

УДК 57.08:632.082



ГРАФОАНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ НЕОБРАТИМОГО ИМПУЛЬСНОГО ПРОБОЯ МЕМБРАНЫ КЛЕТКИ. ЧАСТЬ 1

В.А. Шигимага

Институт животноводства УААН, г. Харьков, Украина

Электропорация мембран живых клеток импульсным полем предполагает выбор определенных электрических режимов их обработки. Превышение критической величины поля приводит к электропробоею мембраны клетки, что определяется по ее проводимости. Для описания экспериментальной зависимости проводимости эмбриональной клетки мыши от напряженности импульсного поля, приложенного к мембране, принята кусочно-линейная модель. Значения параметров пробоя мембраны клетки получены аналитически как координаты точки пересечения отрезков аппроксимирующих прямых.

КЛЕТКА, МЕМБРАНА, ИМПУЛЬС, ПРОВОДИМОСТЬ, ПАРАМЕТРЫ ЭЛЕКТРОПРОБОЯ

Введение

Исследование и применение импульсного электрического воздействия на клетку как способа временного повышения проницаемости мембраны путем ее электропорации [1–3] является одним из важнейших современных направлений в биотехнологии. Загрузка клеток разного происхождения, в том числе нейронов [2, 3], различными макромолекулами — ДНК, белками, лекарственными веществами, стимуляторами, генами и т. п., улучшение трофической функции тканей на клеточном уровне — вот далеко не полный перечень того, что можно делать с помощью электропорации — мягкого и адекватного способа воздействия на транспортную функцию мембраны. Еще один интересный, на наш взгляд, аспект применения электропорации состоит в использовании эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), исследования с которыми теперь бурно развиваются и имеют большие перспективы [4]. Известно, что из ЭСК можно получить в культуре любые специализированные клетки, в частности, нервные [5]. Последнее обстоятельство удобно для изучения свойств этих клеток *in vitro*, моделирования некоторых нейронных процессов. Возможно, удалось бы применить импульсную электростимуляцию, основанную на неразрушающей электропорации, к группе нервных клеток, полученных из ЭСК *in vitro*, учитывая наш удачный опыт применения этого метода к группе подобных по размеру клеток в составе ооцит-кумулюсного комплекса мыши [6].

Необходимо отметить, однако, что выполнение этих приложений метода требует осторожности при выборе правильных электрических режимов обработки живых клеток. Для этого нужно знать критические и безопасные параметры импульсного воздействия на них. Удобной моделью для этого могут служить довольно крупные и легко доступные одиночные клетки — ооциты (яйцеклетки) мыши. Поскольку все клетки эукариотов имеют идентичный структурный элемент — мембрану, строение и функция которой универсальны для всех клеток [1, 7], логично предположить, что мембраны любых

клеток, в том числе нервных, имеют свою критическую величину напряженности при обработке импульсным полем, которая определяется только размерами клетки [1, 2]. Выше этой напряженности наступает необратимый электропробой мембраны и разрушение клетки. Ниже — получаем различную степень электропорации мембраны, то есть такое обратимое ее состояние, когда в ней успевают закрыться искусственно пробитые импульсом дополнительные временные поры [2]. В то же время, электрическая прочность на разрыв самой мембраны для большинства эукариотических клеток есть величина почти постоянная, что не удивительно, учитывая постоянство состава (отношение белок/липид примерно 1:1) и толщины мембраны [1].

Исходя из вышеприведенных соображений становится очевидной необходимость разработки достоверных способов определения параметров электропробоя мембраны клетки, поскольку, как показывает анализ доступной литературы, в том числе патентной, по этой проблеме строгих вычислительных методов на основе интеллектуальных моделей нет.

Тем не менее, в открытых публикациях известны различные способы оценки состояния биообъекта при различных физических воздействиях.

