ср}} \cdot \varepsilon_0 \cdot r_{\text{кл}}^3 \cdot \left[ \frac{\varepsilon_{\text{кл}} - \varepsilon_{\text{ср}}}{\varepsilon_{\text{кл}} + 2\varepsilon_{\text{ср}}} \right] \cdot \nabla E_{\text{ср}}^2,$$

находим

$$\mathcal{K}_{\text{кл}} = \frac{r_{\text{кл}}^2 \cdot \varepsilon_{\text{ср}} \cdot \varepsilon_0 \cdot \left[ \frac{\varepsilon_{\text{кл}} - \varepsilon_{\text{ср}}}{\varepsilon_{\text{кл}} + 2 \cdot \varepsilon_{\text{ср}}} \right] \cdot \nabla E_{\text{ср}}^2}{3 \cdot \eta_{\text{ср}}}.$$

Зависимость скорости поступательного движения клетки от радиуса в НПЭП представлена на рисунке 12.

Аналогично, зависимость скорости поступательного движения клетки от градиента квадрата напряжённости электрического поля, рисунок 13.

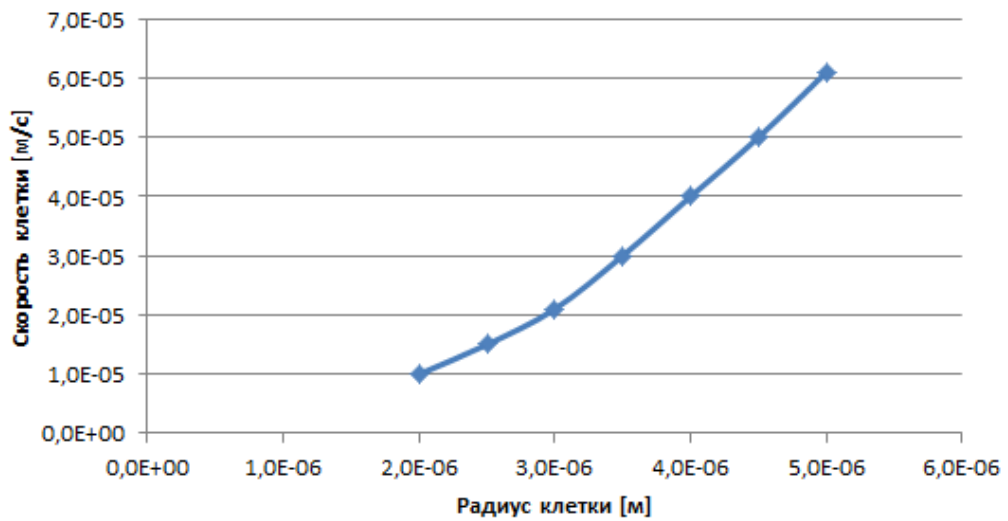


Рисунок 12 – Зависимость скорости поступательного движения эритроцита от

$$\text{радиуса } r_{\text{кл.}} \cdot \nabla E_{\text{эл}}^2 = 2,5 \cdot 10^{13} \left[ \frac{\text{В}^2}{\text{М}^3} \right] \eta_{\text{кл}} = 1,1 \cdot 10^{-3} [\text{Па} \cdot \text{с}]$$

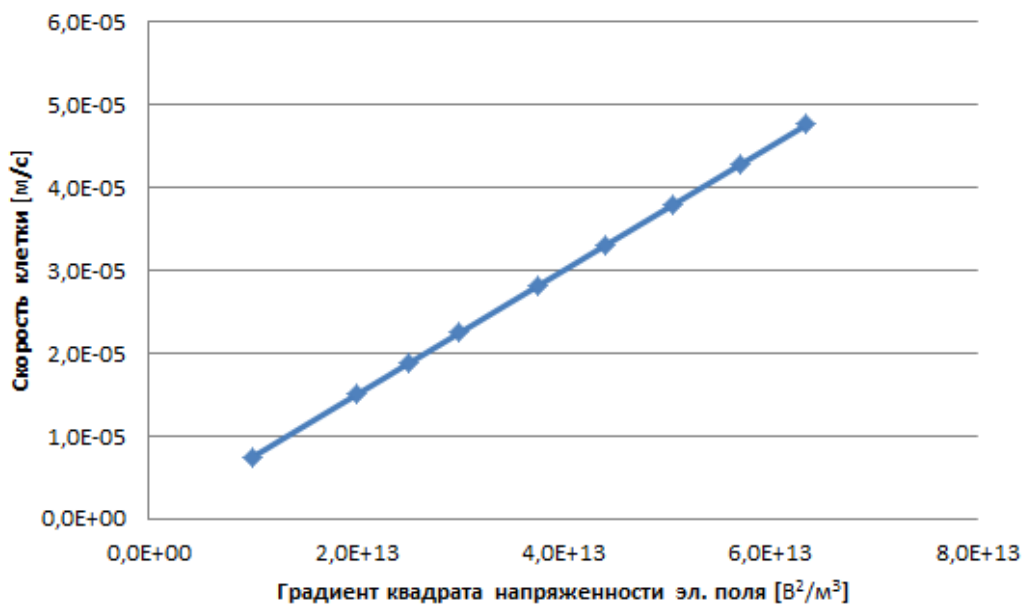


Рисунок 13 – Зависимость скорости поступательного движения эритроцита от градиента квадрата напряженности электрического поля,

$$\eta_{\text{ср}} = 1,1 \cdot 10^{-3} [\text{Па} \cdot \text{с}]$$

### 3.8 Оценка прироста температуры клеточной суспензии за счёт работы, затраченной электрическим полем на трение между эритроцитом и средой

Согласно уравнению (20) поляризуемость эритроцита зависит от вязкости суспензии, в которой она находится. Величина вязкости, в свою очередь, зависит от температуры [103] это может являться причиной, не учтённой ошибки в измерении величины поляризуемости, вязкости клеточной суспензии, скорости деформации и поступательного движения эритроцита. Исходя из этого, проводилась оценка возможного прироста  $\Delta t$  температуры клеточной суспензии за счёт работы, затраченной электрическим полем на трение между эритроцитом и средой. В процессе поступательного или возвратно-колебательного движения эритроцита на границе между набегающим потоком суспензии и клеточной мембраной возникает трение. В результате создаются условия для нагрева суспензии. Энергия  $W_T$ , затраченная электрическим полем на трение между поверхностью сферической частицы и средой, с учётом экспериментально измеренных величин скорости, радиуса и амплитуды колебания эритроцита  $\dot{x}_{кл}$ ,  $r_{кл}$  и  $x_m$  находится прирост  $\Delta t$  температуры из выражений:

$$W_T = 6 \pi \eta_{ср} \dot{x}_{кл} r_{кл} x_m = 6 \cdot 3,14 \cdot 10^{-3} \cdot 1,5 \cdot 10^{-4} \cdot 3,0 \cdot 10^{-6} \cdot 2,4 \cdot 10^{-5} = 2,0 \cdot 10^{-16} \text{ Дж},$$

где:  $\eta_{ср}$  – вязкость клеточной суспензии (воды) [Па·с].

Прирост  $\Delta t$  температуры в объеме отдельной частицы

$$\Delta t = \frac{W_m}{c \cdot m_{кл}} = \frac{2,0 \cdot 10^{-16}}{4200 \cdot 1,8 \cdot 10^{-13}} = 2,6 \cdot 10^{-7} \text{ } ^\circ\text{C},$$

где:  $c$  – теплоемкость частицы (воды) 4200 [Дж/(кг·К)] [103].

Расчеты показали, что величина прироста  $\Delta t$  температуры клеточной суспензии в измерительной камере за счёт трения между клетками и набегающим

потоком жидкости незначительна (таблица 7). В результате, температура клеточной суспензии в процессе измерения принимается как комнатная.

Таблица 7 – Прирост  $\Delta t$  температуры в объёме отдельной клетки в результате трения

Тип движения	Вязкость среды $\eta_{\text{ср}}$ [Па·с]	Скорость движения клетки $\dot{x}_{\text{кл}}$ [м/с]	Радиус клетки $r_{\text{кл}}$ [м]	Амплитуда колебания клетки $x_{\text{д}}$ [м]	Энергия, нагрева одной клетки $W$ [Дж]	Прирост температуры одной клетки $\Delta t$ [Градусы]	Прирост температуры суспензии измерит. камеры от 100 клеток $\Delta t$ [Градусы]
Поступат. движение клетки	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-16}$	$2,8 \cdot 10^{-7}$	$9,8 \cdot 10^{-15}$
Деформац. клетки	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$8,1 \cdot 10^{-16}$	$1,08 \cdot 10^{-7}$	$9,8 \cdot 10^{-15}$
Примечание: $V_{\text{ик}}$ – объем измерительной камеры ( $2 \cdot 10^{-3} \times 1 \cdot 10^{-4} \times 1 \cdot 10^{-4}$ ) м <sup>3</sup> .							

### 3.9 Обоснование времени измерения поступательного движения эритроцита в измерительной камере

Под действием силы электрического поля эритроцит приходит в поступательное движение относительно электродов. Очевидно, измерение скорости следует осуществлять исключительно для одиночных эритроцитов, которые демонстрируют равномерное поступательное движение, исключительно под действием электрического поля. Именно эта скорость позволит правильно провести исследования характеристики каждого эритроцита с помощью ИВК.

Собственные экспериментальные наблюдения, показали, что негативными факторами, влияющими на величину скорости движения эритроцита, являются:



а) трение между мембраной эритроцита и подложкой измерительной камеры;

б) препятствия на пути его движения в виде электродов, соседних эритроцитов, клеточных агрегатов, посторонних частиц в составе клеточной суспензии;

в) адсорбция эритроцита к подложке измерительной камеры.

Перечисленные причины приводят к совершенно непредсказуемым и ошибочным результатам измерения величины скорости поступательного движения эритроцита. Очевидно, чем больше время измерения величины скорости, тем шанс возникновения какого-либо из вышеперечисленных негативных факторов возрастает.

Выбор времени измерения  $\tau_{\text{изм}}$  осуществляется из условия, определенного экспериментально.

$$\tau_{\text{изм}} > (5 - 10) \cdot \tau_{\text{рел}}, \quad (34)$$

где:  $\tau_{\text{рел}}$  – время релаксации клетки, характеристика запаздывания формирования индуцированного дипольного момента эритроцита в переменном электрическом поле относительно внешнего НПЭП.

Соотношение (34) определяет время завершения переходных процессов ионной и электронной поляризации частицы. Теоретическая оценка времени релаксации  $\tau_{\text{рел}}$  частицы микронного размера, как инерционного объекта находится из выражения [78]

$$\tau_p = \frac{2 \cdot r_{\text{кл}}^2 \cdot \mu_{\text{кл}}}{9 \cdot \eta_{\text{ср}}},$$

где:  $\mu_{\text{кл}}$  – удельный вес частицы [кг/м<sup>3</sup>];

$\eta_{\text{ср}}$  – вязкость среды.

В таблице 8 приведены численные оценки времени релаксации латексных частиц.

Таблица 8 – Численные оценки времени релаксации латексных частиц

Время релаксации $\tau_{кл}$ [с]	Вязкость среды $\eta$ [Па·с]	Удельный вес частицы $\mu$ [кг/м <sup>3</sup> ]	Радиус частицы $R_{кл}$ [м]	Временной интервал между двумя соседними кадрами видеофайле $\tau_{вк}$ [с]	Отношение $\tau_{вк}/\tau_p$ [б/р]
$9,3 \cdot 10^{-7}$	$1,05 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^{-6}$	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^4$
$2,1 \cdot 10^{-6}$	$1,05 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^{-6}$	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^3$
$3,7 \cdot 10^{-6}$	$1,05 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^{-6}$	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$8,9 \cdot 10^2$
$5,8 \cdot 10^{-6}$	$1,05 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^{-6}$	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$5,7 \cdot 10^2$

Анализ результатов, представленных в таблице 9 показывает, что частицы с радиусом в диапазоне (2–5) микрон в течение микросекунд способны остановиться (или набрать максимальную скорость) в вязкой водной суспензии.

Видеокамера МС-14 в составе ИВК в режиме 33 кадра в секунду обеспечивает между двумя соседними кадрами в видеофайле интервал времени ( $\tau_{вк} = 0,33 \cdot 10^{-2}$ ) с. Этот интервал удовлетворяет требованию уравнения (34) и является минимальным отрезком времени, в течение которого ИВК способен определить координаты (X, Y) местоположения частицы в измерительной камере, произвести расчёт пройденной дистанции, а также величины её поступательной скорости. Отношение  $\tau_{вк}/\tau_p$  в сотни единиц указывает, что все переходные процессы, связанные с ускорением или торможением клетки в вязкой среде, завершатся.

Таким образом, интервал времени ( $\tau_{вк} = 0,33 \cdot 10^{-2}$ ) с является достаточным временем для измерения скорости поступательного движения частицы в

измерительной камере. Указанный интервал минимизирует влияние ранее перечисленных негативных факторов (трение, препятствие и др.), на определение величины скорости движения частицы, а также позволяет уменьшить размер видеофайла визуализации поведения клетки в измерительной камере и как следствие время его обработки компьютером.

### **3.10 Программное обеспечения измерительно-вычислительного комплекса**

В компьютере использовалось программное обеспечение с помощью которого осуществлялось: управление работой генератора; распознавание образа эритроцита; измерение его радиуса  $r_{кл}$ , амплитуды колебаний  $x_m$ , скорости возвратно поступательного движения  $\dot{x}_{кл}$ . Программное обеспечение имеет следующие дополнительные функциональные возможности: введение наименования пробы и комментарии к ней; управление съёмкой видеофильма, подачей зондирующего сигнала с заданной частотой и напряжением; калибровкой линейного расстояния  $L$  между электродами ИЯ. Программой формировалась последовательность растровых изображений в формате BMP для каждой выбранной частоты из диапазона  $f = (0,05 \div 1) \cdot 10^6$  Гц и производился математический расчёт вспомогательных и статистических характеристик клеточного пула. Длительность одного видеофайла составляла примерно 1,5 с (50 кадров при скорости съёмки 33 кадра в секунду). Программой осуществлялось сканирование поля изображения всех кадров в видеофайле с целью распознавания образа каждого наблюдаемого эритроцита, определения его радиуса, местоположения между электродами в координатах  $X, Y$ . Известные частота кадров, расстояние между электродами ИЯ, координаты каждого отдельно наблюдаемого эритроцита позволили произвести расчёт скорости возвратно-поступательного движения  $\dot{x}_{кл}$ , ожидаемого среднего радиуса  $r_{кл}$  (как случайной величины) для каждого наблюдаемого эритроцита вычислялся по совокупности

измерений во всех кадрах. Программа использует фотофайлы реакции латексных частиц, эритроцитов человека в ответ на воздействие НПЭП.

Системные требования к компьютеру:

- процессор с тактовой частотой не менее 3 ГГц;
- оперативная память не менее 16 ГБ;
- свободное место на жёстком диске 30 МБ для программы, до 300 МБ на каждый анализ (1 ТБ);
- видеоадаптер DirectX версии 9 или более поздней с драйвером WDDM 1.0;
- дисплей 1920 × 1080 пикселей;
- операционная система MS Windows 7 × 64.

Программа соответствует рекомендованным правилам безопасности для управляемого кода. Эти правила сосредоточены на важнейших проблемах существующего кода, в том числе, на потенциальных уязвимостях безопасности, причинах сбоев приложений, других важных логических ошибок и ошибок проектирования.

После запуска исполняемого файла (Test\_SQLite.exe) открывается контрольная панель программы, рисунок 14.

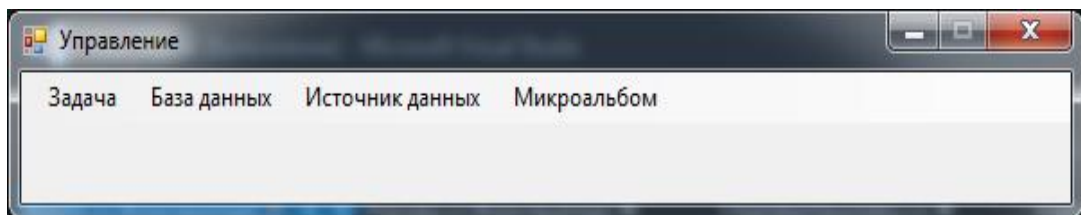


Рисунок 14 – Контрольная панель программы

На контрольной панели представлены: подменю «Задача» для установки параметров эксперимента; «База данных» для обзора и редактирования пациентов и исследователей; «Источник данных» для определения источника входных файлов; «Микроальбом» для запуска программы «Микроальбом» (входит в комплект поставки вместе с микроскопом). Для проведения эксперимента первым шагом следует определить источник входных данных, выбрав элемент подменю

«Загрузить изображения» либо «Видеозахват», выбираем или ранее отснятую последовательность фото файлов, или захват изображений в реальном времени с помощью видеокамеры МС 14, соответственно. При выборе пункта «Видеозахват» откроется форма управления оборудованием – рисунок 15. Пользователь выбирает режимы работы генератора: время его работы; величину напряжения; частоту сигнала; задержку включения камеры (опционально). Основным рабочим режимом камеры является совместная работа с видеокамерой. Отдельно запускается генератор с целью проверки его работоспособности. Имеется также режим ручного управления, исследования реакции образцов на воздействие со стороны внешнего электрического поля. Камера отдельно запускается с целью проверки работоспособности камеры, а также для записи последовательности фото файлов по желанию пользователя. Камера с генератором запускаются для записи последовательности фото файлов при включённом генераторе.

При выборе элемента меню «Загрузить изображения» требуется указать ранее записанную последовательность фото файлов.

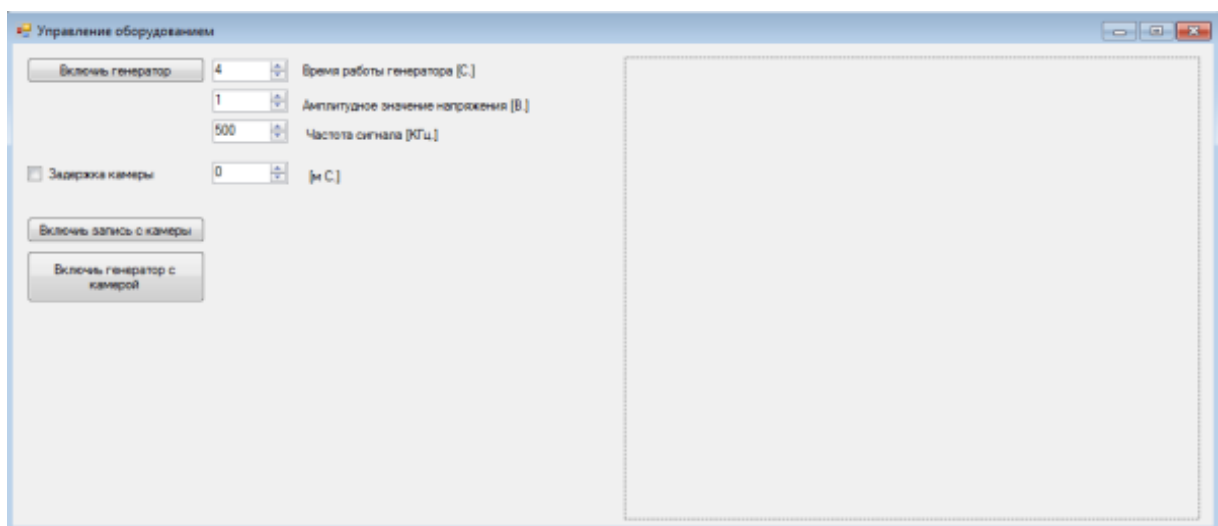


Рисунок 15 – Управление оборудованием

Следующим шагом требуется установить параметры эксперимента через пункт подменю «Задача». Выбрав пункт подменю «Задача», перейти на следующий в иерархии элемент «Новое исследование», в результате откроется форма «Параметры эксперимента» (рисунок 16).

На данной форме следует выбрать исследователя, пациента, напряжение на электродах измерительной ячейки, частоту электрического сигнала и расстояние между электродами измерительной ячейки, затем нажать кнопку «Далее». После чего будет открыта форма («Предпросмотр») (рисунок 17).

