

АППАРАТНАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ ИМПУЛЬСНОГО МЕТОДА ИЗМЕРЕНИЯ ПРОВОДИМОСТИ КЛЕТКИ

Юрий Мегель¹⁾, Виктор Шигимага²⁾, Иванка Калиманова³⁾,
Антонина Рыбалка⁴⁾, Александр Торба⁵⁾

¹⁾Национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенко, Украина, Харьков, ул. Артема, 44, e-mail: megel_je@mail.ru

²⁾Институт животноводства НААН. Украина, Харьков. обл., Харьков. р-н, пгт. Кулинич, ул. 7-й гвардейской Армии, 3, e-mail: vash105@gmail.com

³⁾ТУ – София, бул. Кл. Охридски 8, e-mail: ikaliman@tu-sofia.bg

⁴⁾ХНУРЭ, Украина, Харьков, пр. Ленина 14, e-mail: airybalka@mail.ru

⁵⁾ХНУРЭ, Украина, Харьков, пр. Ленина 14, e-mail: august@kture.khakov.ua

Резюме: В статье рассмотрен процесс использования метода импульсной кондуктометрии при измерении проводимости биологических клеток. Показаны значения интервалов напряженности импульсного электрического поля (ИЭП), которые соответствуют различным режимам электроманипуляции с клетками, такими как обратимая электропорация, электрослияние, обратимый и необратимый электропробой. Представлены комплекс измерительный аппаратуры и результаты исследования проводимости мембраны клетки.

Ключевые слова: импульсная кондуктометрия, электропоры, электропорация, проводимость клетки, напряженность ИЭП, аппаратура.

1. Введение

Одним из основных биотехнологических приемов является метод импульсной кондуктометрии и создание аппаратуры для его реализации. При этом представляет особый интерес изучение электропроводящих свойств клеток по характеру полученных графических зависимостей удельной проводимости от напряженности ИЭП. Выделение интервалов напряженности поля, соответствующих различным режимам электроманипуляции с клетками.

2. Постановка задачи

Для получения информации о репродуктивных и эмбриональных клетках любого вида животного необходимо получить зависимости проводимости от напряженности ИЭП. Проанализировать их предложенными методами и принять решение о применении того или иного режима воздействия ИЭП для получения конкретного эффекта, - обратимой электропорации, слияния, стимуляции или точечного разрыва мембраны (лизиса). Таким образом, графическое представление измерения удельной проводимости клетки с ростом напряженности поля позволяет обнаружить и исследовать все стадии электропорации мембраны, обратимый и необратимый электропробой и целенаправленно подобрать необходимый режим воздействия ИЭП

на клетку в соответствии с поставленной задачей электроманипуляции [1].

3. Оценка режимов электроманипуляции при взаимодействии клетки с ИЭП

На рис.1 показано расположение ооцита и 2-клеточного эмбриона в процессе измерения электрических характеристик. Конечное значение амплитуды определяется условиями эксперимента. Далее измеряют напряжение на калиброванном резисторе (пропорциональное протекающему через биообъект току) [2] при действии импульса и рассчитывают проводимость клетки в среде по формуле (1), а удельную проводимость по формуле (2).

$$G_{эл} = \frac{U_R}{R(U_{вх} - U)} \quad (1)$$

где $G_{эл}$ - проводимость биообъекта, U_R - напряжение на калибровочном резисторе $U_{вх}$ - входное напряжение, R - сопротивление калибровочного резистора.

$$G_{уд} = G_{эл} \cdot \frac{L}{S} = G_{эл} \cdot k \quad (2)$$

где L - расстояние между микроэлектродами,

S – расстояние между микроэлектродами, k – константа электродной кондуктометрической ячейки.

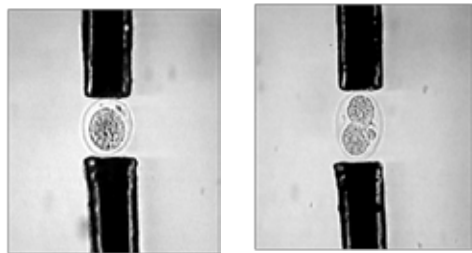


Рис. 1. Размещение клеток между микроэлектродами при измерениях: 1 – ооцит, 2 – двухклеточный эмбрион.

Величину геометрического параметра k берут с учетом форм-фактора, получение значения которого описано в работе [3].

Вычисленные значения удельной проводимости наносят на график в зависимости от напряженности ИЭП (рис.2).

Числовые значения электрических параметров в каждом из интервалов оцениваются одним из описанных в [2] способов.

