Литература

1. **Phillips W. D., Cooke W. E., Kleppner D.** Magnetic Moment of the Proton in H_2O in Bohr Magnetons // Phys. Rev. Lett. 1975. V. 35. P. 1619—1622.

2. **Phillips W. D., Cooke W. E., Kleppner D.** Magnetic Moment of the Proton in H_2O in Bohr Magnetons // Metrologia. 1977. V. 13. P. 179—195.

3. **Hindman J. C.** Proton resonance shift of water in the gas and liquid states // J. Chem. Phys. 1966. V. 44. P. 4582—4592.

4. **Mohr P. J., Taylor B. N.** CODATA recommended values of the fundamental physical constants // Rev. Mod. Phys. 2005. V. 77. N 1. P. 1—105.

5. **Sundholm D., Gauss J., Schafer A.** Rovibrationally averaged nuclear magnetic shielding tensors calculated at the coupled-cluster level // J. Chem. Phys. 1996. V. 105. N 24. P. 11051—11059.

6. **Garbacz P. e. a.** Weak intermolecular interactions in gas-phase NMR // J. Chem. Phys. 2011. V. 135. Iss. 8. P. 1—9.

7. **Неронов Ю. И., Барзах А. Е.** Определение магнитного момента ядра Не-3 с погрешностью $2 \cdot 10^{-6}$ % // ЖЭТФ. 1978. Т. 75. Вып. 5(11). С. 1521—1540.

8. **Неронов Ю. И., Серегин А. Н.** Разработка ЯМР-спектрометра для прецизионного определения частот резонанса ядер // Измерительная техника. 2010. № 8. Р. 65—70; **Neronov Yu. I., Seregin A. N.** The development of an NMR spectrometer for the precision determination of the ratio of the resonance frequencies of nuclei // Measurement Techniques. 2010. V. 53. N 8. P. 926—935.

9. **Неронов Ю. И., Серегин Н. Н.** Прецизионная оценка магнитного момента ядра гелия-3 // ЖЭТФ. 2012. Т. 142. Вып. 3(9). С. 1—6.

10. **Harris R. K. e. a**. Further conventions for NMR shielding and chemical Shifts // Pure Appl. Chem. 2008. V. 80. N 1. P. 59—84.

Дата принятия 28.05.2012 г.

МЕДИЦИНСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ

543.555:57.086.8

Импульсный кондуктометр для биологических клеток и жидких сред

В. А. ШИГИМАГА

Институт животноводства НААН Украины, Харьков, Украина, vash105@gmail.com

Разработано новое нестандартное средство измерительной техники для кондуктометрии биологических клеток и жидких сред в импульсном электрическом поле с возрастающей напряженностью. Проведена ведомственная метрологическая аттестация импульсного кондуктометра согласно действующим нормативным документам СНГ и Украины. Показаны некоторые результаты применения кондуктометра.

Ключевые слова: *импульсный кондуктометр, метрологическая аттестация, биологическая клетка, жидкая среда.*

The new non-standard measuring instrument for biological cells and liquid media conductometry in pulse electric field with increasing intensity is developed. The metrological attestation of pulse conductometer according to actual normative documents of Russia and Ukraine is carried out. The certain results of developed conductometer application are shown.

Key words: *pulse conductometer, metrological attestation, biological cell, liquid medium.*

Импульсный кондуктометр — средство измерения электрической проводимости биологических, в частности, репродуктивных клеток (ооцитов), эмбрионов и жидких сред в импульсном электрическом поле (ИЭП). Он предназначен для применения в биотехнологии репродукции животных (реконструкция эмбрионов путем электрослияния), исследования динамики электропорации мембраны в возрастающем ИЭП, стимуляции развития ооцитов in vitro, изучения характера взаимодействия мембраны с криопротекторами, прижизненной оценки скрытых отклонений развития ооцитов, оценки качества жидких сред, в частности, деионизованной воды и биотехнологических сред на ее основе [1, 2].

Исходным материалом для разработки импульсного кондуктометра послужили данные предварительных исследований характера электропроводности ооцитов, эмбрионов млекопитающих и различных водных растворов в ИЭП с возрастающей напряженностью, полученные при помощи макетов измерительной аппаратуры, разработанной одновременно с этими исследованиями [3—5]. В дальнейшем для их обоснования были использованы известные методы основ радиотехники и расчетов схем радиоэлектронной измерительной аппаратуры [6]. Для теоретического обобщения самого процесса и результатов измерения проводимости построено несколько моделей взаимодействия ИЭП с биологической клеткой — электродинамическая, радиотехническая и математическая, что также позволило найти оптимальные параметры измерительной аппаратуры.