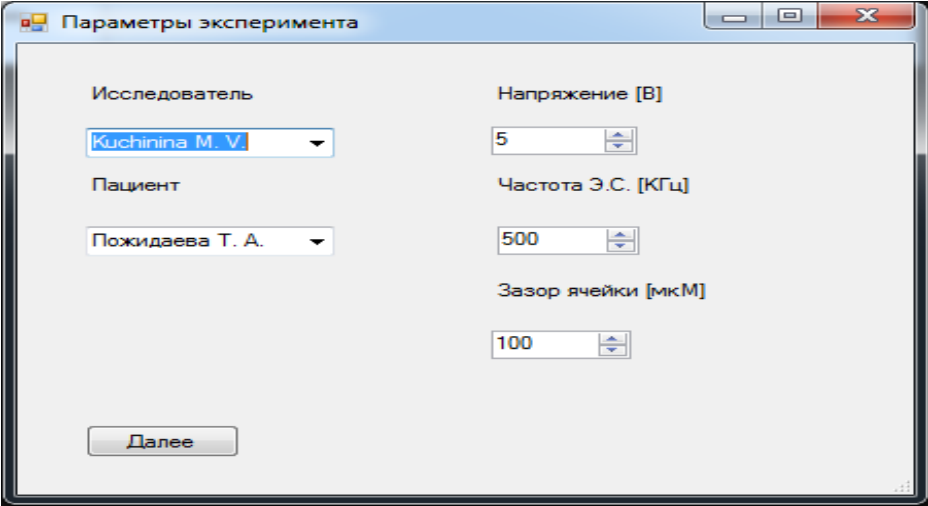


Рисунок 16 – Параметры эксперимента

На форме «Предпросмотр» требуется указать параметры исследования «Порог дискриминации шума», «Степень размытия изображения», «Градиент сигнал – фон», отслеживая при этом качество распознавания объектов (левая и правая часть формы), добиться выделения только нужных объектов (программа обрабатывает только круги, эллипсы, внутренние грани электродов, остальные объекты не обрабатываются). Нажатие кнопки «Старт» – запускается программа обработки кадров, индикация процесса обработки будет меняться. После окончания обработки программа выдаст соответствующее сообщение – «Готово», нажав кнопку «ОК», пользователь получит результаты работы программы в файле Excel (рисунки 17–20).

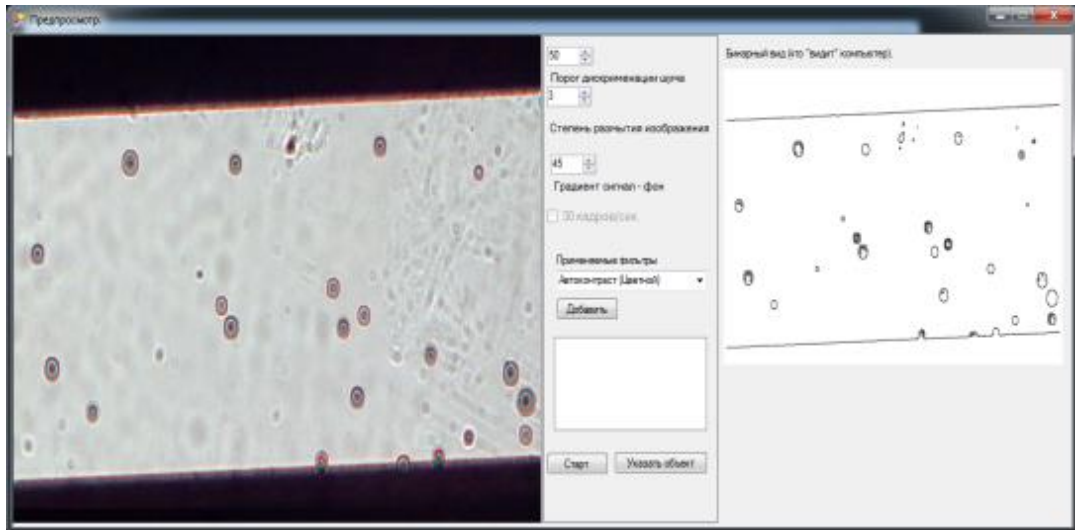
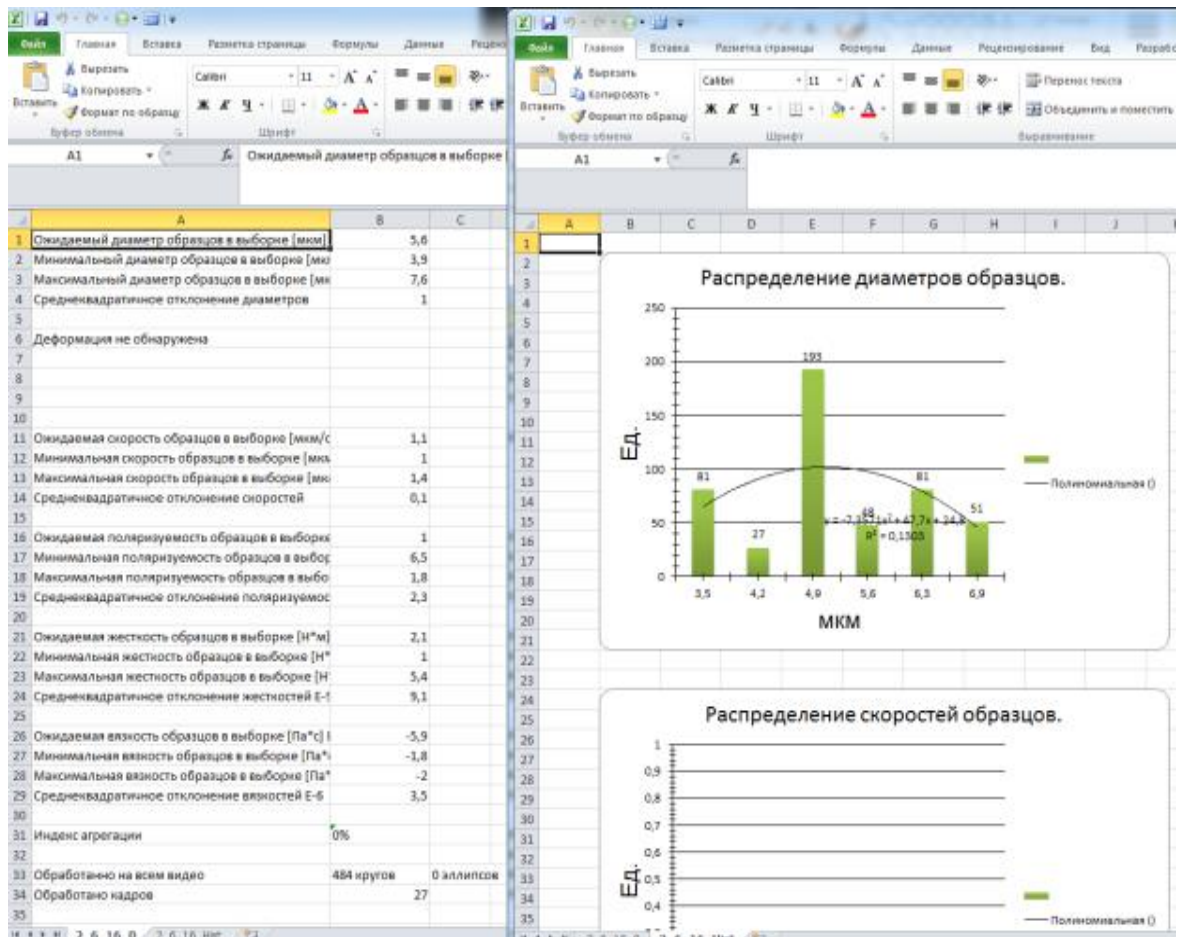
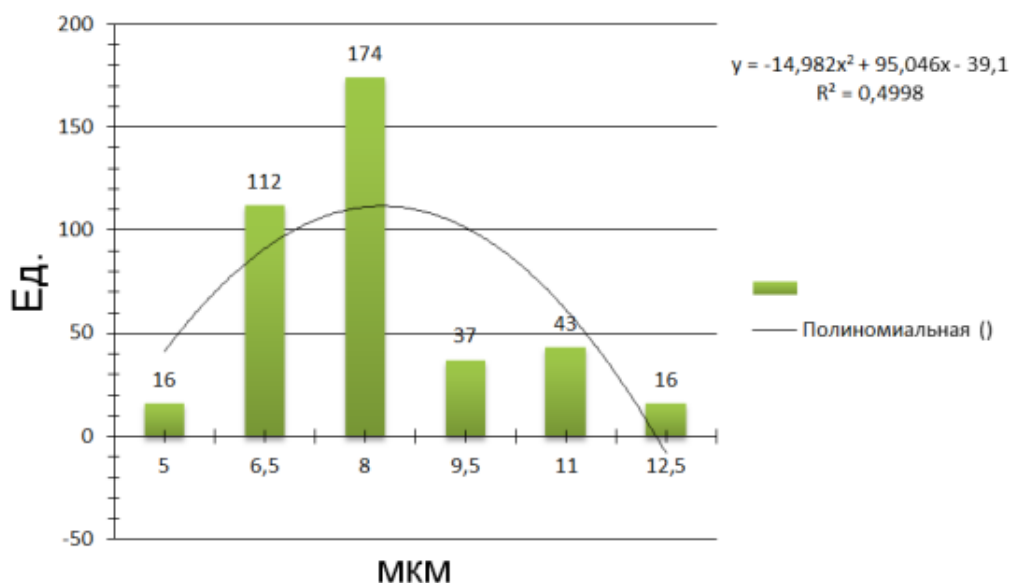


Рисунок 17 – Форма «Предпросмотр»

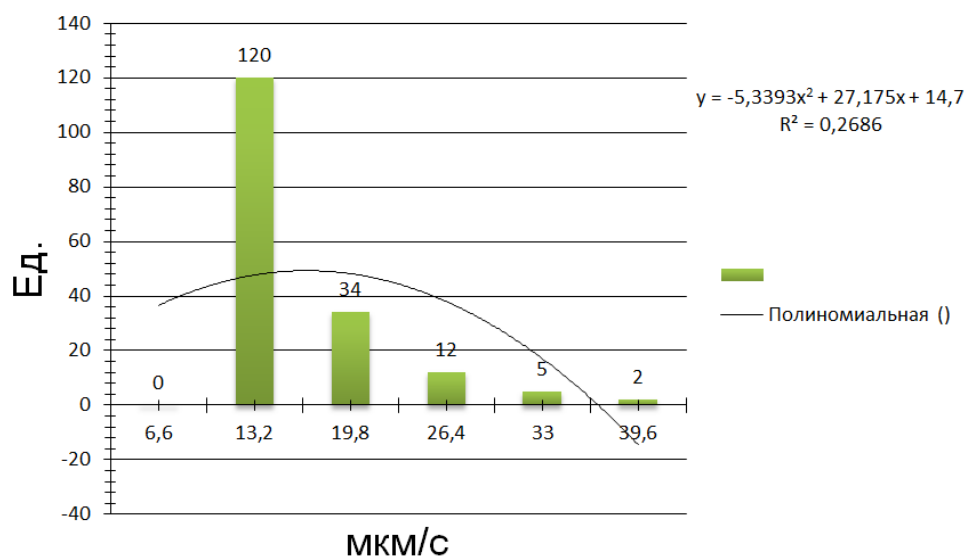


Алгоритм работы программы представлен в приложении К, листинг функции обхода контура приведён в приложении М.



Примечание:  $R^2$ - коэффициент корреляции;  $y$  – уравнение полинома второго порядка.

Рисунок 19 – Распределение диаметров латексных частиц



Примечание:  $R^2$ - коэффициент корреляции;  $y$  – уравнение полинома второго порядка.

Рисунок 20 – Распределение скорости поступательного движения латексных частиц

В таблице 9 представлены результаты измерения латексных частиц со средним диаметром  $5,7 \pm 1,5 \cdot 10^{-6}$  м измерительно-вычислительным комплексом.



Таблица 9 – Результаты измерения параметров латексных частиц со средним диаметром ( $\varnothing = 5,7 \pm 1,5 \cdot 10^{-6}$ ) м измерительно-вычислительным комплексом

Наименование результата	Отсчет 1	Отсчет 2	Отсчет 3	Отсчет 4	Отсчет 5	Отсчет 6	Отсчет 7
Ожидаемый диаметр частиц в выборке $\pm 0,26$ мкм	5,9	5,7	5,2	5,7	5,3	5,8	5,6
Минимальный диаметр частиц в выборке $\pm 0,26$ мкм	4,7	3,5	3,8	3,7	4,2	4,2	3,5
Максимальный диаметр частиц в выборке $\pm 0,26$ мкм	8,2	6,2	7	9,2	7,8	11,8	5,6
Среднеквадратичное отклонение диаметра частиц	1	0,8	1	1,2	0,9	1,2	0,4
Амплитуда деформация частиц [мкм]	< 0,39	< 0,39	< 0,39	< 0,39	< 0,39	< 0,39	< 0,39
Ожидаемая поступательная скорость частиц в выборке [мкм/с]	21,0	15,2	18,0	19,8	17,8	22,5	16,7
СНБ измерения величины поляризуемости частиц	15%	5%	8%	13%	13%	8%	-8%
Теоретическая поляризуемость частиц [м <sup>3</sup> ]	$1,3 \cdot 10^{-14}$	$6,4 \cdot 10^{-15}$	$8,7 \cdot 10^{-15}$	$1,1 \cdot 10^{-14}$	$9,2 \cdot 10^{-15}$	$1,2 \cdot 10^{-14}$	$6,0 \cdot 10^{-15}$
Ожидаемая поляризуемость частиц в выборке [м <sup>3</sup> ]	$1,1 \cdot 10^{-14}$	$6,1 \cdot 10^{-15}$	$8,0 \cdot 10^{-15}$	$9,6 \cdot 10^{-15}$	$8,0 \cdot 10^{-15}$	$1,1 \cdot 10^{-14}$	$6,5 \cdot 10^{-15}$
Количество частиц в выборке	1271	1933	1218	617	2061	1160	1694
Градиент квадрата напряженности эл. поля	$2,5 \cdot 10^{13}$	$2,5 \cdot 10^{13}$	$2,5 \cdot 10^{13}$	$2,5 \cdot 10^{13}$	$2,5 \cdot 10^{13}$	$2,5 \cdot 10^{13}$	$2,5 \cdot 10^{13}$
Вязкость среды	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$
Примечание: Статистическое оценивание осуществлялось согласно [103].							

### 3.11 Разработка опытного образца государственного эталона величины поляризуемости 1-го разряда

С учётом развития прикладных методов диэлектрофореза возникла необходимость в опытном образце государственного эталона поляризуемости<sup>7</sup>. Метрологическое обеспечение сложных технических средств, каким является ИВК, предполагает обязательное наличие системы их контроля, калибровки, которые включают: теоретические знания; единые методы и способы измерений; опытно-конструкторские решения и технологические процедуры. Применительно к ИВК предлагается использовать опытную единицу измерений – поляризуемость с размерностью  $[м^3]$ <sup>8</sup>. Для обеспечения единства измерений необходим эталон. К нему предъявляются следующие требования. Эталон должен сохранять свои параметры в течение длительного интервала времени, обеспечивать воспроизведение, хранение и передачу характеристик.

Современные технологии не в состоянии создать абсолютно одинаковыми все частицы образца в суспензии. В результате, линейные размеры частицы опытного образца в той или иной мере отличаются друг от друга. Латексные частицы, которые использовались в работе, описывается логнормальным распределением [114]:

$$n(d_p) = \frac{N}{\sqrt{2 \cdot \pi \cdot [\ln(\sigma_g)]^2}} \exp \frac{[\ln(d_p) \cdot \ln(d_g)]^2}{2 \cdot [\ln(d_g)]^2} \cdot \frac{1}{d_p},$$

<sup>7</sup> Разработанный образец эталона физической величины поляризуемости, рассмотрен комиссией и утвержден заместителем Федерального агентства по техническому регулированию метрологии, как опытный образец государственный эталон электрической поляризуемости биологических частиц Приложение F. Работы (Контракт от 13.05.2015 года № 120-108 между Росстандартом и ФГУП «СНИИМ»)

<sup>8</sup> Единица измерений поляризуемость  $[м^3]$  используется лауреатом Нобелевской премии Р. Фейнманом для, атомов, молекул, жидкостей, твёрдых диэлектриков, сегнетодиэлектриков [101].

где:  $n(d_p)$  – число частиц диаметра  $d_p$ ;

$d_p$  – диаметр частиц;

$N$  – полное число частиц;

величины  $d_g$  – среднегеометрический диаметр и  $\sigma_g$  – геометрическое стандартное отклонение определяются следующими соотношениями [101]:

$$\ln(d_g) = \frac{1}{N} \cdot \int_0^{\infty} \ln(d_p) \cdot n(d_p) \, d(d_p),$$

$$\ln(\sigma_g) = \frac{1}{N} \cdot \int_0^{\infty} [\ln(d_p) \cdot \ln(d_g)]^2 \cdot n(d_p) \, d(d_p).$$

Степень монодисперсности частиц характеризуется величиной  $\sigma_g$  (сигма), чем ближе она к единице, тем более монодисперсны частицы в выборке. Высокой степенью монодисперсности характеризуются частицы, для которых в распределении ( $\sigma_g \leq 1,05$ ). Величины ( $\sigma_g < 1,01$ ) на практике не достижимы.

В качестве материала эталона поляризуемости используется полистирол. Это жёсткий, хрупкий, аморфный полимер. Он не токсичен, не растворим в воде, обладает высокой влагостойкостью, устойчив к радиоактивному облучению, химически стоек к разбавленным кислотам, спиртам, щелочам, растворяется ацетоном, толуолом, дихлорэтаном. На воздухе при облучении ультрафиолетом подвергается старению, появляются желтизна и микротрещины. Имеет плотность близкую к плотности эритроцитов человека ( $1050 \text{ кг/м}^3$ ). При температуре выше  $60^\circ\text{C}$  свойства материала изменяются [103].

Некоторые актуальные свойства полистирола для создания опытного образца единицы измерения поляризуемости и эксплуатации его в водной среде и электрическом поле приведены в таблице 10.

Устойчивость полистирола к воздействию электрического поля, высокое удельное сопротивление, низкий тангенс диэлектрических потерь и температурный коэффициент линейного расширения также характеризует

неизменность его свойств. Последняя характеристика особенно актуальна, так как усреднённая по времени вынуждающая сила имеет кубическую зависимость от линейного размера частицы (4).

Таблица 10 – Свойства полистирола [103]

Свойства	Значение
Плотность	1050 [кг/м <sup>3</sup> ]
Температурный коэффициент линейного расширения ( $\Delta L/L\Delta T$ )	$6 \cdot 10^{-5}$ [°C <sup>-1</sup> ]
Относительное удлинение	1,2–2 [%]
Удельное сопротивление	$1 \cdot 10^{15}$ [Ом·м]
Относительная диэлектрическая проницаемость	2,49–2,6 [б/р]
Тангенс диэлектрических потерь на частоте 1 МГц	$(3-4) \cdot 10^{-4}$ [б/р]

Внешний вид латексных микрочастиц, которые использовались для калибровки ИВК, приведены на рисунке 21. Использование материалов с плотностью меньше, чем для воды, например, полиэтилена (0,94–0,96 кг/м<sup>3</sup>) нецелесообразно, так как частицы будут выталкиваться на поверхность, всплывать, удаляться от электродов, задевать покрывное стекло.

Разработанный в рамках работы образец эталона физической величины поляризуемости рассмотрен комиссией и утверждён заместителем Федерального агентства по техническому регулированию метрологии, как опытный образец государственного эталон электрической поляризуемости биологических частиц.

### 3.12 Разработка способа определение массы эритроцита

Масса является одной из важнейших характеристик эритроцита, которая стабильно сохраняется в определённых физиологических границах. Проницаемость мембраны для ионов, белков, солей, воды, может стать причиной изменения массы эритроцита [115; 116]. Биологи, врачи, исследователи

оперируют такими характеристиками эритроцита как диаметр, объем, экстраполируя эти величины на массу. Подобная практика связана с тем, что в их распоряжении отсутствует простой, недорогой и доступный метод измерения массы для каждого отдельного эритроцита. Масса эритроцита не зависит от параметров действующей вынуждающей силы электрического поля. В результате при составлении дифференциального уравнения возвратно-поступательного движения эритроцита к исходному положению равновесия, в период отсутствия поля, силу электрического поля  $F_{кл}$  допускается исключить в (15). В результате решение уравнения без правой части значительно упрощается [104]. Если на эритроцит действует внешняя вынуждающая сила электрического поля согласно гармоническому закону, то амплитуда возвратно-поступательного движения  $x_d$  эритроцита, его скорость  $\dot{x}_{кл}$  и ускорение  $\ddot{x}_{кл}$ , строго следуют за полем и в значительной степени определяются его характеристиками [104].