На примерах зависимостей проводимости ооцита и 2-клеточного эмбриона мыши можно наблюдать все стадии процесса взаимодействия клетки с ИЭП, соответствующие различным режимам электроманипуляции – электрослияния (1) и электростимуляции (2), оба входящие в режим обратимой электропорации (3), а также режим необратимого пробоя мембраны (4) с разрушением клетки.

Выбирая определенную напряженность поля, можно не только реализовать любой из этих режимов, но и управлять процессами, находясь в области обратимой электропорации. При этом мембрана клетки остается полностью функциональной, что доказывается обратимостью ее проводимости при взаимодействии с ИЭП.

Из рис.2 видно, что слабая обратимая электропорация появляется уже при напряженности 0,3-0,6 кВ/см, это может использоваться, например, для электропереноса в клетку небольших наномолекул непроникающих через мембрану в норме веществ (лекарств, криопротекторов и т.п.). При напряженности поля около 1 кВ/см проводимость 2-клеточного эмбриона резко растет – возникает обратимый электропробой места контакта мембран двух бластомеров. Это режим

электрослияния, который, удобно обрабатывать на этом модельном объекте [3]. В случае прекращения повышения напряженности и завершения процесса обработки эмбриона ИЭП, через некоторое время бластомеры образуют общую мембрану [4]. При дальнейшем повышении напряженности наступает фаза стабилизации мембран (напряженность 1,2-1,8 кВ/см) квазилинейный участок [3]. Это стадия объединения мембран и цитоскелетов двух бластомеров, в данном случае такой процесс можно рассматривать, как адекватную стимуляцию.

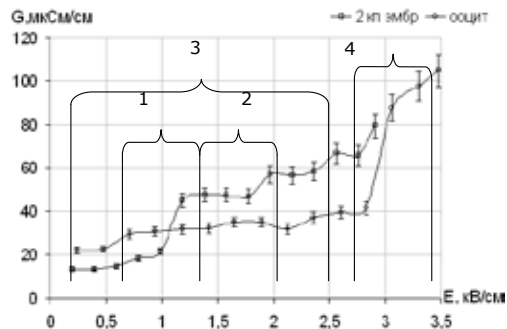


Рис 2. Зависимость проводимости ооцита и 2-клеточного эмбриона мыши от напряженности ИЭП в 0,3М растворе Сахарозы с интервалами 1-4, соответствующими различным режимам электроманипуляции

Оба этих режима входят в состав обратимой электропорации, когда возможен и обратим процесс временного повышения проницаемости мембран клеток, который используется для "загрузки" клеток макромолекулами различной природы, - ДНК, РНК, белками, плазмидами, генами, лекарственными препаратами и т.п. Эти электроманипуляции, называемые соответственно электротрансфекция, электродиффузия, электротрансформация, клеточная и субклеточная терапия, являются предметом клеточной и генной инженерии.

Дальнейшее увеличение напряженности поля до 1,9-2,5 кВ/см приводит к тому, что проводимость эмбриона продолжает расти – возникает второй обратимый пробой обоих бластомеров. При этом разрушаются цитоскелеты и клетка входит в состояние гиперстимуляции. При напряженности поля около 2,8 кВ/см возникает последний, но уже необратимый электропробой с разрывом мембраны, как правило, одного из бластомеров (со стороны

анода) и клетка лизирует. По зависимости проводимости ооцита можно также проследить те же стадии развития и режимы электропорации с ростом напряженности ИЭП, за исключением, электрослияния, поскольку клетка одна. Поэтому все режимы и их применение, можно также использовать и для ооцита. Методы и математические модели для количественного анализа зависимостей проводимости от напряженности ИЭП подробно представлены в [5].

4. Аппаратный комплекс импульсной кондуктометрии

Разработанный аппаратный кондуктометрический комплекс, благодаря универсальности, позволяет определять удельную электропроводность одиночных биологических клеток и жидких сред в диапазоне 0,1 - 105 мкСм/см (с погрешностью $\pm 3,5\%$) при ИЭП напряженностью 0 - 10 кВ/см и некоторые биофизические параметры клетки, например, электрическую прочность мембраны и емкость, а также реализовать известные и разрабатывать новые методы электроманипуляции с биологическими клетками и жидкими средами [6].

Все измерения проводятся под управлением компьютера, который задает параметры для формирования импульсного электрического поля (ИЭП) в режиме «реального времени» рассчитывает проводимость клетки в среде после окончания каждого импульса – с индикацией результатов измерений в графическом виде (рис. 2) на экране монитора компьютера.