Конструкция кондуктометра представляет собой комплекс электронных, оптических и механических устройств, которые позволяют измерять удельную электрическую проводимость одиночной биологической клетки или жидкой среды при воздействии на них ИЭП. В состав измерительного устройства входят: генератор прямоугольных импульсов (ГПИ) напряжения с изменяемыми амплитудой и длительностью; цифровой двухканальный осциллограф RIGOL (DS5-060308); микроэлектроды из золотой нити, запаянной в стеклянный капилляр из пирекса [7]; позиционеры для микроманипуляций (П54.135.028 ТО); инвертированный микроскоп БИОЛАМ-П1 (Ю-33.23.719 ТО) с автоматическим регулятором температуры столика. В один из окуляров микроскопа встроена шкала для измерения геометрических параметров клеток и микроэлектродной ячейки.

Подключение радиоэлектронных средств измерительной техники (СИТ) выполнено через плату внешних соединений. Плата закреплена на предметном столике микроскопа в непосредственной близости от микроэлектродов, чтобы снизить электрические наводки на сигнальные провода. Выход ГПИ соединен с платой кабелем РК-50. Микроэлектроды закреплены в держателях позиционеров, имеют по три степени свободы и при измерениях находятся в поле зрения микроскопа. Используется их соосная конфигурация, поскольку она удобна для кондуктометрии клеток и жидких сред, а также для упрощения расчетов проводимости. Микроскоп и позиционеры установлены на массивной виброгасящей плите для подавления механических колебаний микроэлектродов и клетки в процессе измерений. В качестве вспомогательного оборудования в комплексе применены следующие устройства. Для наблюдения и видеозаписи морфологической динамики клеток в средах (при воздействии возрастающего ИЭП) в окуляр микроскопа встроена цветная микровидеокамера VA-32C (Корея) с выходом на видеомагнитофон Panasonic (Япония) и монитор Daewoo (Корея).

Импульсный кондуктометр позволяет измерять удельную проводимость одиночных клеток животных и жидких сред в диапазоне 0,1—10^5 мкСм/см (с погрешностью не более 4 %) в ИЭП напряженностью 0,02—10 кВ/см и некоторые биофизические параметры клетки, например, электрическую прочность мембраны и емкость [1, 4].

Измерительная схема, методика измерений и обработка первичных данных. Проводимость объекта определяется путем использования калиброванного резистора, включенного последовательно с объектом, в качестве основы известной кондуктометрической схемы [8]. Она удобна тем, что благодаря равенству токов, текущих через объект и резистор, достаточно измерить падение напряжения на резисторе и входное напряжение, затем рассчитать проводимость объекта, не внося в него возмущений при измерении. При этом получаем прогнозируемую систематическую составляющую погрешности измерения, зависящую от соотношения проводимостей резистора и объекта. Выбрав резистор с проводимостью значительно больше, чем у объекта, можно снизить эту составляющую погрешности до 1 % и менее.

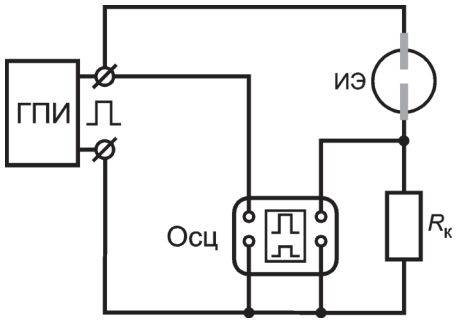

Рис. 1. Измерительная схема импульсного кондуктометра:

ГПИ — генератор прямоугольных импульсов; *ИЭ* — измерительные микроэлектроды; *Осц* — двухканальный осциллограф; $R_к$ — прецизионный калиброванный резистор, выбираемый для масштаба из ряда 0,01—100 кОм (0,05 %) декадным переключателем

Измерительная схема импульсного кондуктометра показана на рис. 1. Электрическая схема *ГПИ* реализована на элементной базе из отечественных радиодеталей. Технические характеристики генератора: амплитуда прямоугольных импульсов 0—98 В (нестабильность 0,1 %), длительность импульсов 2—300 мкс (нестабильность 0,5 %), длительность фронта импульса 50—120 нс (в зависимости от амплитуды).