Фазовые зависимости, амплитуды колебания (деформации), скорости и ускорения частицы (эритроцита, клетки) в переменном электрическом поле представлены на рисунке 10.

На частицу в НПЭП действует сила, которая зависит от ее местоположения в пространстве между электродами измерительной ячейки [81]. В зависимости от параметров электрического поля (частоты, амплитуды, напряжённости электрического поля) частицы совершает вынужденные возвратно-поступательные колебания, которое описывается дифференциальным уравнением поля [100]

$$m_{кл} \cdot \ddot{x}_{кл} + b_{(ср+кл)} \cdot \dot{x}_{кл} + c_{кл} \cdot x_d = F_{эл}, \quad (35)$$

где:  $m_{кл}$  – масса частицы [кг];

$\ddot{x}_{кл}$  – ускорение движения произвольной материальной точки на поверхности частицы [ $m/c^2$ ];

$b_{(ср+кл)}$  – суммарный обобщенный коэффициент вязкости среды и частицы [кг/с];

$\dot{x}_{кл}$  – скорость движения произвольной материальной точки на поверхности частицы [м/с];

$c_{кл}$  – жесткость частицы [Н/м];

$x_d$  – амплитуда деформации частицы [м];

$F_{эл}$  – вектор вынуждающей силы, действующий на частицу [Н].

Под действием силы электрического поля частица, как несжимаемое сферическое тело сдвигает ещё и присоединённую массу клеточной суспензии. В результате происходит движение некоторой единой суммарной массы  $M_{кл}$ , которая объединяет массу частицы и присоединённую массу суспензии

$$M_{кл} = m_{кл} + m_{пр}, \quad (36)$$

где:  $m_{кл}$  – масса частицы [кг];

$m_{пр}$  – присоединенная масса прилегающей суспензии [кг].

Присоединенная масса для шара устанавливается половиной от помещенной в его объём окружающей суспензии [117]

$$m_{пр} = \frac{2}{3} \cdot \pi \cdot r_{кл}^3 \cdot \rho_{ср}, \quad (37)$$

где;  $r_{кл}$  – радиус частицы [м];

$\rho_{ср}$  – плотность суспензии, в которой находится частица [кг/м<sup>3</sup>].

На равновесной частоте ( $f_p = 1/t_p$ ,  $F_{эл} = 0$ ), амплитуда деформации частицы также ( $x_d = 0$ ). Это даёт основание записать уравнение (36) возвратно-поступательного движения частицы в виде

$$M_{кл} \cdot \ddot{x}_{кл} + 6 \cdot \pi \cdot \eta_{кл} \cdot r_{кл} \cdot \dot{x}_{кл} = 0$$

Или после преобразования

$$M_{\text{кЛ}} dv_{\text{кЛ}} = -6 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{ср}} \cdot r_{\text{кЛ}} \cdot v_{\text{кЛ}} dt$$

Интегрирования правой и левой части приводит к окончательному виду уравнение возвратно-поступательного движения частицы для равновесной частоты

$$M_{\text{кЛ}} = -6 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{ср}} \cdot r_{\text{кЛ}} \cdot t_p. \quad (38)$$

Из решения уравнения (38) и с учётом (37) находится искомая масса частицы

$$m_{\text{кЛ}} = \left| \frac{6 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{ср}} \cdot r_{\text{кЛ}}}{f_p} - \frac{2}{3} \cdot \pi \cdot r_{\text{кЛ}} \cdot \rho_{\text{кЛ}} \right|. \quad (39)$$

Суммарная СНБ измерения массы частицы  $\left| \frac{dm_{\text{кЛ}}}{m_{\text{кЛ}}} \right|$  определялась на основании уравнения (40). Она находится через частное дифференцирование функции по каждой переменной и не превышает суммы отдельно взятых СНБ:

вязкости суспензии  $\left| \frac{d\eta_{\text{ср}}}{\eta_{\text{ср}}} \right|$ , радиуса частицы  $\left| \frac{dr_{\text{кЛ}}}{r_{\text{кЛ}}} \right|$  и равновесной частоты частицы

$$\left| \frac{df_p}{f_p^2} \right| [103]$$

$$\delta(m_{\text{кЛ}}) \leq \left| \frac{d\eta_{\text{ср}}}{\eta_{\text{ср}}} \right| + \left| \frac{dr_{\text{кЛ}}}{r_{\text{кЛ}}} \right| + \left| \frac{df_p}{f_p^2} \right|, \quad (40)$$

где:  $d\eta_{\text{кЛ}}$  – суммарная СНБ вязкозиметра [Па с];

$dr_{\text{кл}}$  – СНБ измерений радиуса частицы [м] с помощью микроскопа (выбранного объектива);

$df_p$  – СНБ измерений равновесной частоты частицы  $5 \cdot 10^7$  Гц с помощью частотомера ЧЗ-63/1.

В выражении (39) с учётом ожидаемой величины равновесной частоты  $(10 \div 100) \cdot 10^5$  Гц и её небольшой СНБ в процессе измерения частотомером, третьим слагаемым можно пренебречь. Относительная погрешность вискозиметра = 1%, относительная погрешность измерения клетки радиусом  $3,8 \cdot 10^{-6}$  м = 3,4%. В результате, суммарная СНБ массы частицы с радиусом  $3,8 \cdot 10^{-6}$  м не превышает

$$\delta(m_{\text{кл}}) \leq (1 + 3,4) \% \leq 4,4 \%$$

В абсолютном выражении 4,4 % для массы  $25 \cdot 10^{-12}$  кг составляет  $1,1 \cdot 10^{-12}$  кг. Таким образом, экспериментальная масса произвольно выбранной частицы с радиусом  $3,8 \cdot 10^{-6}$  м составляла ( $m_{\text{кл}} = 25 \pm 1,1 \cdot 10^{-12}$ ) кг. В таблице 11 приведены результаты расчётной по формуле (39) и экспериментально измеренной массы отдельно наблюдаемых мелкодисперсных латексных частиц, изготовленных из полистирола.

Экспериментально измерение массы частицы осуществлялось с использованием оригинальной измерительной ячейки (см. рисунок 10). На пластине-матрице между двумя металлическими электродами размещалась измерительная камера с объёмом  $2 \cdot 10^{-3} \times 1 \cdot 10^{-4} \times 1 \cdot 10^{-4}$  м<sup>3</sup>. Между электродами создавалось электрическое поле. Такая конструкция позволяла получить максимально качественное изображение и регистрацию образа частицы в тонком слое жидкости с использованием микроскопа в режиме проходящего света. Измерительная ячейка устанавливалась на подвижный стол микроскопа и входила в состав ИВК.



Для сравнения, с помощью ИВК проводились измерения массы эритроцитов, а также латексных частиц. Используемые латексные частицы обладают стабильным радиусом и устойчивы к воздействию электрического поля, что придавало уверенность в воспроизводимости экспериментальных измерений. Методики подготовки клеток и латексных частиц для проведения измерений массы несколько отличались между собой. Основное отличие состояло в том, что эритроциты помещались в специальный изотонический раствор (ИР) 0,3 М сахарозы<sup>9</sup>, а латексные частицы в дистиллированную воду. ИР позволяет:

- а) привести осмотическое давление эритроцита к физиологическому состоянию;
- б) обеспечить низкую проводимость клеточной суспензии;
- в) поддерживать на эритроците напряжение со стороны внешнего генератора без существенного её нагрева

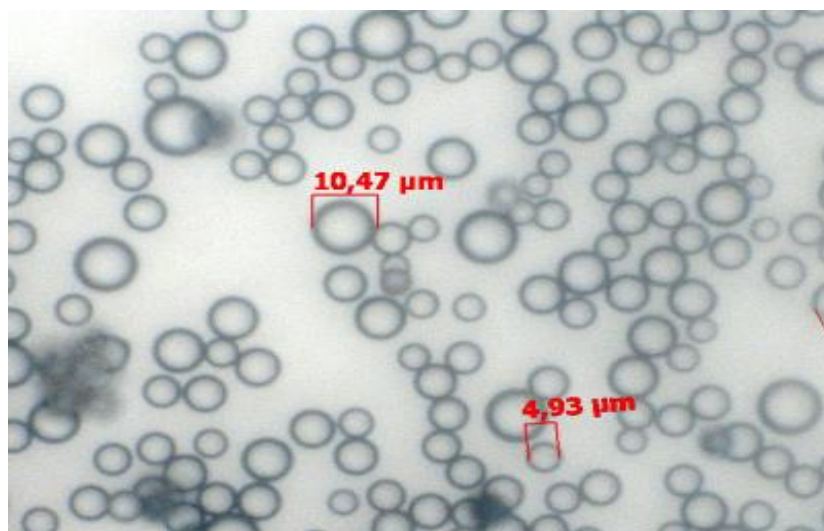


Рисунок 21 – Внешний вид латексных частиц производства Dow Chemical (Indianapolis, США) с диаметром ( $\varnothing = 5,7 \cdot 10^{-6}$  м), и стандартной девиацией

$$\Delta = 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ м}$$

<sup>9</sup> Конечное содержание NaCl в клеточной суспензии составляло 5 мМ.

Таблица 11 – Экспериментальные и рассчитанные величины параметров мелкодисперсных латексных частиц, изготовленных из полистирола

Радиус микрочастицы $r_{\text{ч}}$ [м]	Скорость поступат. движения микрочастицы $\dot{x}_{\text{кл}}$ [м/с]	Ускорение движения микрочастицы $\ddot{x}_{\text{кл}}$ [м/с <sup>2</sup> ]	Равновесная частота $f_{\text{р}}$ [Гц]	Поляризуемост ь микрочастицы $a_{\text{кл}}$ [м <sup>3</sup> ]	Масса Микрочастицы, эксперименталь но измеренная $m_{\text{ч}}$ [кг]	Масса Микрочастицы, теоретически рассчитанная $m_{\text{ч}}$ [кг]	Масса микрочастицы с присоед. $M_{\text{ч}}$ [кг]	Градиент квадрата напряженности эл. поля $\nabla E_{\text{эл}}^2$ [В <sup>2</sup> /м <sup>3</sup> ]
$2,0 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$	5,6	$5,1 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^{-15}$	$3,7 \cdot 10^{-14}$	$3,7 \cdot 10^{-14}$	$7,4 \cdot 10^{-14}$	$2,5 \cdot 10^{13}$
$2,5 \cdot 10^{-6}$	$1,7 \cdot 10^{-5}$	5,6	$3,3 \cdot 10^5$	$7,3 \cdot 10^{-15}$	$7,1 \cdot 10^{-14}$	$7,1 \cdot 10^{-14}$	$1,4 \cdot 10^{-13}$	$2,5 \cdot 10^{13}$
$3,0 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	5,7	$2,3 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^{-14}$	$1,2 \cdot 10^{-13}$	$1,2 \cdot 10^{-13}$	$2,5 \cdot 10^{-13}$	$2,5 \cdot 10^{13}$
$3,5 \cdot 10^{-6}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	6,0	$1,7 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^{-14}$	$2,0 \cdot 10^{-13}$	$2,0 \cdot 10^{-13}$	$4,0 \cdot 10^{-13}$	$2,5 \cdot 10^{13}$
$3,7 \cdot 10^{-6}$	$4,0 \cdot 10^{-5}$	5,9	$1,5 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^{-14}$	$2,3 \cdot 10^{-13}$	$2,3 \cdot 10^{-13}$	$4,7 \cdot 10^{-13}$	$2,5 \cdot 10^{13}$

### Выводы по главе 3

Разработан измерительно-вычислительный комплекс для одновременного измерения следующей совокупности параметров эритроцита:

- объёмный коэффициент поляризуемости;
- равновесная частота;
- индуцированный дипольный момент;
- индуцированный электрический заряд;
- масса;
- амплитуда деформации;
- жёсткость;
- вязкость;
- частота релаксации клеточной деформации.

В результате исследований также установлено, что величина прироста температуры клеточной суспензии в измерительной камере за счёт возникающего трения между эритроцитом и набегающим потоком жидкости незначительна. Она не оказывает влияние на динамическую вязкость суспензии и скорость поступательного движения клетки в измерительной камере.

Принимая также во внимание, что электрические заряды являются неотъемлемой частью всех без исключения клеточных структур, следует также вывод: эритроцит взаимодействует с электрическим полем ровно на столько, насколько позволяют суммарный электрический заряд его составляющих структур: ядра; цитоплазмы; митохондрий; клеточных включений; белков и множества его молекул и т.д.

Измерительно-вычислительный комплекс имеет следующие технические характеристики:

- а) СНБ измерения поляризуемости частиц с помощью ИВК не превышает  $\delta(a_{\text{кл}}) \leq 17,3 \%$ ;

б) наибольшую долю (~38 %) в суммарную СНБ измерения величины поляризуемости вносят измерения градиента напряженности электрического поля.

Для снижения суммарной СНБ измерения величины поляризуемости следует:

- а) использовать вольтметр с более низкой СНБ измерения, например, 1 %;
- б) применить объектив с большим увеличением и апертурой.

Например, объектив с увеличением 60 крат и апертурой 0,85 имеет более высокую разрешающую способность (~0,26 мкм), чем объектив с увеличением  $\times 40$  крат и апертурой 0,65 (~0,50). Следует отметить, что уменьшение суммарной СНБ измерений коэффициента поляризуемости частиц, как правило, приводит к необходимости решения ряда проблем. Среди них: увеличение стоимости комплекса аппаратуры, входящей в состав прибора; удобство эксплуатации; производительность и др.

В работе:

а) разработано и запатентовано оригинальное программное обеспечение, предназначенное для: управления ИВК, распознавания образа клеток; расчёта силовых характеристик НПЭП и коэффициента поляризуемости, жёсткости, вязкости;

б) измерение скорости поступательного движения частиц целесообразно осуществлять в интервале времени ( $\tau_{\text{вк}} = 0,33 \cdot 10^{-2}$ ) с, между двумя соседними кадрами, так как время релаксации частиц с радиусом от 2 до 5 мкм составляет единицы микросекунд;

в) разработан способ измерения массы частиц переменным электрическим полем;

г) показано, что теоретически рассчитанные и экспериментальные измеренные величины массы частиц микронного размера предложенной методикой совпадают между собой с суммарной СНБ, не превышающей 5 %;

д) разработан государственный эталон физической величины поляризуемости на основе латексных частиц микронного размера из полистирола;

е) создана основа для метрологического обеспечения измерения величины поляризуемости частиц микронного размера и её сохранения, а также последующая передача другим приборам для задач медицины, вирусологии, микробиологии, биотехнологии.

## ГЛАВА 4 НЕЛИНЕЙНАЯ ПОЛЯРИЗУЕМОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ В НЕОДНОРОДНОМ ПЕРЕМЕННОМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ

Исследование реакции эритроцитов в ответ на воздействие внешнего НПЭП является актуальной проблемой в вопросах разработки новых экспресс - методов тестирования параметров клетки [74; 117–119].

В электрическом поле наблюдается смещение электрических зарядов клетки относительно положения равновесия, формируется индуцированный дипольный момент и, как следствие, деформация всего клеточного объёма [51]. Эритроцит вытягивается вдоль силовой линий НПЭП, но при этом сохраняет первоначальный объем. Амплитуда деформации эритроцита ограничена его собственной массой и электростатическим отталкиванием одноименных зарядов в замкнутом объёме клетки. Кроме того, индуцированные диполи клетки и эквивалентного объёма клеточной суспензии в НПЭП испытывают вращение вокруг собственной оси. В результате – на частоте, близкой к равновесной визуально, наблюдается вращение клетки как единого целого. Ограничения предела деформации, частота вращения индуцированного дипольного момента клетки формируют подход для анализа нелинейной поляризации эритроцитов.

В работе использовались эритроциты человека, которые получали из цельной крови доноров, взятой из вены. Эритроциты вносились в измерительную камеру, в которой формировали НПЭП. Измерения проводились в диапазоне частот  $f = (10^5 \div 10^6)$  Гц. Видеонаблюдение и регистрация частоты вращения эритроцита вокруг собственной оси осуществилось по положению на его поверхности характерной естественной реперной точки. Измерение периода оборота клетки осуществлялось с помощью электронных часов, встроенных в компьютер.

Собственные экспериментальные наблюдения показали, что в области частот  $(10^5 < f < 4 \cdot 10^5)$  Гц и напряженности электрического поля  $E_{кл} \sim 10^5$  В/м наблюдается медленное вращение эритроцитов вокруг собственной оси с частотой более чем 1 Гц (рисунок 22).

Теоретический анализ показал, что внешнее электрическое поле с частотой  $\omega_{cp}$  и фазой  $\varphi_{cp}$ , приложенное к частице, вызывает перераспределение её положительных и отрицательных зарядов по всему внутреннему объёму. В результате возникают некомпенсированные заряды, которые создают внутри частицы собственное однородное поле с напряжённостью, направленное против внешнего поля [62].

В НПЭП на диполь действует усреднённый по времени вектор силы, который приводит её в движение (2). Вектор напряжённости электрического поля клетки  $\mathbf{E}_{кл}$  следует с частотой  $\omega_{кл}$  и фазой  $\varphi_{кл}$  за вектором  $\mathbf{E}_{кл}$ . Наложение двух гармонических колебаний  $\omega_{кл}$ ,  $\omega_{cp}$  друг на друга приводит к возникновению комбинаций частот  $(\omega_{cp}-\omega_{кл})$ ,  $(\omega_{cp}+\omega_{кл})$  [120]

$$\begin{aligned} & \mathbf{E}_m^{cp} \cdot \sin(\omega_{cp} \cdot t_{cp}) - \mathbf{E}_m^{кл} \cdot \sin(\omega_{кл} \cdot t_{кл}) = \\ & = 2 \cdot \mathbf{E}_m^{cp} \cdot \mathbf{E}_m^{кл} \cdot \cos\left(\frac{(\omega_{cp} \cdot t_{cp}) + (\omega_{кл} \cdot t_{кл})}{2}\right) \cdot \sin\left(\frac{(\omega_{cp} \cdot t_{cp}) - (\omega_{кл} \cdot t_{кл})}{2}\right) \end{aligned} \quad (41)$$

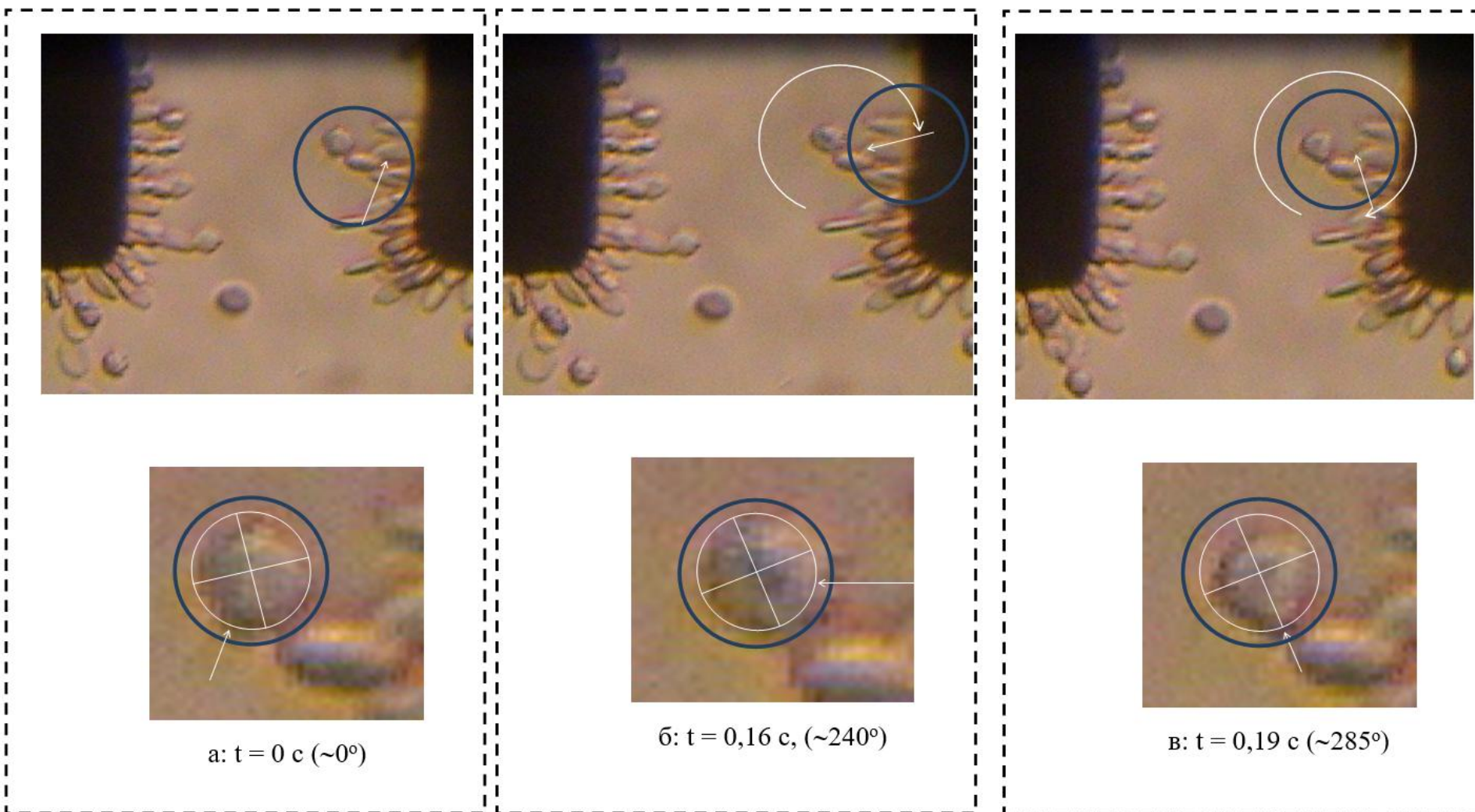


Рисунок 22 – Внешний вид и картины вращения эритроцита вокруг собственной оси с частотой 2,5 Гц в неоднородном переменном электрическом поле (стрелкой отмечена характерная точка на мембране эритроцита, показывающая направление его вращения)



Результирующее колебание не является гармоническим, оно характеризует возникающие биения между двумя колебаниями. В общем случае значения косинуса в уравнение (41) характеризует биения результирующего колебания. Однако для частного случая ( $\omega_{\text{кл}} = \omega_{\text{ср}}$ ), ( $\varphi_{\text{кл}} = \varphi_{\text{ср}}$ ) синус принимает значение равное нулю, что означает отсутствие амплитуды биений и частоты вращения. Сомножитель синуса с учётом равенства ( $\omega_{\text{кл}} = \omega_{\text{ср}}$ ), ( $\varphi_{\text{кл}} = \varphi_{\text{ср}}$ ) и деления аргумента на 2, так же принимает значение равное нулю.