Согласно одному из них, по графику термопластической зависимости биообъекта определяют его фазовое состояние, а именно, температурную зону (или интервал) фазового перехода при плавлении структуры объекта и соответствующую зону значений деформации [8]. Однако в этом способе не используется аналитическая аппроксимация полученной экспериментально зависимости с последующим строгим математическим анализом полученной функции с целью поиска координат точки фазового перехода. Это не позволяет математически и физически корректно, достоверно и объективно установить зависимость температуры фазового перехода (то есть конкретного значения, а не зоны значений) от свойств или вида объекта, а также влияния других факторов, например, криосреды или температуры.

Известен также способ определения электропроводности жидкости [9]. Способ заключается в том, что на электроды, погруженные в жидкость, подают прямоугольные биполярные импульсы неизменной амплитуды. Измеряют напряжение на электродах и/или проходящий через них ток, по меньшей мере, в трех выбранных моментах времени в течение длительности положительного полупериода поданного на электроды биполярного импульса. По трем измеренным значениям амплитуды импульса находят аппроксимирующую экспоненциальную функцию, из действительной и мнимой частей которой вычисляют активное сопротивление и его поляризационно-емкостную составляющую. Однако и этот способ не обеспечивает корректного определения параметров объекта по проводимости, поскольку не учитывает ее зависимости от напряженности поля между электродами, так как амплитуда входных импульсов неизменна. В то же время в способе используется методика математической обработки результатов измерений путем аппроксимации измеренных значений амплитуды импульса к заданной модельной функции, в данном случае, экспоненте. Несмотря на это, аппроксимирующая функция позволяет сделать расчет проводимости только при одном значении напряженности, что не дает возможности судить о каких-то резких изменениях проводимости, поскольку все измерения проводят при одной выбранной амплитуде импульса и притом очень небольшой, чтобы не вызвать необратимых изменений объекта.

Известен также ближайший аналог описанного ниже метода. Согласно ему определяют проводимость клетки путем подачи на нее прямоугольных импульсов напряжения с возрастающей от нуля по заданному закону амплитудой через электроды, погруженные в жидкую среду с клеткой [10]. Далее вычисляют проводимость клетки и строят график ее зависимости от напряженности поля между электродами. По графику судят о характере изменения проводимости среды в данном интервале напряженности.

Однако и этот способ не обеспечивает физически корректного и достоверного определения конкретных значений напряженности импульсного поля при соответствующих резких изменениях проводимости клетки. Это не позволяет исследовать такие необратимые процессы с резким ростом проводимости, как пробой мембраны клетки при критической для нее напряженности электрического поля, тем самым не обеспечивается возможность определять параметры электропробоя мембраны. Сами значения этих параметров зависят от многих факторов, в частности, от свойств среды, внешних физических условий эксперимента, а, кроме того, определяются видовой специфичностью клеток, их

размером и т.п. В связи с этим для практики клеточной биотехнологии представляет интерес знание конкретных величин параметров электропробоя в этих различных условиях, с тем чтобы можно было эффективно проводить различные электроманипуляции с живыми клетками, не допуская при этом критических значений поля и не опасаясь необратимого электропробоя мембраны и повреждения клетки. Или наоборот, применяя заведомо закритические поля выборочно (прицельно) лизировать некоторые клетки, например, опухолевые.

Объединяя идеи описанных выше способов-аналогов, то есть выделение области резкого изменения параметров биообъекта на графике их зависимости от внешнего воздействия и элементы точного математического анализа этой области, можно предложить один из вариантов вычисления параметров электропробоя.

Цель статьи — представить один из разработанных нами методов определения параметров необратимого электропробоя мембраны клетки, реализуемый с минимальными вычислительными затратами, используя известный программный продукт, при сохранении достаточной объективности и достоверности расчетов [11].

Предложенный метод относится к области биотехнологии, а именно клеточной инженерии, и может быть использован для повышения эффективности обработки живых клеток электрическим полем, которое применяется в различных технологиях электроманипуляции с клетками — активации, стимуляции, электропорации, электротрансфекции и электрослияния.