Измерение проводимости одиночных клеток животных выполняется при помощи оригинальной методики в неэлектролитной (диэлектрической) среде, в качестве которой используют маннит, сахарозу или глюкозу (SIGMA) в растворе деионизованной апирогенной воды. Объекты исследования располагают на предметном стекле столика микроскопа в капле среды между двумя соосными микроэлектродами и подвергают воздействию возрастающего по амплитуде импульсного напряжения с заданной длительностью импульса и определенным периодом следования в зависимости от цели измерений. Проводимость объекта в межэлектродном пространстве вычисляют по формуле

$$G = U_R / [R\,(U_{вых} - U_R)], \qquad (1)$$

где G — проводимость, См; U_R — падение напряжения, В, на прецизионном резисторе сопротивлением R, Ом; $U_{вых}$ — выходное напряжение ГПИ, В.

Выходное напряжение ГПИ измеряют по одному каналу осциллографа, а напряжение на прецизионном резисторе — по другому. Удельную проводимость объекта вычисляют как $G_{уд} = Gk$, где k — геометрический фактор микроэлектродной ячейки [9],

$$k = 12\left(1 + \sqrt{1+\frac{4L^2}{d^2}}\right) \Bigg/ \left\{\pi\left[3\,\frac{d^2}{L}\left(1 + \sqrt{1+\frac{4L^2}{d^2}}\right) + 4L\right]\right\}; \qquad (2)$$

L — расстояние между микроэлектродами; d — диаметр одного из них.

В разработанном кондуктометре d = 55 мкм, а расстояние между электродами может меняться в ходе опыта и непосредственно измеряется в делениях по шкале окуляр-микрометра микроскопа, поэтому геометрический фактор k удобно протабулировать заранее.

Собственная проводимость клетки в функции напряженности ИЭП. Вначале измеряют общую проводимость клетки и жидкой среды в ИЭП с линейно возрастающей от нуля напряженностью (при увеличении выходного напряжения ГПИ). Затем при таком же воздействии измеряют проводимость только среды, отводя микроэлектроды в сторону от клетки. Рассчитывают обе удельные проводимости клетки со сре-

Таблица 1

Экспериментальные данные измерения прецизионных резисторов

Номер группы	R_N, Ом (G_N, мкСм)	G_i, мкСм	$\overline{G}$, мкСм	σ_G, мкСм	$\pm\,\Delta_G$, мкСм	$\pm\,\delta_G$, %
1	500 ($2 \cdot 10^3$)	1992; 2016; 2008; 2008; 1992	2003	10,7	29,7	1,5
2	10^3 (10^3)	995; 1001; 993; 998; 1004	998	4,4	12,2	1,2
3	10^4 (10^2)	100,1; 99,2; 99,6; 100,2; 99,4	99,7	0,4	1,11	1,1
4	10^5 (10)	10,01; 10,08; 10,01; 9,92; 10,02	10,01	0,057	0,16	1,6
5	10^6 (1)	0,999; 1,008; 1,004; 0,994; 1,001	1,001	0,0053	0,015	1,5
6	10^7 (0,1)	0,0993; 0,1001; 0,0999; 0,1001; 0,0999	0,0999	0,00033	0,00092	0,9
7	10^8 (0,01)	0,01001; 0,00993; 0,00992; 0,00996; 0,01002	0,00997	0,000046	0,00013	1,3

дой и среды без клетки по одному алгоритму — по (1), (2). Наносят результаты расчета на график $G_{уд} = f(E)$, где E — напряженность электрического поля,

$$E = (U_{вых} - U_R)/L.$$

Для получения проводимости только клетки вычитают соответствующие ординаты на графике или вычисляют ее сразу аналитически по формуле, введенной в алгоритм расчета проводимости [10]. Вычисления и построение графиков выполняют при помощи любого офисного программного пакета, например, Microsoft Excel 2000.

Метрологическая аттестация (МА) импульсного кондуктометра. Разработка конструкции нового нестандартного прибора и методики измерения предусматривает аттестацию метрологических характеристик устройства. Для этой цели создана программа на основе действующих нормативных документов: национальных и межнациональных стандартов: ДСТУ 1.5:2003. Національна стандартизація. Правила побудови, викладання, оформлення та вимоги до змісту нормативних документів; ДСТУ 3215—95 Метрологія. МА засобів вимірювальної техніки. Організація та порядок проведення; ДСТУ 2681—94 Метрологія. Терміни та визначення; ГОСТ 8.326—89. ГСИ. Метрологическая аттестация средств измерений; ГОСТ 8.010—99. МВИ. Основные положения; ГОСТ 8.009:2008 Нормируемые метрологические характеристики средств измерений. Использована также дополнительная техническая документация — отчеты по НИОКР Института животноводства НААН (2006 — 2010 гг.).