Полученное уравнение описывает вращение векторов напряжённости электрического поля клетки и среды, которое происходит синхронно с точностью до фазы. Если частоты  $\omega_{\text{кл}}$ ,  $\omega_{\text{ср}}$  равны между собой с точностью до фазы ( $\varphi_{\text{кл}} = \varphi_{\text{ср}}$ ), то всякое вращение, поворот вокруг собственной оси невозможны [100]. Для известной электрической модели клетки в жидкой среде, которая состоит из активных сопротивлений и электрических ёмкостей, может выполняться только условия ( $\omega_{\text{кл}} = \omega_{\text{ср}}$ ) и  $|\varphi_{\text{ср}}| - |\varphi_{\text{кл}}| \leq 90^\circ$ , что характеризует её как линейную [120]. Реактивный элемент, конденсатор клетки запасает энергию НПЭП. Активный элемент (сопротивление, проводимость клетки) всю подведённую энергию необратимо преобразует в тепловую.

На рисунке 23 представлена диаграмма-треугольник активного и реактивного сопротивлений, подключённых к переменному электрическому напряжению.

Как следует из рисунка 23 и уравнения (43), какие бы величины не принимали  $R_{\text{кл}}$   $X_{\text{кл}}$  угол  $\varphi$  будет всегда находиться в диапазоне  $0-90^\circ$ . Так как ( $\text{tg}\varphi = \sin\varphi/\cos\varphi$ ), то угол  $\varphi$  и для сомножителей синуса и косинуса уравнения (47) будет находиться также в указанном диапазоне. Вращение модели клетки с линейными компонентами ( $R$ ,  $C$ ) вокруг собственной оси с частотой более чем один градус невозможно.

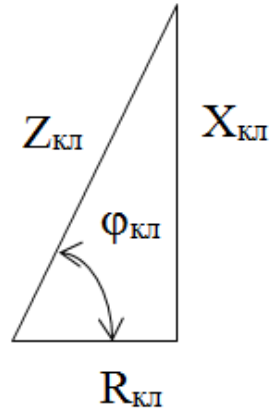


Рисунок 23 – Полное сопротивление  $Z_{\text{ккл}}$ , активное сопротивление  $R_{\text{ккл}}$  реактивное сопротивление (конденсатора)  $X_{\text{ккл}}$  клетки

$$\operatorname{tg} \delta = \frac{R_{\text{ккл}}}{\left( \frac{1}{\omega C_{\text{ккл}}} \right)} = \frac{R_{\text{ккл}}}{X_{\text{ккл}}}. \quad (42)$$

Для нелинейной поляризации клетки требуется выполнение условия ( $\omega_{\text{ккл}} \neq \omega_{\text{ср}}$ ). В случае, если  $(\omega_{\text{ср}} - \omega_{\text{ккл}}) \geq 1$  Гц, наблюдается медленное вращение<sup>10</sup> клетки вокруг собственной оси, которое может быть зарегистрировано и проанализировано с помощью инструментального видеонаблюдения.

Для эритроцита характерная величина трансмембранного потенциала составляет примерно 60 мВ [121]. Указанный потенциал создаёт на мембране потенциальной барьер с напряжённостью электрического поля  $\sim 10^6$  В/м, вектор которого нормален по отношению к клеточной поверхности.

Согласно статистической механике, заряд (ион) должен обладать энергией, чтобы преодолеть общий потенциальной барьер клеточной мембраны  $W_{\text{ом}}(t)$  [101]

<sup>10</sup> Если частоты вращения клетки и среды близки по величине, но не равны между собой  $\omega_{\text{ккл}} \sim \omega_{\text{ср}}$ , то значение сомножителя косинуса в уравнение (48) характеризует медленное вращение клетки вокруг собственной оси, как результирующее колебание (биение).

$$W_{\text{ом}}(t)_{\text{ом}} = q^+ \cdot (U_m(t) \pm U_{\text{cp}}(t)), \quad (43)$$

где:  $q^+$  – единичный положительный заряд иона  $1,6 \cdot 10^{-19}$  [К];

$U_m(t)$  – собственное мгновенное напряжение на мембране [В];

$U_{\text{cp}}(t)$  – напряжение внешней среды, действующее на мембрану  $U_{\text{cp}}(t) \cos \omega_{\text{cp}} t$  [В].

Плотность положительных зарядов, способных преодолеть вышеуказанный барьер, описывается выражением, приведённым в литературе [101]

$$n = n_0 \cdot e^{\frac{-W_m(t) \pm W_{\text{cp}}(t)}{k \cdot T}}, \quad (44)$$

где:  $n$  – Плотность положительных зарядов, способных преодолеть потенциальный барьер клеточной мембраны;

$n_0$  – начальная плотность положительных зарядов на поверхности мембраны в зависимости от концентрации ионов в клеточной суспензии и их теплового равновесия;

$W_m(t)$  – начальная потенциальная энергия мембраны;

$\pm W_{\text{cp}}(t)$  – потенциальная энергия внешней среды, действующая на мембрану [Дж];

$k$  – постоянная Больцмана [Дж/град];  $T$  – абсолютная температура [К].

Экспоненциальная функция (44) может быть переписана через ряд Маклорена [121], который сходится при любом значении  $\frac{-W_m(t) \pm W_{\text{cp}}(t)}{k \cdot T}$ .

$$n(x) = n_0 \left[ 1 + \frac{-W_m(t) \pm W_{cp}(t)}{k \cdot T} + \left( \frac{-W_m(t) \pm W_{cp}(t)}{k \cdot T} \right)^2 + \left( \frac{-W_m(t) \pm W_{cp}(t)}{k \cdot T} \right)^3 + \dots + \left( \frac{-W_m(t) \pm W_{cp}(t)}{k \cdot T} \right)^n + \dots \right]. \quad (45)$$

где:  $n!$  – факториал числа  $n$ .

Если слагаемое  $\frac{-W_m(t) \pm W_{cp}(t)}{k \cdot T} < 1$ , то вкладом слагаемых высших порядков (начиная уже с второго - квадратичного) в (45) можно пренебречь. В результате, плотность зарядов, способных преодолеть потенциальный барьер, носит линейный характер. В случае если показатель степени  $\frac{-W_m(t) \pm W_{cp}(t)}{k \cdot T} > 1$ , то вклад отдельных слагаемых высших порядков, которые и вносят нелинейность, становятся доминирующим. Однако с увеличением значения показателя  $n$  (знаменателя) в (45) наблюдается общая тенденция – величина отдельных слагаемых ряда стремительно убывает. Нелинейность уравнения (45) возникает при условии  $\frac{-W_m(t) \pm W_{cp}(t)}{k \cdot T} \geq 1$ . Удерживая слагаемое  $W_{cp}(t)$  и исходя из классического определения, что электрический ток  $i_m(t)$  является скоростью изменения заряда  $i_m(t) = \frac{dq}{dt}$  уравнение (45) можно переписать в виде суммы токов, которые протекают через мембрану при  $W_m(t) = 0$

$$i_M(t) = \frac{d}{dt} \left[ q^+ \cdot n \cdot \left( 1 + \frac{\pm W_{cp}(t)}{k \cdot t} + \frac{\left( \frac{\pm W_{cp}(t)}{k \cdot t} \right)^2}{2!} + \frac{\left( \frac{\pm W_{cp}(t)}{k \cdot t} \right)^3}{3!} + \dots + \frac{\left( \frac{\pm W_{cp}(t)}{k \cdot t} \right)^n}{n!} + \dots \right) \right] \quad (46)$$

Из уравнения (46) расчётные значения  $\frac{\left( \frac{\pm W_{cp}(t)}{k \cdot t} \right)^n}{n!}$  членов ряда Маклорена в зависимости от их порядкового номера  $n$  представлены на рисунках (24–26).

Продолжая упрощать уравнение (46), приведём его к виду

$$i_M(t) = 0 \pm a \cdot e_M(t) \pm b \cdot (e(t))^2 \pm c \cdot (e(t))^3 \pm \dots \pm y \cdot (e(t))^n \pm \dots, \quad (45)$$

где:  $i_{M0}$  – изменение постоянной составляющей тока мембраны равно нулю

$\frac{d(q^+ \cdot n_0)}{dt} = 0$ ;  $e_M(t) = \pm U_{cp} \cos \omega_{cp} t$  – мгновенное напряжение на мембране;

$a, b, c, y$  – коэффициенты пропорциональности,

в частности,  $a$  – проводимость с размерностью  $[1/\text{Ом}]$ ;

$b$  – соответственно Ампер/Вольт<sup>2</sup>  $[A/V^2]$ ;

$c$  – Ампер/Вольт<sup>3</sup>  $[A/V^3]$ ;

$y$  – Ампер/Вольт <sup>$n$</sup>   $[A/V^n]$ .

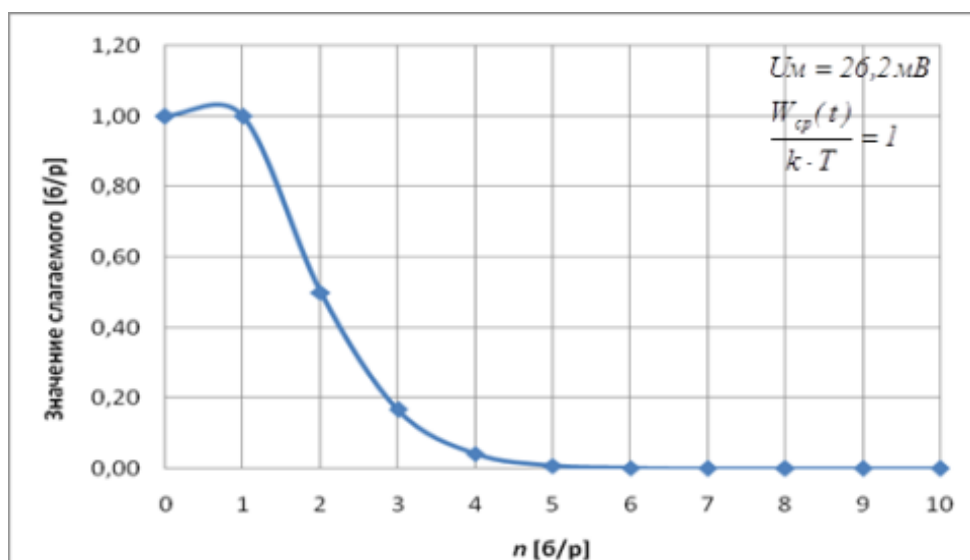


Рисунок 24 – Расчетные значения  $\frac{\pm W_{cp}(t)}{k \cdot T} \cdot n$  слагаемых ряда Маклорена, определяющих величину тока через мембрану клетки в зависимости от  $n$  и ( $U_M = 26,2$ ) мВ напряжения на мембране

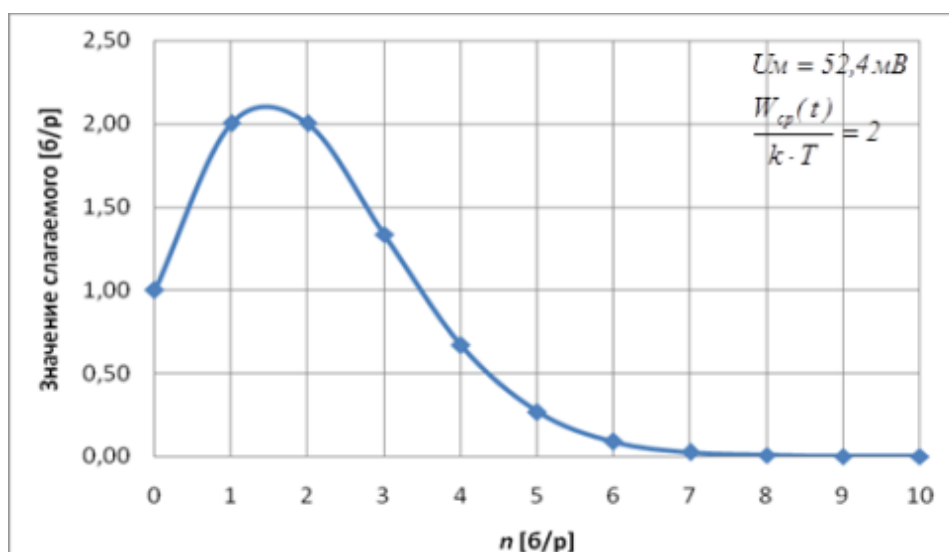


Рисунок 25 – Расчетные значения  $\frac{\pm W_{cp}(t)}{k \cdot T} \cdot n$  слагаемых ряда Маклорена, определяющих величину тока через мембрану клетки в зависимости от  $n$  и ( $U_M = 52,4$ ) мВ напряжения на мембране

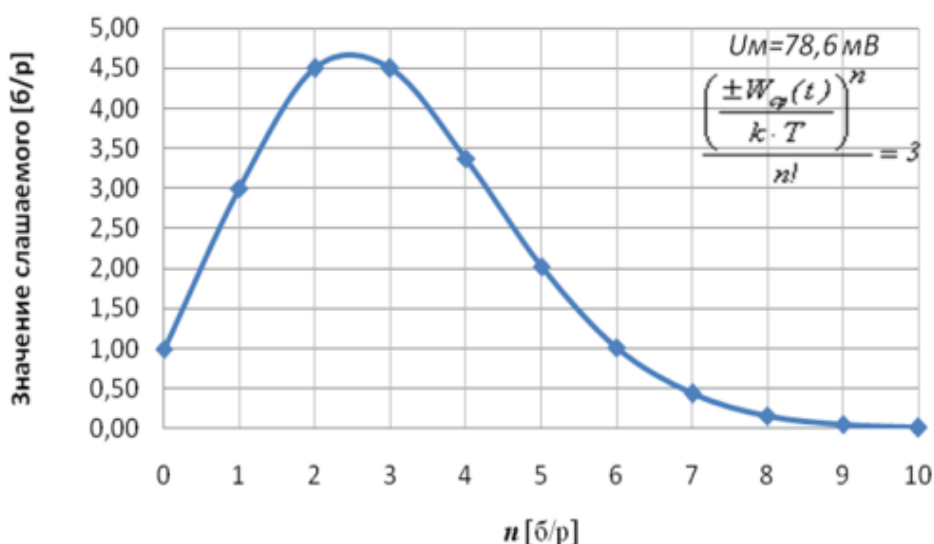


Рисунок 26 – Расчетные значения  $\frac{\pm W_{cp}(t)^n}{k \cdot T \cdot n!}$  слагаемых ряда Маклорена, определяющих величину тока через мембрану клетки в зависимости от  $n$  и ( $U_M = 78,6$ ) мВ напряжения на мембране

Рассматривая частный случай, существования лишь первых трёх слагаемых в уравнение (46) отмечаем, переменный ток мембраны содержит лишь линейную и квадратичную компоненты

$$i_M^{cp}(t) = a \cdot e_M^{cp}(t) + b \cdot e_M^{2cp}(t) = a \cdot U_{cp}(t) \cdot \cos(\omega_{cp} \cdot t) + b \cdot U_{cp}^2(t) \cdot \cos^2(\omega_{cp} \cdot t)$$

Учитывая, что  $\cos^2(\omega_{cp} \cdot t) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cdot \cos(2 \cdot \omega_{cp} \cdot t)$ , запишем

$$i_M(t) = a \cdot U_{cp}(t) \cdot \cos(\omega_{cp} \cdot t) + \frac{b \cdot U_{cp}^2(t)}{2} \cdot \cos(2 \cdot \omega_{cp} \cdot t) \quad (46)$$

Анализ выражения (47) свидетельствует, что суммарный ток через клеточную мембрану обусловлен совокупностью отдельных гармонических

составляющих с частотами  $\omega_{cp}$  и  $2\omega_{cp}$  и постоянной составляющей  $\frac{b \cdot U_{cp}^2(t)}{2}$ .

Данное обстоятельство позволяет рассматривать клетку как нелинейный элемент, который объясняет появление токов клетки с частотой ( $\omega_{кл} \neq \omega_{cp}$ ) и возникновением частотных биений ( $\omega_{cp} - \omega_{кл}$ ), определяющих вращение клетки вокруг собственной оси. Линейная модель поляризации среды или клетки во внешнем переменном электрическом поле является относительно простой. В каждой точке электрическое поле индуцирует в их объёме диполи с гармонической частотой  $\omega_{cp}$ , которая совпадает с внешним. В случае нелинейной поляризации, формирование электрическими зарядами индуцированного дипольного момента клетки связано уже с негармоническим движением. В этом случае энергия циклической частоты  $\omega_{cp}$  внешнего поля переносится на вторую и более высокие гармоники, при этом возникают также множественные комбинации между ними [118]

$$e(t) = E(t) \cdot \cos(\omega_{cp} \cdot t);$$

$$e^2(t) = E^2(t) \cdot \cos^2(\omega \cdot t) = E^2(t) \cdot \frac{1 + \cos(2 \cdot \omega \cdot t)}{2};$$

$$e^2(t) = E^2(t) \cdot \sin^2(\omega \cdot t) = E^2(t) \cdot \frac{1 - \cos(2 \cdot \omega \cdot t)}{2};$$

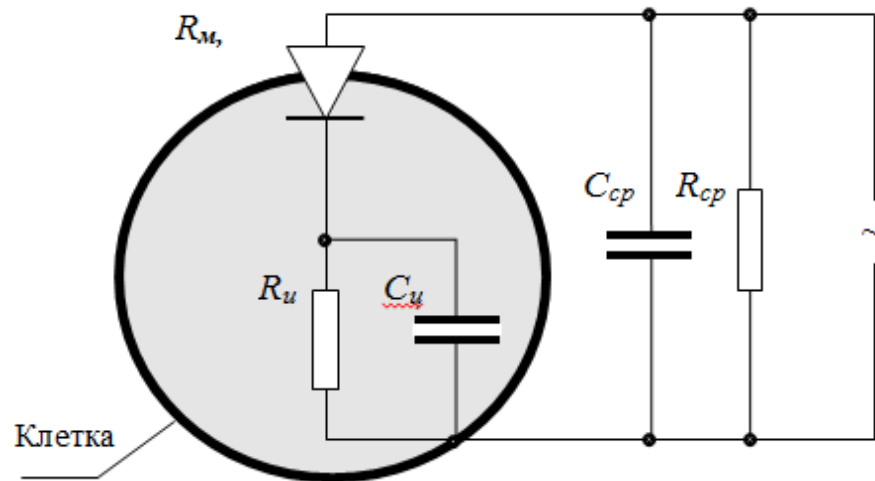
$$e^3(t) = E^3(t) \cdot \cos^3(\omega \cdot t) = E^3(t) \cdot \frac{3 \cdot (\cos(\omega \cdot t))^2 + \cos(3 \cdot \omega \cdot t)}{4};$$

$$e^3(t) = E^3(t) \cdot \sin^3(\omega \cdot t) = E^3(t) \cdot \frac{3 \cdot (\sin(\omega \cdot t))^2 - \sin(3 \cdot \omega \cdot t)}{4}.$$

Анализ выше представленных тригонометрических выражений показывает, что член ряда с показателем степени  $n$  учитывает гармонику  $n$   $\omega t$  электрического тока, проходящую через мембрану клетки. Таким образом, на рисунках 20–23 порядковый номер  $n$  по оси абсцисс определяется гармоникой тока. Полученные экспериментальные данные и проведённый теоретический анализ взаимодействия клетки с переменным электрическим полем позволяют утверждать, что эритроцит (при установленных в работе условиях) может быть представлен нелинейным



элементом с более высокой проводимостью мембраны для положительных ионов в одну сторону, чем в обратном направлении. Это согласуется с известной из литературы селективной проницаемостью мембраны, например, для ионов калия  $K^+$  [122–124]. Интересно заметить, что подобными свойствами различной проводимости в разных направлениях обладает р-п переход в электронных приборах, например, диоде [125]. Частный случай нелинейной эквивалентной электрической схемы клетки, для положительных зарядов, представлен на рисунке 27, где мембрана представлена диодом с нелинейным сопротивлением и емкостью  $R_M C_M$  [126–128].