Измерительный блок связан с ПЭВМ через кабель с USB-интерфейсом (рис. 3). Перед началом формирования каждого импульса компьютер посылает в микроконтроллер измерительного блока параметры этого импульса:

- амплитуда импульса $A_{имп}$ – от 0,1 В до 100 В (с дискретностью 0,1 В);
- длительность импульса $t_{имп}$ – от 2 мкс до 200 мкс (с дискретностью 2 мкс);

Период повторения импульсов $T_{имп}$ – от 1 с до 100 с (с дискретностью 1 с) определяется программно в ПЭВМ.

С выхода микроконтроллера цифровой код (пропорциональный амплитуде импульса) подается на цифроаналоговый преобразователь (ЦАП). Разрядность ЦАПа определяется максимальной амплитудой выходного импульса ($U_{макс} = 100$ В) и дискретностью формирования амплитуды импульса ($\Delta U = 0,1$ В): $N_{ЦАП} = \log_2 (U_{макс} /$

$\Delta U) = 10$. Импульсное напряжение, подаваемое на микроэлектроды (U_{ex}), преобразовывается в цифровые коды аналогоцифровым преобразователем (АЦП 1). Разрядность АЦП 1 должна соответствовать разрядности ЦАПа и составляет: $N = 10$.

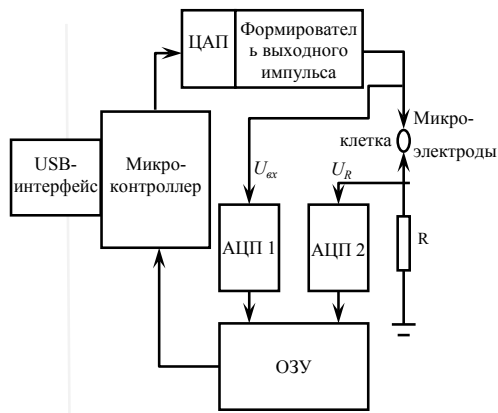


Рис. 3. Структурная схема измерительного блока

Напряжению на калибровочном резисторе (U_R), пропорциональное протекающему через биообъект току, преобразовывается в цифровые коды вторым аналогоцифровым преобразователем (АЦП 2). Разрядность этого АЦП определяется максимальной величиной измеряемой проводимости ($G_{уд.макс} = 105$ мкСм/см) и дискретностью измерений ($G_{уд.макс} = 0,1$ мкСм/см): $N = \log_2 (G_{уд.макс} / G_{уд.макс}) = 10$.

Частота квантования АЦП 1 и АЦП 2 (с учетом теоремы Котельникова - Найквиста) должна в два и более раз превышать величину, обратную минимальной длительности импульса: $F_{кв} = (2, \dots, 5) / t_{имп.мин}$, поэтому частота квантования: $F_{кв} = 2$ МГц. Коды с выходов АЦП 1 и АЦП 2 сохраняются в оперативном запоминающем устройстве (ОЗУ) и после окончания каждого импульса напряжения считываются микроконтроллером и передаются через USB-интерфейс в ПЭВМ.

5. Выводы

Предложен вариант аппаратной реализации метода импульсной кондуктометрии, что позволяет измерять напряженность электромагнитного поля, а так же реализовать любой из режимов электроманипуляции, и автоматизировать процесс управления процессом, в области обратимой электропорации.

6. Литература

[1] Weaver, J., Chizmadzhev, Y. Theory of electroporation: A review // Bioelectrochem. Bioenerg. -1996.-V.41.-P.135-160.

[2] Шигимага В.А., Ю.Е. Мегель. Исследование проводимости клеток при изменении осмотической концентрации среды. // Восточноевропейский журнал передовых технологий.-Харьков.-2011.-№2/5(50).-

[3] Шигимага В.А., Ю.Е. Мегель. Исследование проводимости клеток при изменении осмотической концентрации среды. // Восточноевропейский журнал передовых технологий.-Харьков.-2011.-№2/5(50).-

[4] Freeman S.A., M.A.Wang, J.C. Weaver. Theory of Electroporation of Planar Bilayer Membranes: Predictions of the Aqueous Area, Change in Capacitance, and Pore-Pore Separation. //Biophys. J.-1994.-V.67.- P.42-56.

[5] Шигимага В.О. Енергетика електроліття як метод реконструкції клітин. // Наук. технічн. бюл. ІТ УААН.- Харків.- 1998.-№75.- С.201-204.