Согласно схеме измерения определены метрологические характеристики, которые подлежат аттестации: диапазон измерения проводимости, основная относительная инструментальная погрешность измерения и линейность измерительной схемы.

Диапазон измерения проводимости. Поскольку по определению проводимость — величина обратная сопротивлению, для установления ее диапазона измерения импульсным кондуктометром целесообразно воспользоваться прецизионными резисторами. Определив сопротивление каждого из группы этих резисторов, нужно сравнить его с номинальным значением и, взяв обратную величину, установить диапазон измерения проводимости. Для этого использованы прецизионные резисторы, предназначенные для работы в цепях импульсного тока, типа С2-29В (БАДК.430410.002 ТУ), 0,5 Вт, с гарантированным допуском (± 0,05) % и номинальными значениями, кратными 10 (кроме 500 Ом) в интервале 500 — $1 \cdot 10^8$ Ом или в единицах проводимости 0,01 — $2 \cdot 10^3$ мкСм. Резисторы подключали к измерительной схеме вместо микроэлектродов к их штатным разъемам (см. рис. 1). Установленный диапазон измерения проводимости составил 0,00997 — $2{,}003 \cdot 10^3$ мкСм.

Основная относительная инструментальная погрешность. Для этого вычисляли проводимости G_N группы сопротивлений R_N тех же прецизионных резисторов (табл. 1). По измеренным значениям G_i в группах для каждого номинального сопротивления резистора находили среднее значение проводимости

$$\overline{G} = \frac{1}{5}\sum_{i=1}^{5} G_i,$$

среднее квадратическое отклонение проводимости в каждой группе

$$\sigma_G = \frac{1}{4}\sqrt{\sum_{i=1}^{5}\left(G_i - \overline{G}\right)^2}.$$

Далее вычислены и занесены в табл. 1 абсолютная Δ_G и относительная δ_G инструментальные погрешности измерения в группах:

$$\Delta_G = \pm\, t_\alpha\, \sigma_G; \quad \delta_G = \pm\,\Delta_G / \overline{G},$$

где $t_\alpha = 2{,}78$ — коэффициент Стьюдента ($\alpha = 0{,}95$, $n = 5$).

Максимальная основная относительная инструментальная погрешность измерения вычислена по формуле [11]:

$$\delta = \pm\sqrt{\delta_G^2 + \delta_N^2 + \delta_{осц}^2 + \delta_t^2 + \delta_R^2}$$

и составляет $\delta = \pm$ 3,4 %, где $\delta_G = \pm$ 1,6 % — максимальная относительная инструментальная погрешность измерения по группам (см. табл. 1); $\delta_N = \pm\sqrt{4kT(R_к + R_N)\Delta f}\,/\,U_R = \pm$ 0,1 % —

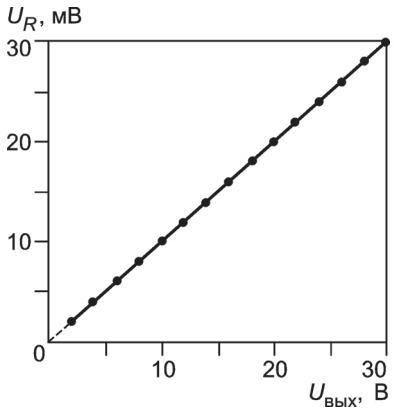

Рис. 2. График экспериментальных точек аппаратной функции, сглаженных линейной аппроксимацией

относительная погрешность измерения напряжения из-за теплового шума Найквиста на калиброванном $R_к$ и прецизионном R_N резисторах; $\Delta f = (2{,}5\tau_ф)^{-1}$ — полоса пропускания; $\tau_ф$ = 100 нс — длительность фронта импульса; k — постоянная Больцмана; T = 300 К — абсолютная температура; $\delta_{осц}$ = = ± 3 % — относительная погрешность цифрового осциллографа RIGOL DS5022M (по паспорту); δ_t = ± 0,015 % — относительная погрешность по температурному коэффициенту сопротивления прецизионных резисторов типа С2-29В (допуск по ТУ); δ_R = ± 0,1 % — относительная погрешность сопротивления того же резистора.