1. Методика

Определение проводимости клеток проведено с помощью аппаратуры и по методике, которые подробно описаны ранее [10, 12].

Объект исследования — созревшие ооциты мыши — размещались в капле среды 0,3М маннита между микроэлектродами на предметном стекле микроскопа. Микроэлектроды закреплены в манипуляторах и юстированы соосно в поле зрения инвертированного микроскопа.

Все предварительные операции от построения графика по экспериментальным точкам до подгонки по ним кусочно-линейных аппроксимирующих уравнений выполнены с помощью программного пакета Microsoft Excel 2000 v.9.0. Координаты точки пересечения отрезков подогнанных прямых вычислены по известным формулам аналитической геометрии через определитель системы линейных уравнений, записанных в общем виде.

Отсюда следует и название предложенного метода определения параметров пробоя мембраны клетки — графоаналитический — по сути выполняемого алгоритма.

Ниже в качестве примеров приведены рассчитанные по этому алгоритму параметры электропробоя мембран ооцитов мышцы в диэлектрических растворах 0,3М маннита с разной температурой, полученные предложенным методом.

2. Результаты и обсуждение

В основу разработанного метода поставлен усовершенствованный способ определения проводимости путем воздействия импульсным полем на клетку [10].

Суть усовершенствования состоит в анализе резких изменений проводимости клетки и сводится к следующему. В известном способе (прототипе) определения проводимости, включающем подачу на электроды, погруженные в среду, импульсов напряжения с возрастающей от нуля по заданному закону амплитудой и определение зависимости проводимости от напряженности поля, согласно предложенному методу, между электродами в среде вплотную к ним располагают исследуемую клетку, а определенную для нее зависимость проводимости от напряженности поля аналитически аппроксимируют двумя прямыми и вычисляют координаты точки их пересечения, которые считают значениями параметров электропробоя мембраны клетки, причем, абсцисса дает напряженность поля, а ордината — проводимость клетки в момент пробоя.

Сущность разработанного метода поясняется графиком (см. рис.). На нем изображены экспериментальные точки (с погрешностями) зависимостей проводимости яйцеклеток (ооцитов) мышцы от напряженности импульсного поля при температуре среды 25 °С и 35 °С. На обеих зависимостях приведены также соответствующие линии и уравнения аппроксимирующих прямых, каждая пара которых, пересекаясь, дает точку с координатами параметров электропробоя мембраны клетки при данной температуре среды.

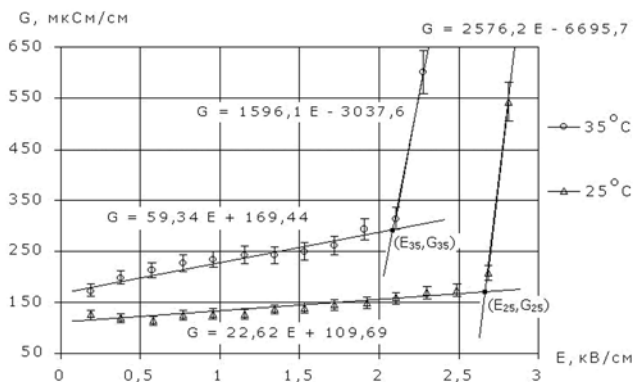


Рис. График зависимости проводимости ооцитов мышцы от напряженности импульсного поля при различной температуре среды

Заявленный способ реализуется следующим образом. Между электродами, погруженными в

среду, помещают вплотную к ним исследуемую клетку, например, ооцит мышцы и подают известное импульсное напряжение с возрастающей от нуля амплитудой по заданному закону, например, линейно. Измеряют ток, протекающий в момент прохождения импульса через ооцит. Далее по известным и измеряемым значениям рассчитывают проводимость клетки. Вычисленные значения проводимости наносят на график в зависимости от напряженности поля. Полученную зависимость условно разбивают на две ветви по характеру роста (слабый и резкий рост проводимости). Далее методом наименьших квадратов проводят аппроксимацию двух ветвей зависимости линейными функциями до и после предполагаемого пробоя, наличие которого определяют по резкому росту проводимости. После этого вычисляют координаты точки пересечения аппроксимирующих прямых, решая совместно систему двух линейных уравнений согласно известному правилу аналитической геометрии. Вычисленные значения координат точки пересечения прямых считают началом необратимого разрыва (электропробоя) мембраны. Эти координаты и представляют собой параметры электропробоя, причем, абсцисса — это напряженность пробоя, а ордината — проводимость клетки в момент разрыва мембраны.