Примечание:  $C_M$ ,  $C_{ц}$  и  $C_{cp}$  – емкость мембраны, цитоплазмы и среды (клеточной суспензии);  $R_M$ ,  $R_{ц}$ ,  $R_{cp}$  – сопротивление мембраны, цитоплазмы, среды.

Рисунок 27 – Нелинейная эквивалентная электрическая схема клетки для положительных зарядов

#### Выводы по главе 4

В неоднородном переменном электрическом поле с напряжённостью  $E > 10^5$  В/м в частотном диапазоне  $10^5 \div 10^6$  Гц возникает нелинейная поляризуемость эритроцитов человека.

Поляризация эритроцита становится нелинейной в случае превышения напряжения на её мембране  $U_m(t) \geq 26,2$  мВ.

В неоднородном переменном электрическом поле нелинейная поляризуемость эритроцитов является причиной их вращения вокруг собственной оси.

## ГЛАВА 5 ПИЛОТНЫЕ РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ ПОЛЯРИЗУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С УЧЕТОМ ПОЛОВЫХ И ВОЗРАСТНЫХ РАЗЛИЧИЙ

Практическая медицина основана на сравнении, т.е. результат исследования всегда сопоставляется с нормальными величинами, поэтому очень важно определить, что такое «норма» [129]. Понятие «норма» даёт возможность клиническим врачам разделять пациентов на «здоровых» и «больных». Однако в группе здоровых обследуемых эти показатели варьируют, что может быть обусловлено меж – и внутри-индивидуальными особенностями. Термин «нормальные значения» в настоящее время заменён более корректным – «референсные значения» (или референсный<sup>11</sup> интервал – *reference range* – РИ). Термин «референсный интервал» учитывает разные популяции обследуемых, т.е. РИ – это интервал значений, в который включены данные большинства пациентов с характеристиками, аналогичными таковым у референсной группы (группа лиц, при обследовании которой был рассчитан РИ), и исключены другие (с минимальным количеством ложноположительных и ложноотрицательных результатов). Важно учитывать, что РИ являются статистическими данными 95 % популяции [127], при этом у 5 % здоровых лиц обнаруживают «ненормальные» лабораторные показатели, поэтому не все значения, выходящие за область нормальных значений, являются патологическими. Референсный интервал важен в клинической практике как для верификации диагноза, так и для оценки эффективности проводимой терапии. С целью определения референсных интервалов поляризуемости эритроцитов для условно здорового населения Октябрьского района г. Новосибирска проводились исследования с привлечением жителей с учётом возраста и пола. В исследовании приняли участие обследуемые Октябрьского района 347 мужчин и 453 женщины в возрасте от 25 до 44 лет; 45 детей в возрасте от 4 месяцев до 15 лет, а также взрослые - в возрасте от 15 до 24

---

<sup>11</sup> В метрологии используется термин – референтный. См. приказ МЗ РФ № 45/2000

лет и более 44 лет (120 человек), обратившиеся по поводу исследования показателей красной крови, гемостаза в «НИИТПМ». Исследования выполнялись в рамках темы «Мониторинг состояния здоровья и распространённости факторов риска терапевтических заболеваний, их прогнозирование и профилактика в Сибири» (Рег. № 01201282292), в период с февраля 2014 по июль 2016 г. Эритроциты получали из цельной крови пациентов, взятой из вены. Метод приготовления пробы разработан соискателем и описан в [78]. Измерения и вычисления параметров эритроцитов проводили с помощью ИВК. Параметры зондирующего импульса устанавливались следующими: синусоидальное напряжение 10 [В], частотный диапазон  $(0,05 \div 1,00) \cdot 10^6$  Гц. Зазор между электродами в измерительной камере составлял 150 мкм. Обработка результатов выполнялась программным обеспечением, описанным в разделе 3.12. Пилотные установленные значения (УЗ) поляризуемости эритроцитов (Эр) для условно здорового населения Октябрьского района г. Новосибирска с учётом половых и возрастных различий приведены в таблице 12. Анализ данных показал, что величины поляризуемости увеличиваются с ростом частоты во всех возрастных группах и при этом меняют знак с отрицательного на частотах  $0,05, 0,1) \cdot 10^6$  Гц на положительный на частотах  $1, 0,5 \cdot 10^6$  Гц. Поляризуемость эритроцитов для детей и подростков на низких и высоких частотах меньше, чем для людей старшего возраста. Коэффициент внутри-индивидуальной биологической вариации составляет ( $CV_i = 13\%$ ) - возраст пациентов 20–29 лет для мужчин и женщин (таблица 12). В случае если коэффициент групповой вариации неизвестен, то согласно приказу МЗ РФ № 45/2000 от 07.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации», его величина принималась, как удвоенная от внутри-индивидуальной

$$CV_G = 2 \cdot CV_i$$

В результате коэффициент групповой вариации принимался ( $CV_G = 26\%$ ).

Величина групповой и внутри-индивидуальной вариации поляризуемости сравнивалась с распределением эритроцитов по объёму (RDW), полученным методом кондуктометрии и широко используемым в практической медицине.

Данное обстоятельство позволило сравнивать между собой тенденции изменения среднего объёма эритроцитов (MCV), массы и ширины распределения эритроцитов по объёму (RDW), полученные методом кондуктометрии, и поляризуемости (таблица 13). Анализ данных таблицы показал, что внутри-индивидуальная вариация эритроцитов по массе (эквивалент объёму) CVi RDW % и установленные значения (УЗ) CVi коэффициента внутри-индивидуальной вариации поляризации для женщин (Ж) и мужчин (М) практически совпадают. Указанные параметры принимают значения примерно 13–22 %. Данное обстоятельство позволяет сделать вывод о том, что установленные значения CVi коэффициента внутри-индивидуальной вариации поляризации определены правильно. На основании анализа полученных оригинальных данных по величинам поляризуемости эритроцитов, полученных методом диэлектрофореза, и сопоставления их со средним корпускулярным объёмом эритроцитов, установлено, что они соответствуют теоретическим данным и коррелируют с объёмом эритроцитов, интервал которого признан референтным для метода кондуктометрии. На основании этого предложен пилотный референтный интервал поляризуемости эритроцитов в частотном диапазоне  $(0,05 \div 1,00) \cdot 10^6$  Гц для условно здорового населения г. Новосибирска с учётом половых и возрастных различий.

Величины коэффициентов CVi, (таблицы 12 и 13) позволяют сформулировать требования к аппаратной точности измерения поляризуемости эритроцитов с помощью ИВК и удовлетворяющие требованиям практической медицины. Учитывая значения внутри- и групповой биологической вариации коэффициента поляризуемости для здоровых людей, аппаратная точность ИВК должна быть не менее 13 %, (см. таблицу 13). Руководствуясь положениями вышеуказанного приказа МЗ РФ № 45/2000 констатируем, что достигнутая погрешность измерений величины поляризуемости с помощью ИВК, равная

12,6 %, удовлетворяет требованиям медицинской практики. Выполняется неравенство  $12,6\% < 13,0\%$ .

Таблица 12 – Пилотные установленные значения поляризуемости эритроцитов (УЗ ПЭ) для условно здорового населения Октябрьского района г. Новосибирска с учётом половых и возрастных различий

Пол и возраст пациентов	ПЭ. на частоте $0,05 \cdot 10^6$ Гц [м <sup>3</sup> ]	УЗ ПЭ. на частоте $0,05 \cdot 10^6$ Гц [м <sup>3</sup> ]	ПЭ на частоте $0,1 \cdot 10^6$ Гц [м <sup>3</sup> ]	УЗ ПЭ. на частоте $0,1 \cdot 10^6$ Гц [м <sup>3</sup> ]	ПЭ на частоте $0,5 \cdot 10^6$ Гц [м <sup>3</sup> ]	УЗ ПЭ на частоте $0,5 \cdot 10^6$ Гц [м <sup>3</sup> ]	ПЭ на частоте $1 \cdot 10^6$ Гц [м <sup>3</sup> ]	УЗ ПЭ на частоте $1 \cdot 10^6$ Гц [м <sup>3</sup> ]	Среднее значение УЗ	УЗ Ср. квадрати ч. откл	УЗ CVi коэфф. Внутри-индивидуальной вариации поляризации
Дети 4–12 месяцев	$-(0,8 \div 1,1) \cdot 10^{-14}$	$-0,98 \cdot 10^{-14}$	$-(0,9 \div 1,2) \cdot 10^{-14}$	$-1,1 \cdot 10^{-14}$	$(1,2 \div 1,4) \cdot 10^{-14}$	$1,3 \cdot 10^{-14}$	$(1,7 \div 2,2) \cdot 10^{-14}$	$1,9 \cdot 10^{-14}$	$1,2 \cdot 10^{-14}$	$2,0 \cdot 10^{-15}$	17 %
10–13 лет	$-(0,8 \div 1,1) \cdot 10^{-14}$	$-0,98 \cdot 10^{-14}$	$-(0,9 \div 1,2) \cdot 10^{-14}$	$-1,1 \cdot 10^{-14}$	$(1,2 \div 1,4) \cdot 10^{-14}$	$1,3 \cdot 10^{-14}$	$(1,7 \div 2,2) \cdot 10^{-14}$	$1,9 \cdot 10^{-14}$	$1,2 \cdot 10^{-14}$	$2,0 \cdot 10^{-15}$	17 %
13–15 лет	$-(0,9 \div 1,1) \cdot 10^{-14}$	$-1,0 \cdot 10^{-14}$	$-(1,0 \div 1,2) \cdot 10^{-14}$	$-1,1 \cdot 10^{-14}$	$(1,2 \div 1,4) \cdot 10^{-14}$	$1,3 \cdot 10^{-14}$	$(1,8 \div 2,2) \cdot 10^{-14}$	$2,0 \cdot 10^{-14}$	$1,2 \cdot 10^{-14}$	$1,9 \cdot 10^{-15}$	16 %
Мужчины > 15 лет	$-(1,0 \div 1,2) \cdot 10^{-14}$	$-1,1 \cdot 10^{-14}$	$-(1,1 \div 1,3) \cdot 10^{-14}$	$-1,2 \cdot 10^{-14}$	$(1,3 \div 1,6) \cdot 10^{-14}$	$1,4 \cdot 10^{-14}$	$(2,0 \div 2,4) \cdot 10^{-14}$	$2,2 \cdot 10^{-14}$	$1,3 \cdot 10^{-14}$	$2,2 \cdot 10^{-15}$	17 %
Женщины 15–50 лет	$-(1,0 \div 1,2) \cdot 10^{-14}$	$-1,1 \cdot 10^{-14}$	$-(1,1 \div 1,3) \cdot 10^{-14}$	$-1,2 \cdot 10^{-14}$	$(1,3 \div 1,6) \cdot 10^{-14}$	$1,4 \cdot 10^{-14}$	$(2,0 \div 2,4) \cdot 10^{-14}$	$2,2 \cdot 10^{-14}$	$1,3 \cdot 10^{-14}$	$2,2 \cdot 10^{-15}$	17 %
Женщины > 50 лет	$-(1,0 \div 1,2) \cdot 10^{-14}$	$-1,1 \cdot 10^{-14}$	$-(1,1 \div 1,3) \cdot 10^{-14}$	$-1,2 \cdot 10^{-14}$	$(1,3 \div 1,6) \cdot 10^{-14}$	$1,4 \cdot 10^{-14}$	$(2,0 \div 2,4) \cdot 10^{-14}$	$2,2 \cdot 10^{-14}$	$1,3 \cdot 10^{-14}$	$2,2 \cdot 10^{-15}$	17 %
Среднее значение	$1,0 \cdot 10^{-14}$	—	$1,3 \cdot 10^{-14}$	—	$1,5 \cdot 10^{-14}$	—	$2,3 \cdot 10^{-14}$	—	—	—	—
Ср. квадр. откл	$1,3 \cdot 10^{-15}$	—	$7,3 \cdot 10^{-16}$	—	$8,7 \cdot 10^{-16}$	—	$1,1 \cdot 10^{-15}$	—	—	—	—

Таблица 13 – Расчётные значения среднего корпускулярного объёма (MCV), массы и ширины распределения эритроцитов по объёму (RDW) для метода кондуктометрии

Возраст человека (лет)	MCV – средний объем эритроцитов, [мкл]				Средняя плотность эритроцита [кг/м <sup>3</sup> ]	Масса эритроцита, [кг]				Внутри-индивидуальная вариация эритроцитов по массе (эквивалент объёму) CVi RDW для Ж (%)	Внутри-индивидуальная вариация по массе (эквивалент объёму) CVi RDW для М (%)
	Женщины (Ж)		Мужчины (М)			Женщины		Мужчины			
	min	max	min	max		min	max	min	max		
1÷2	72	89	70	90	1096	$7,9 \cdot 10^{-14}$	$9,8 \cdot 10^{-14}$	$7,7 \cdot 10^{-14}$	$9,9 \cdot 10^{-14}$	19	22
3÷6	76	90	76	89	1096	$8,3 \cdot 10^{-14}$	$9,9 \cdot 10^{-14}$	$8,3 \cdot 10^{-14}$	$9,8 \cdot 10^{-14}$	16	15
7÷12	76	91	76	81	1096	$8,3 \cdot 10^{-14}$	$1,0 \cdot 10^{-13}$	$8,3 \cdot 10^{-14}$	$8,9 \cdot 10^{-14}$	16	15
13÷16	79	93	79	92	1096	$8,7 \cdot 10^{-14}$	$1,0 \cdot 10^{-13}$	$8,7 \cdot 10^{-14}$	$1,0 \cdot 10^{-13}$	15	14
20÷29	82	96	81	93	1096	$9,0 \cdot 10^{-14}$	$1,1 \cdot 10^{-13}$	$8,9 \cdot 10^{-14}$	$1,0 \cdot 10^{-13}$	15	13
30÷39	81	98	80	93	1096	$8,9 \cdot 10^{-14}$	$1,1 \cdot 10^{-13}$	$8,8 \cdot 10^{-14}$	$1,0 \cdot 10^{-13}$	17	14
40÷49	80	100	80	94	1096	$8,8 \cdot 10^{-14}$	$1,1 \cdot 10^{-13}$	$8,8 \cdot 10^{-14}$	$1,0 \cdot 10^{-13}$	20	15
50÷59	82	99	82	94	1096	$9,0 \cdot 10^{-14}$	$1,1 \cdot 10^{-13}$	$9,0 \cdot 10^{-14}$	$1,0 \cdot 10^{-13}$	17	13
60÷65	80	100	81	100	1096	$8,8 \cdot 10^{-14}$	$1,1 \cdot 10^{-13}$	$8,9 \cdot 10^{-14}$	$1,1 \cdot 10^{-13}$	20	19
Старше 65 лет	80	99	78	103	1096	$8,8 \cdot 10^{-14}$	$1,1 \cdot 10^{-13}$	$8,5 \cdot 10^{-14}$	$1,1 \cdot 10^{-13}$	19	24



## Выводы по главе 5

1. Предложены пилотные референтные интервалы поляризуемости эритроцитов для здорового населения г. Новосибирска с учётом половых и возрастных различий. Показано, что величины поляризуемости увеличиваются с ростом частоты во всех возрастных группах и при этом меняют знак с отрицательного на частотах  $0,05$ ,  $0,1 \cdot 10^6$  Гц на положительный на частотах  $1$ ,  $0,5 \cdot 10^6$  Гц. Поляризуемость эритроцитов для детей и подростков на низких и высоких частотах меньше, чем для людей старшего возраста. Внутри-индивидуальная вариация эритроцитов по массе (эквивалент объёму) CVi RDW % и установленные значения CVi коэффициента внутри-индивидуальной вариации поляризации для женщин и мужчин практически совпадают, составляя 13–22 %.

2. Точность измерений величины поляризуемости с помощью ИБК составляет 17,3 % и удовлетворяет требованиям практической медицины.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы разработан измерительно-вычислительный комплекс для изучения параметров эритроцитов в медико-биологических исследованиях. В отличие от широко используемых в клинико-диагностических лабораториях гематологических анализаторов, определяющих лишь морфологические параметры клеток красной крови, ИВК даёт возможность одномоментного исследования перечня электрических, вязкоупругих характеристик эритроцитов, значимых для клинической практики.

ИВК имеет ряд существенных преимуществ перед используемыми в научных целях устройствами на основе микропипеточных, эктацитометрических и фильтрационных методов для изучения вязкоупругих показателей эритроцитов. Это возможность исследования параметров большого количества клеток при минимальном объёме исследуемой крови, низкая трудоёмкость, наглядность, получение комплексной информации как о структурных, так и функциональных характеристиках клетки, автоматизированная обработка результатов, наличие метрологической проработки, удобство для пользователя.

Среди полученных результатов, как наиболее значимые, отмечены следующие:

1. Создан измерительно-вычислительный комплекс на базе стандартных измерительных приборов, в состав которого входят генератор переменного напряжения, усилитель переменного напряжения, измерительная ячейка, микроскоп с комплексом визуализации МС-14, компьютер, осциллограф.

2. Предложена конструкция измерительной камеры, которая позволяет сформировать область неоднородного переменного электрического поля со стабильными пространственными характеристиками и минимизировать влияние переходного сопротивления на участке электрод измерительной камеры – мембраны клеток, индуцированных объёмных зарядов клеток друг на друга.

3. Разработано программное обеспечение для ЭВМ «Определение параметров эритроцитов с помощью неоднородного переменного электрического поля», которое обеспечивает обработку большого объема информации, удобство эксплуатации, оптимизацию работы с клетками крови и дает возможность одновременно определять перечень параметров клеток на выбор оператора: радиус, скорость поступательного движения клеток к электродам, амплитуду деформации, вязкость, жёсткость, массу, вычислять коэффициент поляризуемости, и др. Оно является неотъемлемой частью первичной методики измерений поляризуемости биочастиц (эритроцитов) (Свидетельство № 467-RA.RU.311735-2019).

4. Разработан государственный эталон электрической поляризуемости биологических объектов 1-го разряда. Эталон создан на основе сферических частиц из полистирола ОГС-09ЛМ со средним диаметром  $6,0 \cdot 10^{-6}$  м утверждённого типа ГСО 10050-2011. Погрешность измерений величины поляризуемости с помощью ИВК составляет 17,3 %, что соответствует требованиям клиничко-лабораторных исследований. Эталон обеспечивает метрологическую систему передачи величины поляризуемости в России.

5. Разработана методика измерения массы клеток, частиц микронного размера, диспергированных в жидкость, с минимальными временными и материальными затратами.

6. Доказана и теоретически обоснована нелинейность поляризуемости эритроцита путём анализа частоты его вращения вокруг собственной оси в неоднородном переменном электрическом поле.

