

АППАРАТУРА КОНДУКТОМЕТРИИ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ПРОВОДИМОСТИ ЖИВЫХ ОДИНОЧНЫХ КЛЕТОК

*Ю. Е. Мегель*¹⁾, *В.А. Шигимага*²⁾, *С.Н. Коваленко*³⁾,
*И.И. Калиманова*⁴⁾, *А.И. Рыбалка*⁵⁾

¹⁾ НТУСХ им. П. Василенко, Украина, Харьков, ул. Артема, 44, 61002;
e-mail: megel_je@mail.ru

²⁾ Институт животноводства НААН, Украина, Харьков, обл., Харьков. р-н, пгт. Кулинич, ул. 7-й гвардейской Армии, 3, 62404;
e-mail: vash105@gmail.com

³⁾ НТУСХ им. П. Василенко, Украина, Харьков, ул. Артема, 44, 61002;
e-mail: kovalsvt@rambler.ru

⁴⁾ ТУ – София, бул. Кл. Охридски 8, София 1000; *e-mail: ikaliman@tu-sofia.bg*

⁵⁾ ХНУРЭ, Украина, Харьков, пр. Ленина 14, 61002; *e-mail: airybalka@mail.ru*

Резюме: В статье на основе рассмотрения известных методов и аппаратуры кондуктометрии показано, что они не могут быть применены непосредственно для измерения электропроводности живых одиночных клеток. В этой связи необходимо проектирование технических средств на основе нового принципа воздействия на эти биообъекты импульсного электромагнитного поля (ИЭП), с возрастающей напряженностью и соответственно создание генератора прямоугольных импульсов (ГПИ) с заданными параметрами. При этом импульсное воздействие решает проблемы поляризации и электролиза на микроэлектродах и в жидкой среде..

Ключевые слова: электропорация, проницаемость мембраны клеток, импульсное электромагнитное поле, генератор прямоугольных импульсов, оптимизация параметров генератора.

1. Введение

Метод импульсной кондуктометрии (ИК) широко применяется в современных био-технологиях для электроманипуляции с клетками, которые являются основой многих методов, в том числе продуктивного животноводства: клонирования, конструирования заданных генотипов, а также воспроизводства высокопродуктивных животных, исчезающих и восстановления исчезнувших видов и т.п. Данный метод и аппаратура для его реализации имеет значительные перспективы при использовании в биологии, медицине, сельском хозяйстве, поскольку импульсное электромагнитное поле (ИЭП) не приводит к поляризации клетки, что является важным фактором при проведении научных исследований и ряде прикладных задач.

2. Постановка задачи

Электропорация мембран живых клеток в ИЭП предполагает выбор определенных электрических параметров аппаратуры. Обратимость этого процесса, а соответственно сохранение жизнеспособности клетки, определяется конкретным значением напряженности поля и соответствующей ей проводимостью, которая и характеризует

состояние мембраны и клетки в целом [1,2]. Превышение некоторого критического значения напряженности поля приводит к необратимому электропробоя мембраны клетки, что можно определить по резкому росту проводимости. Следовательно, проводимость и соответствующую ей напряженность поля можно использовать в качестве адекватных методических и аппаратных критериев процесса электропорации и электропробоя [3].

Для поиска характерных параметров, определяющих состояние мембраны и ее целостность, необходимо построить математические модели, основанные на аппроксимации экспериментальных зависимостей различными функциями. Эти параметры обусловлены технологической необходимостью воздействия на клетки ИЭП для реализации режимов электрослияния, стимуляции, электропробоя и др. [4]. Одна из моделей может быть построена на основе кусочнолинейной аппроксимации, при которой экспериментальная кривая проводимости условно делится на две ветви – квазилинейного роста с небольшой скоростью до пробоя и резкого экспоненциального роста после необратимого электропробоя мембраны [5]. Значения параметров необратимо-

го электропробоя мембраны клетки могут быть получены графоаналитически, как координаты точки пересечения двух аппроксимирующих прямых. Вторая модель строится на аппроксимации экспериментальной зависимости проводимости клетки от напряженности ИЭП полиномом нечетной степени [6]. Значения параметров электропробоя мембраны клетки согласно этой модели могут быть получены также графоаналитически, как координаты точки максимальной кривизны функции полинома.