[6] Шигимага В.А. Метод определения проводимости ооцитов и эмбрионов в различных условиях диэлектрической среды / В.А. Шигимага, Ю.Е. Мегель // Вестник НТУ «ХПИ».- Харьков:НТУ (ХПИ), 2011.-№ 9.-С.140-144.

Данные об авторах

Юрий Евгениевич Мегель, маг. инж. 1972, к.т.н 1988, д.т.н. 2004, профессор 2005; зав. каф. кибернетики, Национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенко; автоматизация биотехнологических процессов.

Виктор Александрович Шигимага, к.с.-х.н., ведущий специалист, институт животноводства НААН; аппаратные средства генной инженерии.

Иванка Иванова Калиманова, маг. физ. 1969, д-р 1986, доцент 1991; кафедра точной механики и измерительных приборов, Технический университет Софии; оптические, электрооптические и лазерные приборы, оптические измерения.

Рыбалка Антонина Ивановна, маг. физ. 1969, к.ф.н. 1978, доцент 1989, кафедра физики, Харьковский национальный университет радиоэлектроники, оптические системы, моделирование оптических систем.

Александр Алексеевич Торба маг. инж. 1972, к.т.н. 1988, доцент каф. ЭВМ 1993, Харьковский национальный университет радиоэлектроники, компьютерные системы, защита информации.

Рецензент:

доц. д-р Виолета Станчева,
Технически Университет – Варна

HARDWARE IMPLEMENTATIONS OF PULSE METHODS OF MEASUREMENT OF CELLS' CONDUCTIVITY

*Y. E. Megely*¹⁾, *V. A. Shigimaga*²⁾, *I. I. Kalimanova*³⁾, *A. I. Rubalka*⁴⁾, *A. A. Torba*⁵⁾

¹⁾ Kharkiv Vasilenko National Technical University of Agriculture St. Artema 44,
city Kharkiv, Ukraine, *e-mail: megel_ye@mail.ru*

²⁾ Institute of Animal HAAH, Kharkov district, village Kharkov district, village.
Kulinichi Street. 7th Guards Army, 3, *e-mail: vash105@gmail.com*

³⁾ TU-Sofia, Blvd. Cl. Ohridski 8, *e-mail: ikaliman@tu-sofia.bg*

⁴⁾ KHNURE, Lenin Av. 14, city Kharkiv, Ukraine, *e-mail: airybalka@mail.ru*

⁵⁾ KHNURE, Lenin Av. 14, city Kharkiv, Ukraine, *e-mail: august@kture.khakov.ua*

Keywords: напряженность ИЭП, аппаратура, pulse conductometry, electropores, electroporation, cells conductivity, tension IEP, equipment.

The article considers the option of a hardware implementation of the method of pulse conductometry for determining the parameters of the electromagnetic field in the evaluation of modes of elektromonipulation that allows realizing of a reversible electroporation process control in the au-tomated mode.

REFERENCES

[1] Weaver, J., Chizmadzhev, Y. Theory of electroporation: A review// Bioelectrochem. Bioenerg.-1996.-V.41.-P.135-160.

[2] Shigimaga V.A., Yu.YE. Megel'. Issledovaniye provodimosti kletok pri izmenenii osmoticheskoy kontsentratsii sredi.//Vostochno-yevropeyskiy zhurnal peredovykh tekhnologiy.-Khar'kov.-2011.-№2/5(50).-

[3] Shigimaga V.A., Yu.YE. Megel'. Issledovaniye provodimosti kletok pri izmenenii osmoticheskoy kontsentratsii sredi.//Vostochno-yevropeyskiy zhurnal peredovykh tekhnologiy.-Khar'kov.-2011.-№2/5(50).

[4] Freeman S.A., M.A.Wang, J.C. Weaver. Theory of Electroporation of Planar Bilayer Membranes: Predictions of the Aqueous Area, Change in Capacitance, and Pore-Pore Separation. //Biophys. J.-1994.-V.67.- P.42-56.

[5] Shigimaga V.O. YEnergetika yelectro-zlittya yak metod rekonstruktsii klitin.// Nauk. tekhnichn. byul. IT UAAN.- Kharkiv.- 1998.-№75.- S.201-204.

[6] Shigimaga V.A. Metod opredeleniya provodimosti ootsitov i embrionov v razlichnykh usloviyakh dielektricheskoy sredi / V.A. Shigimaga, Yu.YE. Megel' // Vestnik NTU «KHPI».- Khar'kov:NTU (KHPI), 2011.-№ 9.-S.140-144.