Линейность измерительной схемы. Проверка линейности измерительной схемы импульсного кондуктометра включает одновременное измерение двухканальным осциллографом амплитуды напряжения U_R на калиброванном резисторе $R_к$ и выходного напряжения $U_{вых}$ от ГПИ, построение зависимости $U_R(U_{вых})$, т. е. аппаратной функции [12] и определение путем линейной аппроксимации измеренных значений максимального отклонения экспериментальных точек от аппроксимирующей прямой.

На рис. 2 показан график экспериментальной зависимости (аппаратной функции). Измерения проведены на резисторе типа С2-29В сопротивлением 1 кОм (± 0,05 %), а вместо микроэлектродов *ИЭ* (см. рис. 1) в последовательную цепь включен прецизионный резистор типа С2-29В сопротивлением 1 МОм (± 0,1 %). Из рис. 2 следует, что экспериментальные точки хорошо аппроксимируются линейной зависимостью. Уравнение линейной регрессии имеет вид

$$U_R = 0{,}997U_{вых} + 0{,}0287 \qquad (3)$$

с коэффициентом детерминации R^2 = 0,9999.

Максимальное расчетное отклонение экспериментальных точек от аппроксимирующей прямой (3) не более ± 0,8 %. Это позволяет утверждать, что все нелинейности, превышающие указанное отклонение и возникающие при измерениях проводимости реальных биообъектов и жидких сред в зависимости от напряженности ИЭП, необходимо отнести только на счет индивидуальных нелинейных свойств этих объектов.

Исследованные метрологические характеристики импульсного кондуктометра в сравнении с приведенными в инструкции по эксплуатации сведены в табл. 2.

Таблица 2

Метрологические характеристики кондуктометра

Характеристика	Значение характеристики	
	заявленное	фактическое
Диапазон измерения проводимости, мкСм	0,01 — $2 \cdot 10^3$	0,00998 — $2{,}003 \cdot 10^3$
Основная относительная инструментальная погрешность измерения проводимости, %	± 3,5	± 3,4
Нелинейность измерительной схемы не более, %	± 1	± 0,8

Таким образом, импульсный кондуктометр по основным техническим характеристикам метрологически аттестован ведомственной комиссией Института животноводства Национальной академии аграрных наук Украины как нестандартное средство измерений проводимости одиночных клеток и жидких сред с выдачей свидетельства № 1 от 17.06.2011.

На рис. 3 в качестве примеров основного применения импульсного кондуктометра показаны полученные зависимости проводимости от напряженности E ИЭП для некоторых клеток и жидких сред. На рис. 3, *а* кривая проводимости ооцита *1* имеет резкий подъем — необратимый электрический пробой мембраны при E = 3,1 кВ/см; на кривой проводимости двухклеточного эмбриона *2* виден обратимый пробой места контакта мембран двух бластомеров при напряженности поля около 1,1 кВ/см и их необратимый пробой при 2,7 кВ/см. На обеих зависимостях видны многократные обратимые колебания проводимости (электропорация) мембран клеток. Проводимости жидких диэлектрических сред на рис. 3, *б* почти не зависят от напряженности поля. Их колебания проводимости на некоторых кривых показывают наличие именно в растворяемом веществе проводящих примесей, которых нет в растворителе (деионизованной воде).

Разработанный измерительный комплекс можно использовать и для других работ с применением импульсных электрофизических воздействий, в основе которых лежит кондуктометрия: реконструкции эмбрионов (клонирование, получения клеточных химер и т. п.) [1, 4]; исследования параметров электропорации мембран клеток в различных средах, в том числе и в растворах криопротекторов [13—15]; контроля чистоты жидких диэлектриков, дистиллированной воды, воды из природных источников, меда [16], различных биотехнологических сред на водной основе и т. п.

Таким образом, разработан и метрологически аттестован импульсный кондуктометр в составе комплекса аппаратуры для измерения электрической проводимости биологических клеток и жидких сред в импульсном электрическом поле с изменяемой напряженностью.