Одним из основных элементов аппаратуры импульсного кондуктометра является генератор импульсов с изменяемой амплитудой и длительностью импульса (ГПИ).

В работе [7], предложена вероятностная модель проводимости клетки при электропорации мембраны с возрастающей напряженностью, построена экспоненциальная характеристика роста проводимости клетки с ростом среднего калибра электропор, вплоть до разрушения мембраны при превышении критической напряженности пол.

На основе построенной модели минимальный радиус электропор и проводимость определяются свойствами мембраны и физико-химическими факторами среды, а также напряженностью ИЭП. С ростом напряженности ИЭП радиус электропор медленно растет, достигая критического, выше определенного значения поля (индивидуально для исследуемой клетки со всеми факторами среды) при $r > r_c$ и далее до r_{max} - разрыва мембраны. Это соответствует критической напряженности необратимого электропробоя, которая определяется в точке максимальной кривизны проводимости, рис.1. Интервал $r_{min} < r < r_c$ соответствует фазе обратимой электропорации мембраны с различной степенью ее повреждения и репарации.

3. Математическая модель

Для обоснования необходимой длительности импульса ГПИ используем модель сферической клетки радиуса R , рис. 2.

При воздействии внешнего ИЭП на мембране возникает индуцированный потенциал $\Delta\Phi_m$, который пропорционален напряженности поля и радиусу клетки согласно формулы [7]:

$$\Delta\Phi_m = 1,5 \cdot E R \cos\theta \left[1 - \exp\left(-\frac{\tau_u}{\tau_m}\right) \right] \lambda^{-1} \quad (1)$$

где E – напряженность поля, τ_u – длительность импульса, τ_m – время релаксации мембраны, θ –

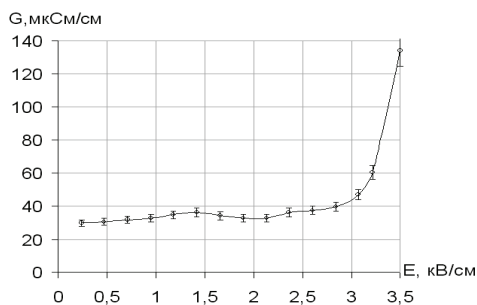
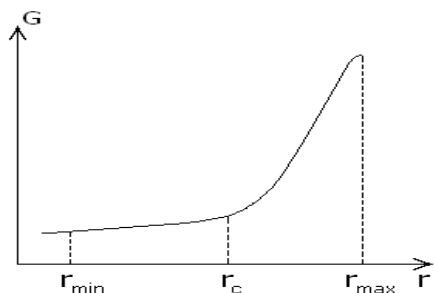


Рис. 1. а) Зависимость проводимости мембраны от радиуса пор согласно вероятностной модели электропорации;
б) экспериментальная зависимость проводимости ооцита мыши от напряженности поля.

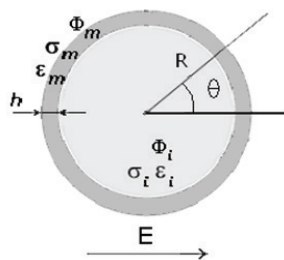


Рис. 2. Схема сферической клетки и ее электрические параметры, для оценки длительности импульса ГПИ

угол между нормалью к поверхности мембраны и вектором поля, λ – безразмерный параметр, имеющий порядок около 10^3 и учитывающий соотношение проводимостей среды, цитоплазмы и мембраны клетки [8].