7. Впервые установлено, что нелинейная поляризуемость эритроцитов человека возникает после превышения трансмембранного потенциала, равного 26,2 мВ.

8. С использованием разработанных подходов определены пилотные референтные значения поляризуемости эритроцитов человека в частотном диапазоне  $(0,05 \div 1,00) \cdot 10^6$  Гц с учётом половых и возрастных различий, что в

перспективе позволит оптимизировать и индивидуализировать диагностику, контроль за эффективностью проводимой терапии патологии внутренних органов.

Измерительно-вычислительный комплекс перспективен для применения в научно-исследовательских учреждениях, специализирующихся в области медицины, вирусологии, микробиологии, ветеринарии, биотехнологии. Внедрение результатов исследования эритроцитов с помощью неоднородного переменного электрического поля с использованием ИВК в практику позволит изучать влияние биологических, физических и химических воздействий на эритроциты с учётом их нелинейных свойств, в перспективе – исследовать взаимодействие клеток между собой. Метод диэлектрофореза открывает новые возможности в этом пока ещё не полностью решённом фундаментальном феномене, в ходе которого комплекс клеток сохраняет свои параметры в физиологическом диапазоне более продолжительное время по сравнению с одиночными клетками в суспензии. Метод позволяет получить новые фундаментальные знания о нелинейной поляризуемости клетки.

Измерительно-вычислительный комплекс был использован в научных медицинских исследованиях и оказался перспективным для изучения особенностей параметров эритроцитов при ряде патологий: ишемической болезни сердца; артериальной гипертензии; цереброваскулярной патологии; диффузной патологии печени различного генеза (вирусный, алкогольный, метаболический) [132]; воспалительных заболеваниях кишечника; колоректальном раке; аутоиммунном гастрите и др. Полученная информация об электрических и вязкоупругих параметрах эритроцитов, недоступная при использовании рутинных лабораторных устройств, позволила оптимизировать, ускорить и повысить точность диагностического процесса, отработать подходы к индивидуализированной терапии и контролем за её эффективностью. Использование комплексов с разными параметрами эритроцитов, предоставляемых ИВК, обеспечивает возможность создания «диагностических панелей» для разных патологий с учётом их патогенеза.

Неоценимым преимуществом разработанного измерительно-вычислительного комплекса является возможность создания метрологического обеспечения, воспроизводимости, единства измерений совокупности параметров эритроцитов, что значимо для медико-биологических исследований.

## ВЫВОДЫ

1. Создан измерительно-вычислительный комплекс одномоментного измерения и исследования комплекса параметров эритроцитов человека в целях медицинской диагностики. Суммарная неопределенность типа Б измерения поляризуемости частиц с помощью ИВК (погрешность измерения) не превышает ( $\delta(\alpha_{\text{ч}}) \leq 17,3 \%$ ).

2. Разработан оригинальный пакет программного обеспечения для измерительно-вычислительного комплекса исследования клетки. Свидетельство о государственной регистрации программы ЭВМ № 2016618155; 25 мая 2016 г.

3. Разработан способ определения массы мелкодисперсных частиц с помощью измерительно-вычислительного комплекса. Патент РФ № 2614735. Опубл. 28.03.2017, Бюл. № 10.

4. Установлено, что поляризация клетки становится нелинейной в случае превышения напряжения на её мембране, равного 26,2 мВ.

5. Разработан образец государственного эталона величины поляризуемости 1-го разряда. Эталон принят межведомственной комиссией, созданной по приказу Росстандарта от 24.11.2016 г. № 1724.

6. Определены пилотные референтные значения поляризуемости эритроцитов с учётом половых и возрастных различий с использованием разработанных подходов.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

$r_{\text{кл}}$	—	радиус клетки [м]
$\alpha_{\text{кл}}$	—	коэффициент объемной поляризуемости клетки (эритроцита) [м <sup>3</sup> ]
$c_{\text{кл}}$	—	жесткость клетки (эритроцита) [Н/м]
$\eta_{\text{кл}}$	—	вязкость клетки (эритроцита) [Па·с]
$\eta_{\text{ср}}$	—	вязкость среды [Па·с]
$C_{\text{м}}$	—	емкость мембраны [Ф]
$m_{\text{кл}}$	—	масса клетки [кг]
$x_{\text{кл}}$	—	амплитуда деформации клетки [м]
$v_{\text{кл}}$	—	скорость движения клетки [м/с]
$a_{\text{кл}}$	—	ускорение движения клетки [м/с <sup>2</sup> ]
$E$	—	напряженность электрического поля [В/м]
$\nabla E_{\text{ср}}^2$	—	градиент квадрата напряженности электрического поля среды [В <sup>2</sup> /м <sup>3</sup> ]
$\omega$	—	круговая частота внешнего электрического поля [рад/с]
б/р	—	безразмерная величина
$\varepsilon_{\text{ср}}$	—	относительная диэлектрическая проницаемость среды [б/р]
$\varepsilon_0$	—	диэлектрическая постоянная $8,85 \times 10^{-12}$ [Ф/м]
$\tau_{\text{р}}$	—	время релаксации [с]
ГКНЭП	—	градиент квадрата напряжённости электрического поля
ДЭФ	—	диэлектрофорез
ИВК	—	измерительно-вычислительный комплекс
НПЭП	—	неоднородное переменное электрическое поле
РИ	—	референсный интервал
СИ	—	международная система единиц, физических величин
СНА	—	стандартная неопределенность типа А, метод оценивания неопределенности путем статистического анализа выборки наблюдений

СНБ – стандартная неопределённость типа Б, метод оценивания неопределённости средств измерений

УЗ – установленные значения



## СПИСОК ТЕРМИНОВ

1. **Апертура (apertura) в оптике:** Характеристика оптического прибора, описывающая его способность собирать свет и противостоять дифракционному размытию деталей изображения.

2. **Неопределенность измерения:** Разброс значений, которые могли бы быть обоснованно приписаны измеряемой величине.

3. **Предел разрешения объектива микроскопа:** Наименьшее расстояние между двумя точками, которые видны в микроскопе раздельно.

4. **Диэлектрофорез:** Перемещение микрочастицы в неоднородном электрическом поле, вызванное взаимодействием между вынужденным (индуцируемым) диполем в микрочастице и внешним электрическим полем.

5. **Равновесная частота:** Частота электрического поля, на которой диэлектрическая проницаемость среды равна диэлектрической проницаемости клетки.

6. **Реперная точка:** Точка на поверхности по которой фиксируется движение объекта.

7. **Референтные значения:** Диапазон значений величины, который считается нормальным для физиологических показателей обследуемых.

8. **Объект-микрометр:** Стеклопластиковая пластинка со шкалой, предназначенная для определения увеличения, линейного поля зрения светового микроскопа.

9. **Время релаксации:** Время, за которое амплитудное значение возмущения в выведенной из равновесия физической системе уменьшается в  $e$  раз ( $e$  - основание натурального логарифма).

10. **Монодисперстность:** Система называется монодисперсной, если входящие в ее состав частицы имеют одинаковый размер.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. К вопросу о дифференциальной диагностике алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени / М. В. Кручинина, С. А. Курилович, А. А. Громов [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 7-1. – С. 36–45.

2. Мартынова, Т. А. Возможности метода микроэлектрофореза эритроцитов в диагностике острого коронарного синдрома / Т. А. Мартынова, Н. И. Максимов, Т. Ю. Назипова // Практическая медицина. – 2015. – № 1. – С. 33–35.

3. Pohl, H. A. Dielectrophoresis. The behavior of neutral matter in nonuniform electric fields / H. A. Pohl. – London, New York, Melbourne : Cambridge University Press, 1978. – 579 p. – ISBN 0521216575.

4. Хронический вирусный гепатит В: взаимосвязь электрических и вязкоупругих характеристик эритроцитов с вирусной активностью / М. В. Кручинина, С. А. Курилович, М. И. Воевода [и др.] // Архивь внутренней медицины. – 2014. – Т. 18, № 4. – С. 64–71.

5. Theoretical and experimental study of the role of cell-cell dipole interaction in dielectrophoretic devices: Application to polynomial electrodes / M. Camarda, G. Fiscaro, R. Anzalone [et al.]. – DOI 10.1186/1475-925X-13-71. – Text : electronic // Biomed. Eng. Online. – 2014. – Vol. 13. – P. 71. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24903282/> (date of access: 12.05.2023).

6. Zhang, H. DEP-on-a-Chip: Dielectrophoresis Applied to Microfluidic Platforms / H. Zhang, H. Chang, P. Neuzil. – DOI 10.3390 /mi10060423. – Text : electronic // Micromachines. – 2019. – Vol. 10, N 6. – P. 423. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31238556/> (date of access: 12.05.2023).

7. Об обеспечении единства измерений : Федеральный закон Российской Федерации от 26.06.2008 № 102-ФЗ (с изменениями на 11.06.2021). – Текст : электронный // КонсультантПлюс : [сайт]. – URL:

[https://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_77904/](https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_77904/) (дата обращения 21.05.2023).

8. Evaluation of a filter aspiration technique to determine membrane deformability / W. H. Reinhart, A. Chabanel, M. Vayo, S. Chien // *J. Lab. Clin. Med.* – 1987. – Vol. 110, N 4. – P. 483–494.

9. Red blood cell distribution width and erythrocyte deformability in patients with acute myocardial infarction / A. Vaya, L. Rivera, R. de la Espriella [et al.] // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2015. – Vol. 59, N 2. – P. 107–114.

10. Assessment of red blood cell deformability in type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy by dual optical tweezers stretching technique / R. Agrawal, T. Smart, J. Nobre-Cardoso [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – N 6. – P. 15873–15876.

11. A review of hemorheology: Measuring techniques and recent advances / P. C. Sousa, F. T. Pinho, M. A. Alves, M. S. N. Oliveira // *Korea-Australia Rheology J.* – 2016. – Vol. 28, N 1. – P. 1–22.

12. Weidman, J. Validated formulae for estimation of whole blood viscosity underestimate the influence of erythrocyte aggregation and deformability / J. Weidman, G. Sloop, J. A. St-Cyr // *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* – 2016. – Vol. 10, N 4. – P. 271–273.

13. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia / V. Kuhn, L. Diederich, T. C. S. Keller [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2017. – Vol. 26, N 13. – P. 718–742.

14. Association of erythrocyte deformability with red blood cell distribution width in metabolic diseases and thalassemia trait / A. Vaya, R. Alis, M. Suescun [et al.] // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2015. – Vol. 61, N 3. – P. 407–415.

15. Decrease in red blood cell deformability is associated with a reduction in RBC-NOS activation during storage / M. Grau, P. Friederichs, S. Krehan [et al.] // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2015. – Vol. 60, N 2. – P. 215–229.

16. Joizsofl, A. F. Ektacytometry of red cells / A. F. Joizsofl // *Subcell. Biochem.* – 1994. – Vol. 23. – P. 161–203.

17. Plasek, J. Determination of undeformable erythrocytes in blood samples using laser light scattering / J. Plasek, T. Marik // *Appl. Opt.* – 1982. – Vol. 21, N 23. – P. 4335–4339.

18. Associations among hemorheological factors and maximal oxygen consumption. Is there a role for blood viscosity in explaining athletic performance? / M. M. Smith, A. R. Lucas, R. L. Hamlin, S. T. Devor // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2015. – Vol. 60, N 4. – P. 347–362.

19. Decrease in red blood cell deformability is associated with a reduction in RBC-NOS activation during storage / M. Grau, P. Friederichs, S. Krehan [et al.] // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2015. – Vol. 60, N 2. – P. 215–229.

20. Associations among hemorheological factors and maximal oxygen consumption. Is there a role for blood viscosity in explaining athletic performance? / M. M. Smith, A. R. Lucas, R. L. Hamlin, S. T. Devor // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2015. – Vol. 60, N 4. – P. 347–362.

21. Rasia, R. J. A numerical method to determine erythrocyte deformability distribution using data from Fraunhofer light diffraction / R. J. Rasia, G. Schutz // *Clin. Hemorheol.* – 1993. – Vol. 13. – P. 641–649.

22. Nikitin, S. Yu. Analysis of laser beam scattering by an ensemble of particles modeling red blood cells in ektacytometer / S. Yu. Nikitin, A. V. Priezzhev, A. E. Lugovtsov // *J. Quan. Spec. Rad. Tran.* – 2013. – Vol. 121. – P. 1–8.

23. НИКИТИН, С. Ю. Упрощенный алгоритм измерения дисперсии деформируемости эритроцитов на основе метода лазерной эктацитометрии / С. Ю. НИКИТИН, Ю. С. Юрчук // *Квантовая электроника.* – 2015. – Т. 45, № 8. – С. 776–780.

24. Bessis, M. A diffractometric method for the measurement of cellular deformability / M. Bessis, N. Mohandas // *Blood Cells.* – 1975. – Vol. 1. – P. 307–313.

25. Streekstra, G. J. Quantification of the poorly deformable red blood cells using ektacytometry / G. J. Streekstra, J. G. G. Dobbe, A. G. Hoekstra // *Opt. Express.* – 2010. – Vol. 18, N 13. – P. 14173–14179.

26. Analysis of light scattering by red blood cells in ektacytometry using global pattern fitting / M. Rabai, H. J. Meiselman, R. B. Wenby [et al.] // *Biorheology*. – 2012. – Vol. 49. – P. 317–328.

27. Mohandas, V. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape / V. Mohandas, J. A. Chasis, S. B. Shobet // *Sem. Hematol.* – 1983. – Vol. 20, N 3. – P. 225–242.

28. Basis, M. Automated ektacytometry: A new method of measuring red cell deformability and red cell indices / M. Basis, N. Mohandes, C. Feo // *Blood Cells*. – 1980. – № 6. – P. 315–327.

29. Осадчий, П. В. Изменение деформируемости эритроцитов в процессе хранения донорской крови / П. В. Осадчий, В. Л. Сигал // *Гематология и трансфузиология*. – 1987. – № 3. – С. 31–34.

30. Lehlond, P. P. The measurement of erythrocyte deformability using micropore membranes. A sensitive technique with clinical applications / P. P. Lehlond, L. Coulombe // *J. Lab. Clin. Med.* – 1979. – Vol. 94, N 1. – P. 133–143.

31. Teitel, P. Le test de la filtrabilite erythrocytaire / P. Teitel // *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* – 1967. – Vol. 7, N 2. – P. 195–214.

32. Reinhart, W. H. Roles of cell geometry and cellular viscosity in red cell passage through narrow pores / W. H. Reinhart, S. Chien // *Am. J. Physiol.* – 1985. – Vol. 248, N 5. – P. 473–479.

33. Сигал, В. Л. Фильтрационные методы определения деформационных (вязкоупругих) свойств мембраны биологических клеток / В. Л. Сигал // *Лабораторное дело*. – 1989. – № 5. – С. 4–9.

34. Левтов, В. А. Реология крови / В. А. Левтов, С. А. Регирер, Н. Х. Шадрина. – Москва : Медицина, 1982. – 272 с.

35. Chabarnel, A. Increased resistance to membrane deformation of shape-transformed human red blood cells / A. Chabarnel, W. Reinhart, S. Chien // *Blood*. – 1987. – Vol. 69, N 2. – P. 739–743.

36. Березовский, В. Л. Профиль концентрации кислорода в клетке и некоторые спорные вопросы перемещения свободного кислорода в биологических объектах / В. Л. Березовский, Б. С. Сушко // Физиологический журнал СССР им. И. М. Сеченова. – 1984. – Т. 30, № 3. – С. 345–353.

37. Burkhard, O. Is it important to separate leucocytes and platelets before measuring the filterability of red blood cells? / O. Burkhard, W. K. R. Barnikol // Brit. J. Haematol. – 1985. – Vol. 60, N 2. – P. 377–380.

38. Acquaye, C. The development of a filtration system for evaluation flow characteristics of erythrocytes / C. Acquaye, E. C. Walker, A. N. Schechter // Microvasc. Res. – 1987. – Vol. 33, N 1. – P. 1–14.

39. Effects of temperature on red cell filtration / R. Fiocco, D. Quattrocchi, M. Neirotti [et al.] // Panminerva Med. – 1984. – Vol. 26, N 3. – P. 193–195.

40. Зинчук, В. В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты / В. В. Зинчук // Успехи физиологических наук. – 2001. – Т. 32, № 3. – С. 66–78.

41. Pohl, H. A. The motion and precipitation of suspensions in divergent electric fields / H. A. Pohl // J. Appl. Phys. – 1951. – Vol. 22, N 7. – P. 869–871.

42. Pohl, H. A. Some effects of nonuniform fields on dielectrics / H. A. Pohl // J. Appl. Phys. – 1958. – Vol. 29, N 8. – P. 1182–1188.

43. Пастушенко, В. Ф. Диэлектрофорез и электровращение клеток: единая теория для сферически симметричных клеток с произвольной структурой мембраны / В. Ф. Пастушенко, П. И. Кузьмин, Ю. А. Чизмаджев // Биологические мембраны. – 1988. – Т. 5, № 1. – С. 65–78.

44. Шилов, В. Н. Диполофорез коллоидных частиц вблизи границы раздела двух сред при полном внутреннем отражении от нее света / В. Н. Шилов, И. А. Разилов, В. Р. Эстрела-Льопис // Коллоидный журнал. – 1987. – Т. 49, № 1. – С. 98–103.

45. Постоянный электрический дипольный момент бактерий и других коллоидных частиц в воде / Н. А. Толстой, А. А. Спартаков, А. А. Трусков, П. Н. Воронцов-Вельяминов // Структура и роль воды в живом организме / под.

ред. М. Ф. Вукса, А. И. Сидоровой. – Ленинград : Изд-во ЛГУ, 1968. – Сб. 2. – С. 72–92.

46.Мирошников, А. И. Использование метода диэлектрофореза для изучения поведения микроорганизмов в неоднородном электрическом поле / А. И. Мирошников, Г. З. Финаков // Вопросы технической кибернетики биологического эксперимента : сб.ст. – Пушкино-на-Оке. – 1974. – С. 94–100.

47.Jones T.B. Basic theory of dielectrophoresis and electrorotation // IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine. 2003. V. 22, N 6. P. 33-42.

48.Schwan, H. P. RF-field interaction with biological systems: electrical properties and biophysical mechanisms / H. P. Schwan, K. P. Foster // Proc. IEEE. – 1980. – Vol. 68, N 1. – P. 104–113.

49.Markx, G. H. Separation of viable and non-viable yeast using dielectrophoresis / G. H. Markx, M. S. Talary, R. Pethig // J. Biotechnol. – 1994. – Vol. 32, N 1. – P. 29–37.

50.Manipulation of herpes simplex virus type 1 by dielectrophoresis / M. P. Hughes, H. Morgan, F. J. Rixon [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – Vol. 1425, N 1. – P. 119–126.

51.Krueger, M. Deformability and stability of erythrocytes in high-frequency electric fields down to subzero temperatures / M. Krueger, F. Thom // Biophys. J. – 1997. – Vol. 73, N 5. – P. 2653–2666.

52.Pethig, R. Apparatus for separating by dielectrophoresis / R. Pethig, G. H. Markx. US Patent 5 814 200. Filing Date 09.26.1995. Application Number 08/530131. Publication Date 09.29.1998.

53.Shen, Y. A novel concept of dielectrophoretic engine oil filter / Y. Shen, E. Elele, B. Khusid // Electrophoresis. –2011. – Vol. 32, N 18. – P. 2559–2568.

54.Евстрапов, А. А. Физические методы управления движением и разделением частиц в жидких средах. Диэлектрофорез, фотофорез, оптофорез, оптический пинцет / А. А. Евстрапов // Научное приборостроение. – 2005. – Т. 15, № 1. – С. 3–20.

55. Correlations between the dielectric properties and exterior morphology of cells revealed by dielectrophoretic field-flow fractionation / P. R. C. Gascoyne, S. Shim, J. Noshari [et al.] // *Electrophoresis*. – 2013. – Vol. 34, N 7. – P. 1042–1050.

56. Jones, T. B. *Electromechanics of particles* / T. B. Jones. – New York : Cambridge University Press, 1995. – 265 p.

57. AC electrokinetics: a review of forces in microelectrode structure / A. Ramos, H. Morgan, N. G. Green, A. Castellanos // *J. Phys. D: Appl. Phys.* – 1998. – Vol. 31, N 18. – P. 2338–2353.

58. Green, N.G. AC electrokinetics: a survey of sub-micrometer particle dynamics / N. G. Green, N. Ramos, H. Morgan // *J. Phys. D: Appl. Phys.* – 2000. – Vol. 33, N 6. – P. 632–641.