Пример 1. Получена экспериментальная зависимость проводимости ооцита мышцы от напряженности поля при температуре среды 25 °С. Проведена линейная аппроксимация двух ветвей этой зависимости прямыми, уравнения которых записаны в общем виде. Таким образом, получена система линейных уравнений (см. график для 25 °С):

$$\begin{cases} 22,62E - G + 109,69 = 0; \\ 2576,2E - G - 6695,7 = 0, \end{cases}$$

где G и E — текущие переменные; проводимость клетки и напряженность поля соответственно.

Решая эту систему линейных уравнений, вычисляют координаты точки пересечения прямых (E_{25} , G_{25}) согласно известным формулам аналитической геометрии. Для этого делят определитель при каждом неизвестном на главный определитель системы:

$$\begin{aligned} E_{25} &= \frac{\begin{vmatrix} -1 & -6695,7 \\ -1 & 109,69 \end{vmatrix} \cdot \begin{vmatrix} 2576,2 & -1 \\ 22,62 & -1 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} -1 & -6695,7 \\ -1 & 109,69 \end{vmatrix}} = 2,67 \text{ кВ/см}; \\ G_{25} &= \frac{\begin{vmatrix} -6695,7 & 2576,2 \\ 109,69 & 22,62 \end{vmatrix} \cdot \begin{vmatrix} 2576,2 & -1 \\ 22,62 & -1 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} -1 & -6695,7 \\ -1 & 109,69 \end{vmatrix}} = 169,97 \text{ мкСм/см}. \end{aligned}$$

Таким образом, вычисленные параметры электропробоя мембраны ооцита мышцы при $t = 25$ °С составляют: напряженность поля $E_{25} = 2,67$ кВ/см, проводимость в момент разрыва мембраны $G_{25} \approx 170$ мкСм /см.

Пример 2. Получена экспериментальная зависимость проводимости другого ооцита мышцы от напряженности импульсного поля при температуре среды 35 °С. Проведена линейная аппроксимация двух ветвей этой зависимости и получена система линейных уравнений (см. график для 35 °С):

$$\begin{cases} 59,34E - G + 169,44 = 0; \\ 1596,1E - G - 3037,6 = 0, \end{cases}$$

где G и E — имеют тот же смысл, что и в примере 1.

Проведя аналогичные вычисления координат (E_{35} , G_{35}) точки пересечения прямых системы, которые выполняются по такому же принципу, как и в примере 1, получаем следующие значения параметров электропробоя мембраны ооцита мышцы при $t=35$ °С: напряженность поля $E_{35} \approx 2,09$ кВ/см, проводимость в момент разрыва мембраны $G_{35} \approx 293$ мкСм/см.

По вычисленным значениям параметров электропробоя хорошо видно влияние температуры среды на электрическую прочность мембраны ооцита, а именно, с ростом температуры она падает, что согласуется с известными данными [1, 2].

Таким образом, эти примеры показывают, что предложенный способ позволяет точно и достоверно, в соответствии с выбранной моделью линейной аппроксимации, вычислять параметры электропробоя мембраны клетки.