Индукцированный потенциал пропорционален также и длительности импульса ГПИ [9]. В последнем легко убедиться, разлагая экспоненту в ряд Тейлора:

$$\Delta\Phi_m \approx 1,5 \cdot E R \cos\theta \left(\frac{\tau_u}{\tau_m} \right) \lambda^{-1} \quad (2)$$

Время релаксации мембраны для эритроцита равно

$$\tau_m = r_m C_m \left(\frac{1}{\sigma_i} + \frac{1}{2\sigma_e} \right) \approx 1,1 \text{ мкс} \quad (3)$$

где σ_i , σ_e – проводимости внутри и снаружи клетки соответственно, r_m , C_m – сопротивление и емкость мембраны.

Данную величину можно принять и для других клеток включая эмбриональные, поскольку строение их мембран, определяющее емкость и время релаксации при прохождении фронта импульса ИЭП, подобно эритроциту. Учитывая данное значение используя формулу (2), длительность импульса ИЭП по оси, проходящей через диаметр клетки (при максимальном действии напряженности поля, $\cos\theta=1$), равна:

$$\tau_u \approx \frac{\Delta\Phi_m \tau_m \lambda}{1,5 \cdot ER} \quad (4)$$

4. Решение основной оптимизационной задачи

Для решения основной оптимизационной задачи при нахождении значения длительности импульса необходимо решить следующие промежуточные задачи:

- определить взаимосвязи между основными факторами, оказывающими влияние на длительность импульса ГПИ и формализовать критерий оптимизации;
- пользуясь математической моделью процесса взаимодействия ИЭП с био-объектом определить значение минимальной длительности импульса, оптимальный угол между нормалью к поверхности мембраны и вектором поля;
- на основе теоретических и экспериментальных данных обосновать требования к основным параметрам генератора.

С учетом (4), для определения минимальной длительности импульса ИЭП запишем формулу в следующем виде

$$\tau_u \approx \frac{\Delta\Phi_m \tau_m \lambda}{1,5ER \cos\Theta} \quad (5)$$

где:

$U_{ax} \in [2;30]B$, $\Delta U_{ax} = 2B$ – входное напряжение;

$\lambda \in [650;950]$ – безразмерный параметр, учитывающий соотношение проводимости среды,

цитоплазмы и мембраны клетки;

$\tau_m = 1,1 \cdot 10^{-6}c$ – время релаксации мембраны;

$E = \frac{U_{ax}}{d}$ – напряженность поля;

$d = 2R$ – расстояние между электродами, равное удвоенному радиусу клетки;

$\Theta \in \left(-\frac{\pi}{2}; \frac{\pi}{2} \right)$ – угол между нормалью к поверхности мембраны и вектором поля.

Найдем потенциал пробоя, $\Delta\Phi_m$ проведя серию экспериментов, в результате которых построим регрессионную модель.

Оценим адекватности данной модели исследуемому процессу.

На основе F -критерия Фишера в работе [10] сделан вывод, что построенная модель адекватна и все коэффициенты регрессии значимы. Следовательно, такая модель может быть использована для принятия решений и осуществления дальнейшей оптимизации.

Подставляя заданные параметры и полученную зависимость (2) в выражение для определения длительности импульса (5), получим

$$\tau_u = \frac{1,1 \cdot \lambda}{0,75 \cdot U_{ax} \cdot \cos \Theta} \times (70,007 U_{ax}^4 + 26,85 U_{ax}^3 - 4,059 U_{ax}^2 + 32,91 U_{ax} - 7,654) \quad (6)$$

Поскольку основной задачей являлось определение минимального значения длительности импульса, в зависимости от угла воздействия поля на мембрану клетки Θ и параметра λ , проведем дальнейшую оптимизацию критерия (6) в виде функции $\tau_u(\lambda, \Theta)$.

Исследуем поведение функции $\tau_u(\lambda, \Theta)$ при различных U_{ax} и определим вектор $(\Theta_{onm}, \lambda_{onm})$, при котором функция длительности импульса достигает своего минимального значения.