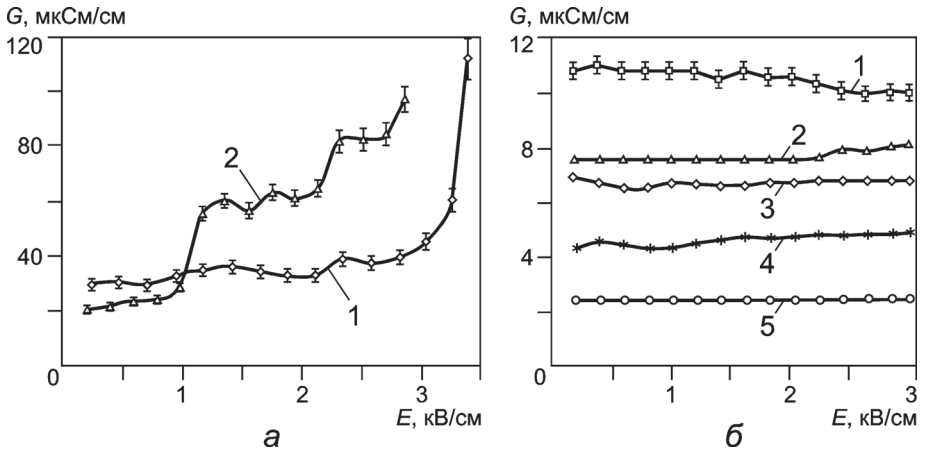

Рис. 3. Зависимости проводимости от напряженности ИЭП:

а — ооцита *1* и двухклеточного эмбриона мыши *2* в 0,3М сахарозе; *б* — глюкозы, сахарозы, маннита (все 0,3М), липового меда и апирогенной деионизованной воды — соответственно кривые *1* — *5*

Литература

1. **Шигимага В. А.** Метод и аппаратура импульсной кондуктометрии одиночных клеток животных и жидких сред // Актуальные вопросы биофизики и химии: VII Междунар. науч.-техн. конф. Севастополь, 2011. С. 25—26.

2. **Пат. 22334 Україна.** Імпульсний кондуктометр для рідин / В. О. Шигимага, В. І. Лісін // Опубл. 25.04.07. Бюл. № 5.

3. **Шигимага В. А.** Определение проводимости эмбриональных клеток животных // Проблемы бионики. Харьков, 2003. Вып. 59. С. 60—64.

4. **Шигимага В. А.** Опыт разработки аппаратуры и технологии электроманипуляции с клетками животных // Електрифікація та автоматизація сільського господарства. Київ, 2007. № 1(20). С. 53—63.

5. **Пат. 20187 Україна.** Спосіб визначення провідності рідких середовищ / В. О. Шигимага // Опубл. 15.01.07. Бюл. № 1.

6. **Шигимага В. А., Мегель Ю. Е.** Применение метода импульсной кондуктометрии для исследования электрических характеристик биологических клеток // Труды Института электродинамики НАН Украины. Киев, 2012. Вып. 31. С. 147—155.

7. **Лисин В. И.** Методика изготовления металлических микроэлектродов // Вісник Полтавського ДСГІ. 2001. № 2—3. С. 41—42.

8. **Андреев В. С.** Кондуктометрические методы в биологии и медицине. М.: Медицина, 1973.

9. **Шигимага В. А.** Форм-фактор кондуктометрической ячейки с изменяемой геометрией // Восточно-европейский журнал передовых технологий. Харьков, 2010. № 6/5 (48). С. 45—48.

10. **Шигимага В. А.** Кондуктометрия клеток животных в средах с произвольной проводимостью // Вестн. НТУ ХПИ. Новые решения в современных технологиях. Харьков, 2010. № 57. С. 100—104.

11. **Новицкий П. В., Зограф И. А.** Оценка погрешностей результатов измерений. Л.: Энергоатомиздат, 1991.

12. **Соловьев А. В., Луизова Л. А.** Учебное моделирование и исключение аппаратных искажений // Фундаментальные исследования. 2004. № 3. С. 84—86.

13. **Strikha O. A. e. a.** The effect of ovary hormone stimulation on mouse oocyte and early embryo electric conductivity / 8-th EBSA Europ. Biophys. Congr. Budapest (Hungary) // Europ. Biophys. J. 2011. V. 40. P. 240.

14. **Смольянинова Е. И., Шигимага В. А., Гордиенко Е. А.** Влияние криопротекторов на электрическую проводимость ооцитов мыши // Биофизика живой клетки: Материалы конф. «Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия». Пущино, 2008. Т. 9. С. 124.

15. **Пат. 30272 Україна.** Спосіб визначення параметрів електропробою мембрани клітини за кривизною провідності / В. О. Шигимага // Опубл. 25.02.08. Бюл. № 4.

16. **Шигимага В. А., Колбина Л. М.** Измерение удельной электропроводности натурального меда // Материалы междунар. науч.-практ. конф.: Науч.-техн. бюл. ИЖ НААН. Харьков, 2009. № 100. С. 509—514.

Дата принятия 11.09.2012 г.