59. Dielectrophoretic manipulation of cells with spiral electrodes / X.-B. Wang, Y. Huang, X. Wang [et al.] // *Biophys. J.* – 1997. – Vol. 72, N 4. – P. 1887–1899.

60. Electrohydrodynamic controlled assembly and fracturing of thin colloidal particle films confined at drop interfaces / Z. Rozynek, P. Dommersnes, A. Mikkelsen [et al.] // *Eur. Phys. J. Spec. Top.* – 2014. – Vol. 223. – P. 1859–1867.

61. Zimmerman, U. Rotation of cells in an alternating electric field: the assurance of a resonance frequency / U. Zimmerman, J. Vienken, G. Pilwat // *Z. Naturforsch.* – 1981. – Vol. 36, N 1–2. – P. 173–177.

62. Ландау, Л. Д. Теоретическая физика. В 10 т. / Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц. – Москва : Наука, 1982. – Т. 8. Электродинамика сплошных сред / Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц. – 620 с.

63. Electrorotation of lymphocytes – the influence of membrane events and nucleus / H. Ziervogel, R. Glaser, D. Schadow, S. Heymann // *Biosci. Rep.* – 1986. – Vol. 6, N 11. – P. 973–982.

64. Miller, R. D. Electro-orientation of ellipsoidal erythrocytes. Theory and experiment / R. D. Miller, T. B. Jones // *Biophys. J.* – 1993. – Vol. 64, N 5. – P. 1588–1595.



65. Goater, A. D. Electrorotation and dielectrophoresis / A. D. Goater, R. Pethig // *Parasitology*. – 1998. – Vol. 117, N 7. – P. 177–189.
66. Arnold, W. M. Surface conductance and other properties of latex particles measured by electrorotation / W. M. Arnold, H. P. Schwan, U. Zimmermann // *J. Phys. Chem.* – 1987. – Vol. 91, N 19. – P. 5093–5098.
67. Differentiation of viable and non-viable bacterial biofilms using electrorotation / X.-F. Zhou, G. H. Markx, R. Pethig, I. M. Eastwood // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – Vol. 1245, N 1. – P. 85–93.
68. Dielectric characterization of bacterial cells using dielectrophoresis / A. Sanchis, A. P. Brown, M. Sancho [et al.] // *Bioelectromagnetics*. – 2007. – Vol. 28, N 5. – P. 393–401.
69. Ratanachoo, K. Detection of cellular responses to toxicants by dielectrophoresis / K. Ratanachoo, P. R. C. Gascoyne, M. Ruchirawat // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – Vol. 1564, N 2. – P. 449–458.
70. Улащик, В. С. Электрофорез лекарственных веществ: рук. для специалистов / В. С. Улащик. – Минск : Беларуская навука, 2010. – 404 с.
71. Gimsa, J. Characterisation of virus - red cell interaction by electrorotation / J. Gimsa, C. Pritzen, E. Donath // *Stud. Biophys.* – 1989. – Vol. 130, N 1–3. – P. 123–131.
72. ApoStream™, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood / V. Gupta, I. Jafferji, M. Garza [et al.] // *Biomicrofluidics*. – 2012. – Vol. 6, N 2. – P. 24133.
73. Archer, S. Electrorotation studies of baby hamster kidney fibroblasts infected with herpes simplex virus type 1 / S. Archer, H. Morgan, F. J. Rixon // *Biophys. J.* – 1999. – Vol. 76, N 5. – P. 2833–2842.
74. A novel method for detection of virus-infected cells through moving optical gradient fields using adenovirus as a model system / W. Soo Hoo, M. M. Wang, J. R. Kohrumel, J. Hall // *Cytometry. Part A.* – 2004. – Vol. 58, N 2. – P. 140–146.

75. Dielectric properties of human leukocyte subpopulations determined by electrorotation as a cell separation criterion / J. Yang, Y. Huang, X. Wang [et al.] // *Biophys. J.* – 1999. – Vol. 76, N 6. – P. 3307–3314.

76. Зацепина, Г. Н. Заряд поверхности лимфоцитов как критерий функционального состояния организма / Г. Н. Зацепина, А. Н. Ноздрачева, М. Н. Ноздрачев // *Биофизика.* – 1980. – Т. 25, № 4. – С. 721–726.

77. Электрические и вязкоупругие свойства эритроцитов у пациентов с диффузной патологией печени / М. В. Кручинина, С. А. Курилович, М. В. Паруликова [и др.] // *Доклады академии наук.* – 2005. – Т. 401, № 5. – С. 701–704.

78. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний / В. М. Генералов, М. В. Кручинина, А. Г. Дурыманов [и др.]. – Новосибирск : Церис, 2011. – 172 с.

79. Крылов, В. Н. Типовые изменения электрофоретической подвижности эритроцитов при стрессовых воздействиях / В. Н. Крылов, А. В. Дерюгина // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2005. – Т. 139, № 4. – С. 364–366.

80. Jones, T. B. Basic theory of dielectrophoresis and electrorotation / T. B. Jones // *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* – 2003. – Vol. 22, N 6. – P. 33–42.

81. Hughes, M. P. Nanoelectromechanics in Engineering and biology / M. P. Hughes. – Boca Raton; London; New York; Washington : CRC Press, 2003. – 320 p.

82. Green, N. G. Dielectrophoresis of submicrometer latex spheres. 1. Experimental results / N. G. Green, H. Morgan // *J. Phys. Chem. B.* – 1999. – Vol. 103, N 1. – P. 41–50.

83. Ermolina, I. The electrokinetic properties of latex particles: comparison of electrophoresis and dielectrophoresis / I. Ermolina, H. Morgan // *J. Colloid Interface Sci.* – 2004. – Vol. 285, N 1. – P. 419–428.

84. Verpoorte, E. Microfluidic chips for clinical and forensic analysis / E. Verpoorte // *Electrophoresis*. – 2002. – Vol. 23, N 5. – P. 677–712.

85. Haque, M. Elastic theory for the deformation of a spherical dielectric biological object under electro-optical trapping / M. Haque // *RSC Adv.* – 2015. – Vol. 5, N 55. – P. 44458–44462.

86. Schrier, S. L. Shape changes and deformability in human erythrocyte membranes / S. L. Schrier // *J. Lab. Clin. Med.* – 1987 – Vol. 110, N 6. – P. 791–798.

87. Boivin, P. Molecular interactions of membrane proteins and erythrocyte deformability / P. Boivin // *Pathol. Biol. (Paris)*. – 1984. – Vol. 32, N 6. – P. 717–735.

88. Харламов, С. Н. Математическое моделирование влияния неоднородного электрического поля на движение капель воды в нефти / С. Н. Харламов, В. В. Зайковский // *Нефтегазовое дело*. – 2015. – № 4. – С. 95–117.

89. Козинец, Г. И. Исследование эритроцитов крови методом препаративного электрофореза / Г. И. Козинец, Л. В. Борзова // *Лабораторное дело*. – 1981. – № 9. – С. 529–532.

90. Iliescu, C. Dielectrophoretic field-flow method for separating particle populations in a chip with asymmetric electrodes / C. Iliescu, G. Tresset, G. Xu // *Biomicrofluidics*. – 2009. – Vol. 3, N 4. – P. 044104.

91. Separation of latex spheres separation using dielectrophoresis and fluid flow / B. Malnar, B. Malyan, W. Balachandran, F. Cecelja // *Nanobiotechnology*. – 2003. – Vol. 150, N 2. – P. 66–69.

92. Voldman, J. Electrical forces for microscale cell manipulation / J. Voldman // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* – 2006. – Vol. 8, N 1. – P. 425–454.

93. Chen, D. F. Bioparticle separation and manipulation using dielectrophoresis / D. F. Chen, H. Du, W. H. Li // *Sensors and Actuators A: Physical*. – 2007. – Vol. 133, N 2. – P. 329–334.

94. Kadaksham, J. Manipulation of particles using dielectrophoresis / J. Kadaksham, P. Singh, N. Aubry // *Mech. Res. Com.* – 2006. – Vol. 33. – P. 108–122.

95. Возможности сепарации клеток методом бесконтактного барьерного диэлектрофореза / О. Н. Сорокина, С. Н. Подойницын, М. А. Климов [и др.] // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2018. – Т. 3, № 1. – С. 51–59.

96. Characterization of the distribution of rotational torque on electrorotation chips with 3D electrodes / G. Bahrieh, E. Özgür, A. Koyuncuoğlu [et al.] // Electrophoresis. – 2015. – Vol. 36, N 15. – P. 1785–1794.

97. Trainito, C. I. Monitoring the permeabilization of a single cell in a microfluidic device, through the estimation of its dielectric properties based on combined dielectrophoresis and electrorotation in situ experiments / C. I. Trainito, O. Francais, B. Le Pioufle // Electrophoresis. – 2015. – Vol. 36, N 9–10. – P. 1115–1122.

98. Hydrodynamic and direct-current insulator-based dielectrophoresis (H-DC-iDEP) microfluidic blood plasma separation / M. Mohammadi, H. Madadi, J. Casals-Terré, J. Sellarès // Anal. Bioanal. Chem. – 2015. – Vol. 407, N 16. – P. 4733–4744.

99. 3D Insulator-based dielectrophoresis using DC-biased, AC electric fields for selective bacterial trapping / P. Zellner, T. Shake, Y. Hosseini [et al.] // Electrophoresis. – 2015. – Vol. 36, N 2. – P. 277–283.

100. Фейнман, Р. Фейнмановские лекции по физике. В 9 т. Т. 5. Электричество и магнетизм / Р. Фейнман, Р. Лейтон, М. Сэндс; пер. с англ. – Москва : Мир, 1977. – 296 с.

101. Корн, Г. Справочник по математике / Г. Корн, Т. Корн. – Москва : Наука, 1973. – 832 с.

102. Бермант, А. Ф. Курс математического анализа. Москва : Гос. изд-во техн.-теоретич. лит., 1955. – Ч. 2. – 358 с.

103. Физические величины. Справочник / под ред. И. С. Григорьева, Е. З. Мейлихова. – Москва : Энергоатомиздат, 1991. – 1232 с. – ISBN 5–283–04013–5.

104. Относительная погрешность измерений коэффициента поляризуемости клеток / К. В. Генералов, В. М. Генералов, М. В. Кручинина [и др.] // Измерительная техника. – 2016. – № 9. – С. 64–67.

105. Справочник химика / под ред. Б. П. Никольского, В. А. Рабиновича. – Москва–Ленинград : Химия, 1965. – Т.3. Химическое равновесие и кинетика. Свойства растворов. Электродные процессы. – 1005 с.

106. Lin, Y. Modeling of dielectrophoresis in micro and nano systems. Technical reports from royal institute of technology KTH mechanics / Lin Y. – Stockholm : Universitetsservice, 2008. – 46 p.

107. Publication Number Application WO2015157072 ; The number of the international application PCT/US2015/023971. System and method for determining dielectrophoresis crossover frequencies : Date of publication 15.10.2015 / A. Menachery, R. Pethig, E. Kwon. – 1 p. : ill.

108. Патент на полезную модель № 174320 U1 Российская Федерация, (51) МПК; G01N 27/447 (2006.01). Измерительная ячейка для диэлектрофоретических исследований : № 2017100206 : заявл. 09.01.2017 : опубл. 11.10.2017. – Бюл. № 29 / Шувалов Г. В., Генералов В. М., Генералов К. В., Буряк Г. А., Сафатов А. С., Кручинина М. В., Байкалов А. В., Клековкина М. Г., Коптев Е. С.; правообладатель Федеральное государственное унитарное предприятие «Сибирский государственный ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт метрологии» (ФГУП «СНИИМ») (RU). – 3 с. : ил.

109. Migration analysis of micro- particles in liquids using microscopically designed external fields / H. Watarai, H. Monjushiro, S. Tsukahara, Y. Iiguni // Anal. Sci. – 2004. – Vol. 20, N 3. – P. 423–434.

110. Hui, L. The dielectrophoresis of cylindrical and spherical particles submerged in shells and in semi-infinite media / L. Hui, H. H. Bau // Physics Fluids. – 2004. – Vol. 16, N 5. – P. 1217–1228.

111. Патент № 2477310 C1 Российская Федерация, (51) МПК, C12M 3/00 (2006.01); G01N 27/453 (2006.01); G01N 33/555 (2006.01); G01N

33/536 (2006.01). Биологический микрочип на основе диэлектрофореза : № 2011133270/10 : заявл. 08.08.2011 : опубл. 10.03.2013. – Бюл. № 7 / Генералов В. М., Сафатов А. С., Дурыманов А. Г., Курская О. Г., Буряк Г. А.; правообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») (RU). – 4 с. : ил.

112. Physical principles of development of the state standard of biological cell polarizability / G. V. Shuvalov, K. V. Generalov, V. M. Generalov [et al.] // *Rus. Physics J.* – 2018. – Vol. 60, N 11. – P. 1901–1904.

113. Фукс, Н. А. Механика аэрозолей / Н. А. Фукс. – Москва: Изд-во АН СССР, 1955. – 353 с.

114. Brito, M. A. Bilirubin induces loss of membrane lipids and exposure of phosphatidylserine in human erythrocytes / M. A. Brito, R. F. Silva, D. Brites // *Cell Biol. Toxicol.* – 2002 – Vol. 18, N 3. – P. 181–192.

115. Новицкий, В. В. Физиология и патофизиология эритроцита / В. В. Новицкий, Н. В. Рязанцева, Е. А. Степовая. – Томск : Изд-во ТГУ, 2004. – 202 с. – ISBN 5–7511–1807–3.

116. Калягина, Н. В. Математический анализ регуляции объема эритроцита человека с учетом упругого воздействия оболочки эритроцита на обменные процессы / Н. В. Калягина, М. В. Мартынов, Ф. И. Атауллаханов // *Биологические мембраны.* – 2013. – Т. 30, № 2. – С. 115–127.

117. Лебедев, А. И. Физика полупроводниковых приборов / А. И. Лебедев. – Москва : Физматлит, 2008. – 488 с. – ISBN 978–5–9221–0995–6.

118. Гельфанд, И. М. Тригонометрия / И. М. Гельфанд, С. М. Львовский, А. Л. Тоом. – Москва : МЦНМО, 2002. – 200 с. – ISBN 5–94057–050–X.

119. Волькенштейн, М. В. Биофизика / М. В. Волькенштейн. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: Наука, 1988. – 592 с. – ISBN 5–02–013835–5.

120. Иост, Х. Физиология клетки / Х. Иост ; пер. а англ. – Москва : Мир, 1975. – 864 с.

121. Воробьев, Н. Н. Теория рядов / Н. Н. Воробьев– 4-е изд., перераб. и доп. – Москва : Наука, 1979. – 408 с.
122. Nonlinear polarizability of erythrocytes in non-uniform alternating electric field / K. V. Generalov, V. M. Generalov, A. S. Safatov [et al.] // *Open J. Biophys.* – 2014. – Vol. 4, N 3. – P. 97–103.
123. Dielectrophoresis applications and electric rotations in medicine: Metrology objectives / K. V. Generalov, V. M. Generalov, M. V. Kruchinina [et al.] // 13th International Scientific-Technical Conference on Actual Problems of Electronic Instrument Engineering (APEIE) Proceedings (Novosibirsk, October 2016). – Novosibirsk : Novosibirsk State Technical University, 2016. – Vol. 1, pt. 1. – P. 221–223.
124. Показатели гемограммы у взрослого работающего населения / Н. А. Маянский, Н. Н. Боровков, Т. В. Егорова [и др.] // *Гематология и трансфузиология.* – 2008. – Т. 53, № 1. – С. 21–27.
125. Method for measuring the polarizability of cells in an inhomogeneous alternating electric field / K. V. Generalov, V. M. Generalov, M. V. Kruchinina [et al.] // *Measurement Techniques.* – 2017. – Vol. 60, N 1. – P. 82–86.
126. Лойцянский, Л. Г. Механика жидкости и газа / Л. Г. Лойцянский. – 6-е изд., перераб. и доп. – Москва : Наука, 1987. – 840 с.
127. Гоноровский, И. С. Радиотехнические цепи и сигналы / И. С. Гоноровский. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва : Радио и связь, 1986. – 695 с.
128. Закс, Л. Статистическое оценивание / Л. Закс; пер. с нем. – Москва : Статистика, 1976. – 598 с.
129. Пилотный референтный интервал поляризуемости эритроцитов с учетом гендерных и возрастных различий / М. В. Кручинина, В. М. Генералов, М. И. Воевода [и др.] // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* – 2016. – № 9 (Ч. 1). – С. 60–65.

130. Обоснование применения эссенциальных фосфолипидов при хронических заболеваниях печени: динамика электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов / С. А. Курилович, М. В. Кручинина, А. А. Громов [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – № 11. – С. 46–52.

131. Guo, X. Controllably moving individual living cell in an array by modulating signal phase difference based on dielectrophoresis / X. Guo, R. Zhu // Biosens. Bioelectron. – 2015. – Vol. 68. – P. 529–535.

132. Figeys, D. Lab-on-a-chip: A revolution in biological and medical sciences / D. Figeys, D. Pinto // Anal. Chem. – 2000. – Vol. 72, N 9. – P. 330A–335A.



## ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное)

Патент на изобретение № 261435 Способ определения массы микрочастицы в переменном электрическом поле



## ПРИЛОЖЕНИЕ Б (справочное)

### Акт о внедрении измерения массы микрочастицы микронного размера неоднородным переменным электрическим полем

Общество с ограниченной ответственностью

«ЦЕНТР ПРОФИЛАКТИКИ ТРОМБОЗОВ»

The Thromboses Prevention Center



630091 Новосибирск, ул.Демьяна Белого, 19  
Тел. 284-58-10, 214-58-10, 8-913-912-58-10, 8-913-451-27-20  
E.mail: gromov.center@rambler.ru  
ОГРН 1045403916030 ОКПО 74947844 ИНН/КПП 5410155381/540601001  
Лицензия ЛЮ 54-01-000872 от 30.07.2010

"29" января 2018 г. № 1

#### АКТ

О внедрении в практику результатов научной разработки учреждение ООО «Центр профилактики тромбозов» г. Новосибирск.

Настоящим подтверждается, что измерительно-вычислительный комплекс (ИВК), оригинальная электронная программа "Определение параметров эритроцитов с помощью неоднородного переменного электрического поля", а также образец государственного эталона физической величины поляризуемости, разработанные К.В. Генераловым в соавторстве, внедрены в практику работы ООО «Центр профилактики тромбозов» г. Новосибирска.

**Форма внедрения:** ИВК используются в научно-исследовательской работе как измерительный прибор для создания новых медицинских технологий диагностики заболеваний человека.

**Краткое описание внедрения комплекса в медицинскую практику:** ИВК используется в ООО «Центр профилактики тромбозов» в целях измерения параметров эритроцитов (масса, электрическая емкость, дипольный момент). В настоящее время сотрудники центра с помощью ИВК разрабатывают новую методику диагностики нарушений гемостаза человека на основе измерения диэлектрической проницаемости, тангенса диэлектрических потерь каждого в отдельности наблюдаемого эритроцита. Калибровка комплекса осуществляется с помощью образца государственного эталона физической величины поляризуемости. Эталон придает уверенность в правильности проводимых измерений. ИВК имеет широкие перспективы в области диагностики, наблюдения за течением заболевания, эффективности назначаемого лечения.

Директор ООО

«Центр профилактики тромбозов», к.м.н.



/Громов А.А./

## ПРИЛОЖЕНИЕ В (справочное)

Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ  
№ 2016618155

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**СВИДЕТЕЛЬСТВО**  
о государственной регистрации программы для ЭВМ  
**№ 2016618155**

**«Определение параметров эритроцитов с помощью  
неоднородного переменного электрического поля»**

Правообладатели: *Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») (RU), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» («НИИТПМ») (RU), Федеральное государственное унитарное предприятие «Сибирский научно-исследовательский институт метрологии» (ФГУП «СНИИМ») (RU)*

Авторы: *Генералов Константин Владимирович (RU), Генералов Владимир Михайлович (RU), Кручинина Маргарита Витальевна (RU), Шувалов Геннадий Владимирович (RU)*

Заявка № **2016615302**  
Дата поступления **25 мая 2016 г.**  
Дата государственной регистрации  
в Реестре программ для ЭВМ **22 июля 2016 г.**

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*



*Г.П. Ивлиев*      Г.П. Ивлиев

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г (справочное)

Удостоверение образца государственного эталона электрической поляризуемости биологических частиц (эритроцитов)

  
 Федеральное государственное унитарное предприятие  
**“СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО  
 ЗНАМЕНИ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
 МЕТРОЛОГИИ”**  
 (ФГУП “СНИИМ”)

**УДОСТОВЕРЕНИЕ**

от 17 января 2017 года Срок действия  
не ограничен

Настоящее удостоверение выдано:

Федеральному бюджетному учреждению науки Государственный Научный Центр Вирусологии и Биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)	630559, Новосибирская область, п. г.т. Кольцово
Федеральному государственному бюджетному начному учреждению «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» (НИИТПМ»)	630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова 175/1

и подтверждает, что Сибирским научно-исследовательским институтом метрологии совместно с ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и «НИИТПМ» разработан образец государственного эталона электрической поляризуемости биологических частиц (эритроцитов).