Для построения поверхности $\tau_u(\lambda, \Theta)$ в системе Mathcad необходимо вычислить значения матрицы $\tau_{u_i}(\lambda_i, \Theta_i)$, где:

$$\Theta_i = \Theta_{\min} + \frac{i}{n} (\Theta_{\max} - \Theta_{\min}); \quad \Theta_{\min} = -\frac{\pi}{2} + \alpha;$$

$$\Theta_{\max} = \frac{\pi}{2} - \alpha; \quad \alpha - \text{некая достаточно малая величина}; \quad n = 20; \quad \lambda_i = \lambda_{\min} + \frac{i}{m} (\lambda_{\max} - \lambda_{\min}); \quad \lambda_{\min} = 600, \quad \lambda_{\max} = 950; \quad m = 15.$$

Введение параметра α обусловлено тем, что точки $-\pi/2$ и $\pi/2$ не принадлежат интервалу определения параметра Θ . После построения нескольких графиков поверхностей $\tau_{ui}(\lambda_i, \Theta_i)$ при различных α , следует, что для получения начального приближенного решения удобно выбрать $\alpha = 0,5$. Поскольку необходимо осуществить поиск минимума функции $\tau_u(\lambda, \theta)$, то введение параметра α не будет оказывать влияния на полученное решение. При начальном значении $U_{\text{ex}} = 2B$ получены значения матрицы $\tau_{ui}(\lambda_i, \Theta_i)$ и на их основе построен график поверхности, изображенный на рис.3.

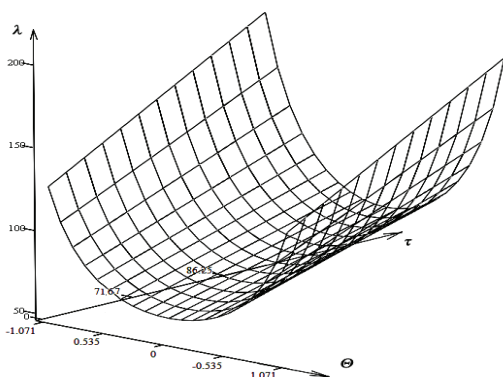


Рис. 3. График поверхности функции для длительности импульса при $U_{\text{ex}} = 2B$

Следующим этапом является определение минимальной длительности импульса, τ_{\min} , что соответствует величине формирования параметра импульса ГПИ для конкретного исследуемого биообъекта.

График контурных линий для длительности импульса, при $U_{\text{ex}} = 2B$, поверхности $\tau_u(\lambda, \theta)$, представленной на рис. 3, изображен на рис. 4. Так как функция $\tau_u(\lambda, \theta)$ определена и непрерывна в данной области, согласно теореме Вейерштрасса она имеет глобальный экстремум. Для данной функции существуют частные производ-

ные первого порядка $\frac{d}{d\lambda} f(\theta, \lambda)$ и $\frac{d}{d\theta} f(\theta, \lambda)$ на всей области определения: $\frac{d}{d\lambda} f(\theta, \lambda) \approx \frac{0.1}{\cos(\theta)}$,

$$\frac{d}{d\theta} f(\theta, \lambda) \approx \frac{0.1\lambda \sin(\theta)}{\cos^2(\theta)},$$

и, следовательно, для поиска оптимального значения τ_{\min} могут быть применены градиентные методы.

Для решения данной задачи применен метод наискорейшего спуска [11]. В качестве начального приближения были выбраны значения

$$\tau_{\text{нач}}(0,2;650) = 66,9643 ; \quad \Theta_{\text{нач}} = 0,2$$

$$\lambda_{\text{нач}} = 650$$

В результате получаем $\tau_{\min}(0;600) = 60,58 \text{ мкс}$. Аналогичные вычисления и построения проведены для всех значений $\tau_u(\lambda, \theta)$ из области определения U_{ex} .