Преимущество разработанного метода состоит в том, что в отличие от прототипа он позволяет анализировать необратимые процессы с резким изменением проводимости, такие как пробой мембраны клетки. Это дает возможность исследовать влияние разных внешних факторов на ее электрическую прочность, а размещение клетки вплотную к электродам позволяет снизить потери энергии импульса на проводимость среды, тем самым уменьшить ее шунтирующее влияние. Кроме того, предложенный способ прост в осуществлении, не требует больших вычислительных ресурсов и позволяет повысить информативность определения электрофизических свойств биообъектов, имеющих чувствительные структурные элементы, склонные к необратимому разрушению с потерей жизнеспособности при превышении критических значений внешних воздействий.

Предложенный метод можно положить в основу разработки автоматической аппаратуры с интеллектуальным анализом данных и управлением по обратной связи с клеткой, то есть самонастраивающийся по гибкому алгоритму автомат для выполнения той или иной задачи: либо стимуляции клеток (путем электропорации), либо выборочного (прицельного) разрушения клетки или группы клеток, например, раковых. Чем не альтернативный метод терапии опухолей?

Выводы

Предложен метод определения параметров электропробоя мембраны клетки путем графоаналитической линейной аппроксимации зависимости ее проводимости от напряженности линейно нарастающего импульсного поля. Метод позволяет исследовать влияние не только различных внешних факторов, но также и видовую специфичность электрической проводимости и прочности мембраны различных клеток.

Во второй части статьи предполагается рассмотреть более сложный в смысле использования вычислительных ресурсов графоаналитический метод, однако, более информативный, поскольку с его помощью возможно вычисление не только параметров необратимого электропробоя, но и параметров электропорации от самого ее начала вплоть до предпробойных значений. Знание этих параметров дает перспективу интеллектуального управления транспортной функцией мембраны с целью поэтапной и мягкой «загрузки» клетки молекулами разных размеров различных веществ, что, собственно, и составляет один из предметов клеточной и геномной инженерии.

Список литературы: 1. *Zimmermann U., Neil G.A.* Electromanipulation of cells. N.Y.: CRC Press, 1996. — 375 p. 2. *Chang D.C., Chassy B.M., Saunders J.A., Sowers A.E.* Guide to Electroporation and Electrofusion. — San Diego.: Academic Press.-1992. — 581 p. 3. *Potter H.* Electroporation in biology: Methods, applications and instrumentation // *Anal. Biochem.* — 1988. — v. 174. — P. 361-373. 4. *Лукаш Л.Л., Василевская С.В.* Стволовые клетки млекопитающих in vitro как основа для создания современных биотехнологий // *Біополімери і клітина.* — 2001. — Т. 17. — № 3. — С. 203-211. 5. *Савченко И.П.* Создание модельных систем культур клеток млекопитающих для решения проблем биологии и биотехнологии // Автореф. дис... докт. биол. наук: 03.00.23 // *ВНИИ физиол., биохим. и питания с.-х. животных.* — Дубровицы. — 1997. — 38 с. 6. *Спосіб активації розвитку in vitro ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) ссавців* // Пат. кор. мод. №19077, Україна, С12N 5/00, С12N 13/00. — 2006. — Бюл. № 12. 7. *Geoffrey M. Cooper.* The Cell: A Molecular Approach.-Sunderland. — ASM Pres.-2nd Ed. — 2000. — 571 p. 8. *Способ определения фазового состояния биообъектов при криоконсервации* / А.с. СССР, №1780001, G01N 33/483. — 1992 г. 9. *Способ и устройство для измерения электропроводности жидкости* // EP № 0288099 A1, G01R 27/22. — 1988 г. 10. *Шигимага В.А.* Определение проводимости эмбриональных клеток животных // *Проблемы бионики.* — Харьков. — 2003. — Вып. 59. — С. 60-64. 11. *Спосіб визначення параметрів електропробою клітинної мембрани* // Пат. кор. мод. №24210, Україна, G01N 33/483, G01R 27/22. — 2007. — Бюл. №9. 12. *Шигимага В.О.* Апаратура для електрозлиття та вивчення провідності клітин // *Вісник Харків. держ. техн. ун-ту с/г-ва.* — Харків. — 2001. — Вип. 6. — С. 386-389.

Поступила в редколлегию 24.10.2007