Опытный образец государственного эталона электрической поляризуемости биологических частиц (эритроцитов) СММК 201113.000 принят межведомственной комиссией, созданной на основании приказа Росстандарта от 24.11.2016 г. №1724.

Эталон предназначен для метрологического обеспечения измерений электрической поляризуемости биологических частиц (эритроцитов, бактерий, клеток тканей, перевиваемых культур и др.) в диапазоне  $(10^{-14} - 10^{-16}) \text{ м}^3$  на территории Российской Федерации.

Директор Шувалов Г.В.  


**№ 1-2017**

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д (справочное)

### Сертификат калибровки государственного эталона единицы электрической поляризуемости биологических объектов 1-го разряда

<b>Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии</b> <b>Federal Agency on Technical Regulating and Metrology</b>							
<b>Federal state unitary enterprise</b> <b>«Siberian State Scientific</b> <b>Research Institute of</b> <b>Metrology»</b> <b>FSUE «СНИИМ»</b>		<b>Федеральное государственное</b> <b>унитарное предприятие</b> <b>«Сибирский государственный</b> <b>Ордена Трудового Красного</b> <b>Знамени научно-</b> <b>исследовательский институт</b> <b>метрологии»</b> <b>ФГУП «СНИИМ»</b>					
<h2>Сертификат калибровки</h2> <b>Calibration certificate</b>							
Номер сертификата Certificate number	25-02	Дата калибровки Date when calibrated	27.11.2014	Страница Page	1	из of	2
Объект калибровки Item calibrated	<b>Государственный эталон единицы электрической поляризуемости биологических объектов I разряда</b>						
Заказчик Customer	<b>ФГУП «СНИИМ»</b>						
Метод калибровки Method of calibration	<b>метод косвенных измерений</b>						
Калибровка выполнена с помощью Calibration is performed by using	<b>Эталонный комплекс «Биофизик»</b>						
Условия калибровки Calibration conditions	<b>Температура 20±1°C, Относительная влажность 19±1%</b>						
Утверждающая подпись Authorized signature	Заместитель директора: Deputy Director:						
	Начальник отдела: Chief of Laboratory:						
							
пр. Димитрова 4, г. Новосибирск, 630004, Россия, тел. (383) 2100814, факс. (383) 2101360 e-mail: <a href="mailto:director@sniim.ru">director@sniim.ru</a> pr. Dimitrova, 4, Novosibirsk, 630004, Russia, tel: (383) 2100814, fax: (383) 2101360 e-mail: <a href="mailto:director@sniim.ru">director@sniim.ru</a>							

Сертификат калибровки  
Calibration certificate

Номер сертификата \_\_\_\_\_  
Certificate number


Страница 2 из 2  
Page of

Результаты калибровки  
Calibration results

Диапазон частот, кГц.....от 50 до 10000 кГц  
Диапазон значений электрической поляризуемости, мкм .....от  $10^{-16}$  до  $10^{-14}$  м<sup>3</sup>  
Относительная суммарная неопределенность, % ..... 8 до 24 %

Дополнительная информация  
Additional information

Подпись лица, выполнившего калибровку  
Signature of the person who has performed calibration

  
\_\_\_\_\_



## ПРИЛОЖЕНИЕ Е (справочное)

Свидетельство об аттестации государственного эталона единицы величины  
поляризуемости биологических объектов 1-го разряда

Федеральное государственное унитарное предприятие  
«Сибирский государственный ордена Трудового Красного Знамени  
научно-исследовательский институт метрологии»  
630004, г.Новосибирск, пр.Димитрова, д. 4

*Наименование, юридический адрес держателя эталона*

### СВИДЕТЕЛЬСТВО об аттестации государственного эталона единицы величины

№ 0195-1

Дата выдачи « 22 » ноября 2016 г.

Действительно до « 22 » ноября 2017 г.

3.1.ZZH.0195.2016

*Регистрационный номер эталона в реестре  
Федерального информационного фонда*

#### **Государственный эталон единицы электрической поляризуемости биологических объектов 1-го разряда**

*наименование величины, разряд по государственной поверочной схеме, номинальное значение (диапазон значения) величины*

аттестован на соответствие обязательным требованиям (метрологическим и техническим требованиям, требованиям к содержанию и применению государственного эталона), утвержденным приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от \_\_\_\_\_ № \_\_\_\_\_

#### **Метрологические требования**

Государственный эталон соответствует уровню эталона 1 разряда по локальной поверочной схеме «Локальная поверочная схема для средств измерений электрической поляризуемости биологических объектов»

*наименование и обозначение документа на поверочную схему*

#### **Технические требования.**

Комплектность технические характеристики и программное обеспечение государственного эталона соответствует паспортным данным и требованиям Правил содержания и применения государственного эталона и иной технической документации и обеспечивают безопасность эксплуатации эталона.

#### **Требования к содержанию и применению эталона**

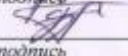
Условия эксплуатации соответствуют требованиям, изложенным в р. 3 Правил содержания и применения эталона (Пр С № 0195).

Директор ФГУП «СНИИМ»

  
\_\_\_\_\_

Г.В. Шувалов

Зам. начальника отдела

  
\_\_\_\_\_

А.В. Байкалов

Данное свидетельство может быть воспроизведено только полностью. Любые публикации или частичное воспроизведение содержания свидетельства возможны только с письменного разрешения организации, выдавшей данное свидетельство.

Неотъемлемой частью данного Свидетельства является приложение в виде Сертификата калибровки № 02/25 от 22.11.2016 г.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Ж (справочное)

### Сертификат калибровки измерительной ячейки

<p>Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии Federal Agency on Technical Regulating and Metrology</p>							
<p>Federal state unitary enterprise «Siberian State Scientific Research Institute of Metrology» FSUE «SNIIM»</p>		<p>Федеральное государственное унитарное предприятие «Сибирский государственный Ордена Трудового Красного Знамени научно- исследовательский институт метрологии» ФГУП «СНИИМ»</p>					
<h2 style="margin: 0;">Сертификат калибровки</h2> <p style="margin: 0;">Calibration certificate</p>							
<p>Номер сертификата Certificate number</p>	<p><b>10-1501</b></p>	<p>Дата калибровки Date when calibrated</p>	<p><b>24.10.16</b></p>	<p>Страница Page</p>	<p><b>1</b></p>	<p>из of</p>	<p><b>2</b></p>
<p>Объект калибровки Item calibrated</p>	<p>Измерительная ячейка «Биофизик» № I</p> <hr/> <p><small>Наименование эталона / средства измерения / идентификация Description of measurement standard / measuring instrument / identification</small></p>						
<p>Заказчик Customer</p>	<p>ФГУП "СНИИМ", ИНН 5407110983</p> <hr/> <p><small>Информация о заказчике, адрес Name of the customer, address</small></p>						
<p>Метод калибровки Method of calibration</p>	<p>МИ 1987, метод прямых измерений</p> <hr/> <p><small>Наименование метода / идентификация Name of the method / identification</small></p>						
<p>Калибровка выполнена с помощью Calibration is performed by using</p>	<p>Государственного вторичного эталона единицы длины в диапазоне значений от 0 до 1000 мм ВЭТ 2-14-59 2.1.ZZH.0111.2014</p> <hr/> <p><small>Наименование эталонов и их статус / идентификация / доказательство прослеживаемости Description of the reference measurement standards / identification / evidence of traceability</small></p>						
<p>Условия калибровки Calibration conditions</p>	<p>Температура +20,91 °С, давление 754 мм рт.ст., влажность 57 %</p> <hr/> <p><small>Условия окружающей среды и другие влияющие факторы Environmental conditions and other influence parameters</small></p>						
<p>Утверждающая подпись Authorized signature</p>			<p>Заместитель директора: Deputy Director:</p>	<p> <b>Е. С. Коптев</b></p>			
			<p>Зам.начальника отдела: Chief of Laboratory:</p>	<p> <b>К. В. Тукмачев</b></p>			
<p>пр. Димитрова 4, г. Новосибирск, 630004, Россия, тел. (383) 2100814, факс. (383) 2101360 e-mail: <a href="mailto:director@sniim.ru">director@sniim.ru</a> pr. Dimitrova, 4, Novosibirsk, 630004, Russia, tel: (383) 2100814, fax: (383) 2101360 e-mail: <a href="mailto:director@sniim.ru">director@sniim.ru</a></p>							



Сертификат калибровки Calibration certificate			
Номер сертификата Certificate number	<b>10-1501</b>	Страница Page	<u>2</u> из <u>2</u> of
Результаты калибровки, включая неопределенность Calibration results including uncertainty			
Действительное среднее значение ширины ячейки 0,15067 мм			
Суммарная стандартная неопределенность результатов измерений 0,1 мкм			
Дополнительная информация Additional information			
Рекомендуемый межкалибровочный интервал 1 год			
Подпись лица, выполнившего калибровку Signature of the person who has performed calibration			К.В.Тухмачев

**ПРИЛОЖЕНИЕ И** (справочное)

Патент на полезную модель № 174320 Измерительная ячейка для  
диэлектрофоретических исследований

**РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ****ПАТЕНТ**

НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ

№ 174320

**Измерительная ячейка для диэлектрофоретических  
исследований**

Патентообладатель: *Федеральное государственное унитарное  
предприятие "Сибирский государственный ордена Трудового  
Красного Знамени научно-исследовательский институт  
метрологии" (ФГУП "СНИИМ") (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2017100206

Приоритет полезной модели 09 января 2017 г.

Дата государственной регистрации в  
Государственном реестре полезных  
моделей Российской Федерации 11 октября 2017 г.

Срок действия исключительного права  
на полезную модель истекает 09 января 2027 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ивлиев

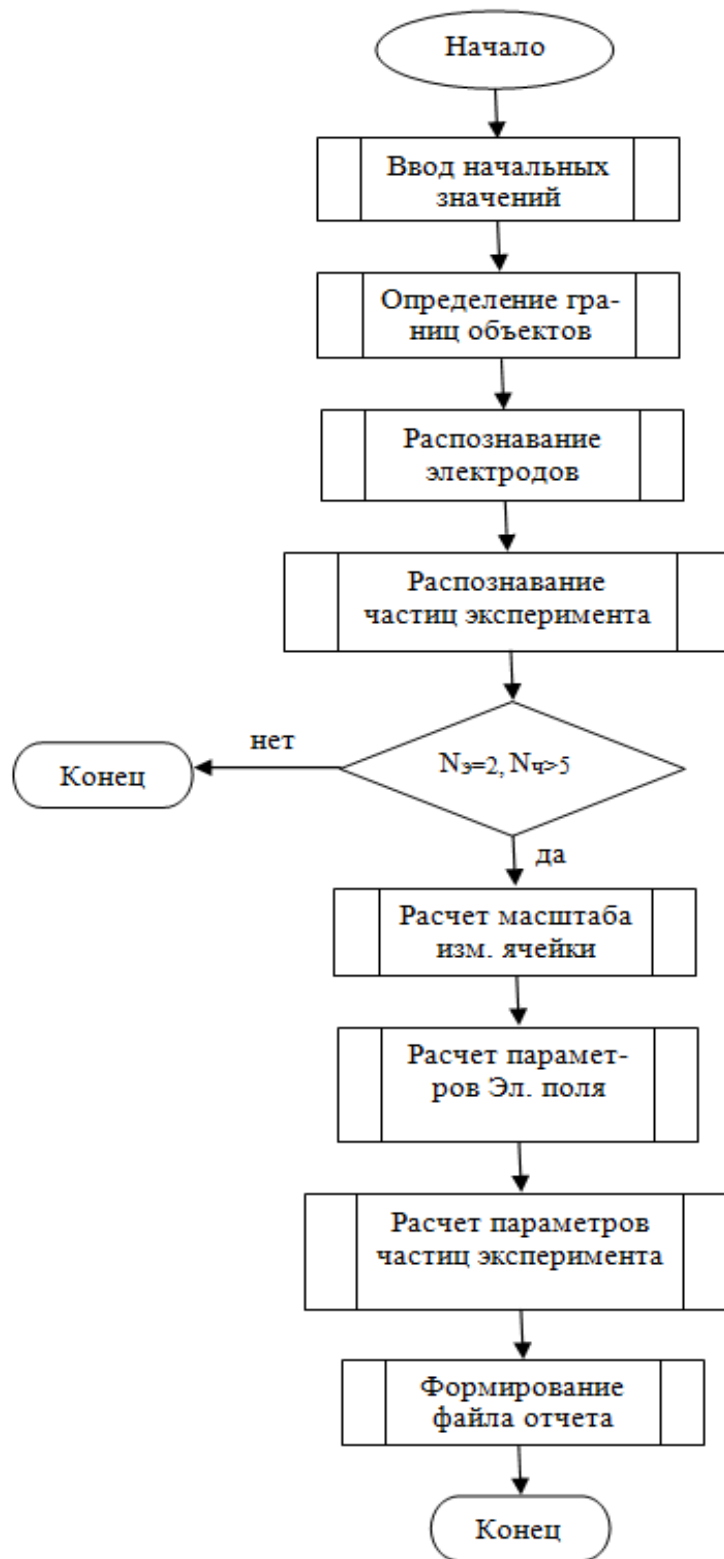
**ПРИЛОЖЕНИЕ К** (справочное)

Свидетельство № 467-RA.RU.311735-2019 об аттестации первичной методики измерений поляризуемости биочастиц

 ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ		
Федеральное государственное унитарное предприятие "СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕТРОЛОГИИ" (ФГУП «СНИИМ»)		
пр. Демитрова, 4, г. Новосибирск, 630004, тел. (383) 210-08-14, факс (383) 210-13-60, E-mail: director@snim.ru		
<b>СВИДЕТЕЛЬСТВО № 467-RA.RU.311735-2019</b> <b>об аттестации методики измерений</b>		
Первичная референтная методика измерений (ПРМИ) <u>поляризуемости биочастиц</u> наименование измеряемой величины:		
<u>(эритроцитов)</u> при необходимости указывают объект и метод измерений		
разработанная <u>ФГУП «СНИИМ»</u> <u>пр. Демитрова, 4, г. Новосибирск, 630004</u> <u>Тел/факс: (383) 210-08-14, 210-13-60</u> наименование организации (предприятия), разработавшей МИ		
и регламентированная в <u>Первичная референтная методика измерений</u> Обозначение и наименование документа		
<u>поляризуемости биочастиц (эритроцитов), год утверждения - 2019, количество листов – 46</u>		
аттестована в соответствии с приказом Минпромторга России от 15 декабря 2015 года № 4091 и ГОСТ Р 8.563-2009		
Аттестация осуществлена по результатам <u>метрологической экспертизы материалов</u> вид работ: метрологическая экспертиза материалов		
<u>по разработке МИ, теоретического исследования МИ, экспериментальной апробации МИ</u> по разработке МИ, теоретическое или экспериментальное исследование МИ, другие виды работ		
<b>В результате аттестации МИ установлено:</b> МИ соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обеспечивает метрологические характеристики, значения которых приведены в Приложении к СВИДЕТЕЛЬСТВУ № 467-RA.RU.311735-2019 об аттестации МИ.		
Заместитель директора по метрологии и качеству ФГУП «СНИИМ»		Ковдаков Василий Юрьевич (расшифровка подписи)
«25 июля 2019 г. дата		 печать
Бланк № <u>269224</u>		

## ПРИЛОЖЕНИЕ Л (справочное)

## Алгоритм работы программы



## ПРИЛОЖЕНИЕ М (справочное)

### Листинг программы. Функция обход контура

```

/// <summary>
/// Получает массив байт представляющих картинку, возвращает массив байт представляющий контур фигур
/// 0 точка без сигнала. 255 точка с сигналом.
/// <param name="Arg">Входной массив </param>
/// <param name="markedPointVal">Значение сигнальных точек в выходном массиве</param>
/// <param name="useddiag">использование диагональных точек</param>
/// <returns>Массив контурных точек</returns>
public static unsafe byte[,] SpyderThinkInnerBorder(byte[,] Arg, byte markedPointVal = 1, bool
useddiag=true)
{
    // во входном массиве 0 нет сигнала, 255 сигнал
    List<Point> countur = new List<Point>();//список контурных точек
    int way = 2;//2- вниз, 6 вправо, 8 вверх, 4 влево направление движения
    bool exit = false; // сигнал о выходе
    byte fwd, left; //значение входного массива "вперед" и "слева"
    int Height = Arg.GetLength(1); int Width = Arg.GetLength(0);
    byte[,] ret = new byte[Width, Height];
    for (int col = 3; col < Width - 3; col++)
    {
        for (int row = 3; row < Height - 3; row++)
        {
            if (Arg[col + 1, row] != 0)//нашли сигнал слева
            {
                while (!exit)
                {
                    switch (way)
                    {
                        case 2://движение вниз
                        {
                            //слева сигнал, спереди сигнал - выполняем поворот направо
                            left = Arg[col + 1, row]; fwd = Arg[col, row + 1];
                            if (left != 0 && fwd != 0)
                            {
                                countur.Add(new Point(col+1, row));
                                //добавили левую точку
                                countur.Add(new Point(col, row+1));

                                //добавили переднюю точку

                                if (useddiag)
                                {
                                    countur.Add(new Point(col + 1, row + 1));

                                //добавили точку впереди слева

                                }
                                way = 4; break;
                            }
                        }
                        case 6://движение вправо
                        {
                            //слева сигнал, спереди нет сигнала - запоминаем точку + движемся вперед
                            countur.Add(new Point(col+1, row)); row++;
                            if (countur[countur.Count - 1] == countur[0] &&
countur.Count > 1) { exit = true; }

                            break;
                        }
                        case 4://движение влево
                        {
                            //слева нет сигнала - смещение влево + поворачиваем налево
                            col++; way = 6; break;
                        }
                    }
                }
            }
        }
    }
}

```

```

//слева нет сигнала - выполняем поворот налево, смещение вверх
{ row--; way = 8; break;}
break;
}
case 8://движение вверх
{
left = Arg[col - 1, row]; fwd = Arg[col, row - 1];
//слева сигнал, спереди сигнал - выполняем поворот направо
if (left != 0 && fwd != 0)
{
countur.Add(new Point(col-1 , row));//добавили левую точку
countur.Add(new Point(col , row-1));//добавили переднюю
точку
if (usediag)
{
countur.Add(new Point(col - 1, row - 1));
//добавили точку впереди вверху
}
way = 6; break;
}
//слева сигнал, спереди нет сигнала - запоминаем точку + движемся
вперед
if (left != 0 && fwd == 0)
{
countur.Add(new Point(col-1, row)); row--;
break;
}
//слева нет сигнала - выполняем поворот налево, смещение вправо
if (left == 0)
{
col--; way = 4; break;
}
break;
}
case 4://движение влево
{//слева сигнал, спереди сигнал - выполняем поворот направо
left = Arg[col, row + 1]; fwd = Arg[col - 1, row];
if (left != 0 && fwd != 0)
{
countur.Add(new Point(col, row+1));//добавили нижнюю точку
countur.Add(new Point(col-1, row));//добавили переднюю точку
if (usediag)
{
countur.Add(new Point(col - 1, row + 1));
//добавили точку впереди вверху
}
way = 8; break;
}
}
//слева сигнал, спереди нет сигнала - запоминаем точку + движемся вперед
if (left != 0 && fwd == 0)
{
countur.Add(new Point(col, row+1)); col--;
if (countur[countur.Count - 1] == countur[0] &&
countur.Count > 1) { exit = true; }
break;
}
//слева нет сигнала - выполняем поворот налево, смещение вправо
if (left == 0)
{
row++; way = 2; break;
}
break;
}
}
}
}
}
countur = DistinctPoints(countur); //удаляем дубли
foreach (Point pp in countur)
{
ret[pp.X, pp.Y] = markedPointVal; //заполняем выходной массив
}
return ret;
}
}
}
}
}

```