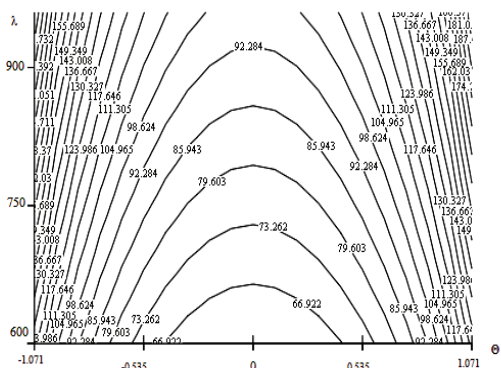


Рис.4. График контурных линий уровня $U_{\text{ex}} = 2B$

4. Заключение

На основе предложенной математической модели и решения оптимизационной задачи получены минимальные значения длительности импульса для эмбриональной клетки, имеющей сферическую форму ($\tau_{\min} \approx 60,5 \text{ мкс}$ для $\forall U_{\text{ex}} \in [2;30]$ при $\Delta U = 2B$). При этом направленность действия силовых линий поля должна быть перпендикулярно мембране. Определены границы применимости режимов электропорации и электропробоя при заданных параметрах генератора.

5. Литература

- [1] Pakhomov A.G., D. Miklavcic, M.S. Markov. *Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine*. -NY.: CRC Press, 2010. -528p.
- [2] YiKuen Lee, Deng PeiGang. Review

of micro/nano technologies and theories for electroporation of biological cells. *Sci. China Phys. Mech. Astron.*-2012.-V.55.-N.6.-P.996–1003.

[3] **Gowrishankar T.R., K.C. Smith, J.C. Weaver.** Transport-Based Biophysical System Models of Cells for Quantitatively Describing Responses to Electric Fields. *Proc. IEEE.*-2013.-V.101.-N2.-P.505-517.

[4] **Kee S.T., J. Gehl, E.W. Lee.** *Clinical Aspects of Electroporation.* -NY.: Springer, 2011.-268 p.

[5] **Шигимага В.А., Ю.Є. Мегель.** Применение метода импульсной кондуктометрии для исследования электрических характеристик биологических клеток. *Збірник наукових праць Інституту електро-динаміки НАН України.* Київ 2012, №31. 147- 154.

[6] **Шигимага В.А., Д.А. Левкин, Ю.Е. Мегель.** Математическое моделирование мембраны в связи с проводимостью клетки в различных растворах. *Восточно-европ. журн. передов. технол.* -Харьков.-2012.-№4/4 (58).-С.32-35.

[7] **Sakuma I.** A model analysis of aftereffects of highintensity DC stimulation on action potential of ventricular muscle/ I.Sakuma, T.Naraguchi, K.Ohuchi et al. //IEEE Trans. Biomed. Eng.-1998.-V.45.-P.258–267. С:\Users\Vania\AppData\Local\Microsoft\Windows\Temporary Internet Files\Content.IE5\KR4OVO6B\cgiexternal_ref?access_num=10.1109/10.661274&link_type=DOI

[8] **Шигимага В.А., Ю.Е. Мегель, А.И. Рыбалка, И.И. Калиманова.** Измерение электропроводности биологических клеток методом импульсной, *Proceedings 22th National scientific symposium “Metrology and metrology assurance 2012”* 10-14.09.12, Sozopol, Bulgaria.-2012.-P.212-218.

[9] **Мегель Ю.Е., В.А. Шигимага А.И. Рыбалка, И.И. Калиманова, А.А. Торба.** Аппаратная реализация импульсного метода измерения

проводимости клетки. // *Proceedings 22th National scientific symposium “Metrology and metrology assurance 2014”* 7-11.09.14, Sozopol, Bulgaria.-2014.-P.290-294.

[10] **Ю.Є. Мегель, А.П. Руденко, С.М. Коваленко, І.В. Данілко.** Математичні моделі (функціонування економіко-виробничих і технічних систем та методи їх дослідження). Харків: “Міськдрук”, 20013, 389с.

[11] **В.А. Шигимага, И.В. Чалый, С.Н. Коваленко.** Оптимизация параметров генератора прямоугольных импульсов для комплекса кондуктометрии клетки. *Зб. наук. праць за матеріалами XXII міжнародної Науково-практичної конференції «Інформаційні технології: наука, техніка, технології, освіта, здоров'я»*, Харків, 15-17 жовтня 2014. – Харків, НТУ «ХПІ», 2014 – 260 с.

Данные об авторах:

Юрий Евгениевич Мегель, Маг. инж. 1972, к.т.н 1988, д.т.н. 2004, профессор 2005; каф. Кибернетики, Национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенко; автоматизация биологических процессов; Виктор Александрович Шигимага, д.т.н, с.н.с. Институт животноводства НААН; Коваленко Светлана Николаевна доц., каф. Кибернетики, Национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенко; методы математического моделирования; Иванка Иванова Калиманова, маг. физ. 1969, д-р 1986, доцент 1991; кафедра точной механики и измерительных приборов, Технический университет Софии; оптические, электро-оптические и лазерные приборы, оптические измерения., Антонина Ивановна Рыбалка, маг. физ. 1969, к.ф.н. 1978, доцент 1989, кафедра физики, Харьковский национальный институт радиоэлектроники, оптические системы, моделирование оптических систем.

CONDUCTOMETRIC APPARATUS FOR MEASUREMENT OF CONDUCTIVITY OF LIVING SINGLE CELLS

Y. E. Megel¹⁾, V. A. Shigimaga²⁾, S. N. Kovalenko³⁾, I. I. Kalimanova⁴⁾, A. I. Rubalka⁵⁾

¹⁾ Kharkiv Vasilenko NTUA, St. Artema 44, city Kharkiv, Ukraine, 61002; e-mail: megel_ye@mail.ru

²⁾ Institute of Animal HAAH, Kharkov district, village Kharkov district, village. Kulinichi Street. 7th Guards Army, 3, 62404; e-mail: vash105@gmail.com

³⁾ Kharkiv Vasilenko NTUA, St. Artema 44, city Kharkiv, Ukraine, 61002; e-mail: kovalsvt@rambler.ru

⁴⁾ TY-Sofia, Blvd. Cl. Ohridski 8, Sofia 1000; e-mail: ikaliman@tu-sofia.bg

⁵⁾ KHNURE, Lenin Av. 14, city Kharkiv, Ukraine, 61002; e-mail: airybalka@mail.ru

Abstract: In the work on the basis of the examination of the conductometric methods and apparatus it has been shown that these methods cannot be applied directly for the conductivity measurement of single living cells. It is therefore necessary the design of technical means based on a new principle of impact of a pulsed electromagnetic field (PEF) with increasing intensity on these bio-objects and, respectively, the creation of the Squarewave Generator (SWG) with the given parameters. Furthermore, the pulse action solves the problems of the microelectrodes polarization and electrolysis in a liquid medium.

Key words: electroporation, the conductivity of cell membranes, pulsed electromagnetic field, generator of rectangular pulses, optimization of the parameters of the generator.

References

- [1] **Pakhomov A.G. D. Miklavcic, M.S. Mar-kov.** *Advanced Electroporation Techniques in Bi-ology and Medicine.* NY.: CRC Press, 2010.-528p.
- [2] **YiKuen Lee, Deng PeiGang.** Review of micro/nano technologies and theories for electro-poration of biological cells. *Sci. China Phys. Mech. Astron.*-2012.-V.55.-N.6.-P.996–1003.
- [3] **Gowrishankar T.R., K.C. Smith, J.C. Weaver.** Transport-Based Biophysical System Models of Cells for Quantitatively Describing Responses to Electric Fields. *Proc. IEEE.*-2013.-V.101.-N2.-P.505-517.
- [4] **Kee S.T., J. Gehl.** Clinical Aspects of Elec-troporation, E.W. Lee. -NY.: Springer, 2011.-268 p.
- [5] **Shigimaga V.A., Yu.С. Megel'.** Primeneniye metoda impul'snoy konduktometrii dlya issledovaniya elektricheskikh kharakteristik biologicheskikh kletok. *Zbirnik naukovikh prats' Institutu yelektrodi-namiki NAN Ukraini.* – Kiiv 2012, №31. – 147- 154.
- [6] **Shigimaga V.A., D.A. Levkin, Yu.YE. Megel'.** Matematicheskoye modelirovaniye mem-brany v svyazi s provodimost'yu kletki v razlichnykh rastvorakh. *Vostochno-yevrop. zhurn. peredov. tekhnol.* -Khar'kov.-2012.-№4/4(58).-S.32-35.
- [7] **Sakuma I.** A model analysis of afteref-fects of high-intensity DC stimulation on action potential of ventricular muscle/ I.Sakuma, T.Hara-guchi, K.Ohuchi et al. //IEEE Trans. Biomed. Eng.-1998.-V.45.-P.258–267. C:\Users\Vania\AppData\Local\Microsoft\Windows\Temporary Internet Files\Content.IE5\KR4OVO6B\cgiexternal_ref?access_num=10.110910.661274&link_type=DOI
- [8] **Shigimaga V.A., Yu.YE. Megel', A.I. Rybalka, I.I. Kalimanova.** Izmereniye elektro-provodnosti biologicheskikh kletok metodom impul'snoy konduktometrii. *Proceedings 22th National scientific symposium "Metrology and metrology assurance 2012"* 10-14.09.12, Sozopol, Bulgaria.-2012.-P.212-218.
- [9] **Megel' Yu.YE., V.A. Shigimaga A.I. Rybalka, I.I. Kalimanova, A.A. Torba.** Apparalnaya realizatsiya impul'snogo metoda izmereniya provodimosti kletki. *Proceedings 22th National scientific symposium "Metrology and metrology assurance 2014"* 7-11.09.14, Sozopol, Bulgaria.-2014.-P.290-294.
- [10] **Megel' Yu.E., A.P.Rudenko, S.M. Kovalenko, I.V.Danilko.** Matematichni modeli (funktsionuvannya yekonomiko-virobnichikh i tekhnichnikh sistem ta metodi ikh doslid-zhennya). Kharkiv: "Mis'kdruk", 20013. – 389s.
- [11] **Shigimaga V.A, I.V. Chalyy, S.N. Kovalenko.** Optimizatsiya parametrov generatora pryamougol'nykh impul'sov dlya kompleksa konduktometrii kletki. / Zb. nauk. prats' za materialami. *XXII mizhnarodnoi Naukovo-praktichnoi konferentsii «Informatsiyni tekhnologii: nauka, tekhnika, tekhnologii, osvita, zdorov'ya»*, Kharkiv, 15-17 zhovtnya 2014. – Kharkiv, NTU «KHPI», 2014 – 260 s.

КОНДУКТОМЕТРИЧНА АПАРАТУРА ЗА ИЗМЕРВАНЕ НА ПРОВОДИМОСТТА НА ЖИВИ ЕДИНИЧНИ КЛЕТКИ

*Ю.Е. Мегель¹⁾, В.А. Шигимага²⁾, С.Н. Коваленко³⁾,
И.И. Калиманова⁴⁾, А.И. Рыбалка⁵⁾*

Резюме: В работата въз основа на разглеждането на кондуктометричните методи и апаратура е показано, че тези методи не могат да бъдат приложени директно за измерване на електропроводимостта на единични живи клетки. Поради това е необходимо проектирането на технически средства въз основата на нов принцип на въздействие на импулсно електромагнитно поле (ИЕП) с нарастваща напрегнатост върху тези биообекти и съответно създаване на генератор на правоъгълни импулси (ГПИ) със зададени параметри. При това импулсното въздействие решава проблемите с поляризацията и електролизата на микроелектродите в течна среда.

Ключови думи: електропорация, пропускливост на клетъчните мембрани, импулсно електромагнитно поле, генератор на правоъгълни импулси, оптимизация на параметрите на генератора.