

3. Бугаев А. С., Ивашов С. И., Иммореев И. Я. Биорадиолокация. М.: Изд-во МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2010.

4. Астафьева Н. М. Вейвлет-анализ: основы теории и примеры применения // УФН. 1996. Т. 166. № 11. С. 1145—1170.

5. Пат. 2097085 РФ. Микроволновый индикатор жизни / О. И. Фисун, Д. В. Хаблов, В. Р. Осипов // Изобретения, 1997. № 33.

6. Совлуков А. С., Хаблов Д. В. Возможности радиоволновых методов для обнаружения живых людей за преградами по дыханию и сердцебиению // Датчики и системы. 2012. № 7. С. 74—84.

7. Хаблов Д. В. Прямое непрерывное вейвлет-преобразование в обработке сигналов радиоволновых датчиков // Измерительная техника. 2013. № 5. С. 31—34; Khablov D. V. The direct continuous wavelet transformation in the processing of radio-wave sensor signals // Measurement Techniques. 2013. V. 56. N. 5. P. 510—516.

8. Дьяконов В. П. MATLAB 6.0/6.1/6.5/6.5+SP1+Simulink 4/5. Обработка сигналов и изображений. М: Солон-Р, 2006.

Дата принятия 10.12.2013 г.

621.317.33:57.086.8

Измерения емкости биологической клетки импульсным методом

В. А. ШИГИМАГА

Институт животноводства НААН Украины, Харьков, Украина, e-mail: vash105@gmail.com

Предложен метод измерений электрической емкости биологической клетки с применением разработанной ранее аппаратуры импульсной кондуктометрии. Метод основан на дифференцировании RC-цепью прямоугольного импульса напряжения, приложенного к клетке при помощи микроэлектродов.

Ключевые слова: электрическая емкость, биологическая клетка, мембрана.

The measurement method of biological cell capacitance using pulse conductometry device is proposed. The measurement principle consists in the use of RC-chain property containing the cell capacitance, to differentiate rectangular pulse of the voltage attached to the cell by means of microelectrodes.

Key words: electrical capacitance, pulse, biological cell, membrane.

Методы измерений электрической емкости биологической клетки и, прежде всего, ее основной составляющей, мембраны, привлекают внимание исследователей уже длительное время. Изменение этой емкости отражает особенности прохождения многих процессов в клетке, так или иначе связанных с транспортом макромолекул сквозь мембрану, их взаимодействием с ней и клеток друг с другом через мембранные контакты [1—5].

В условиях взаимодействия с электрическим полем мембрану можно рассматривать как конденсатор малой толщины с высокой плотностью заряда и хорошими диэлектрическими свойствами [1, 5]. Эти свойства полезны для изучения биологии клетки, поскольку емкость конденсатора пропорциональна площади его поверхности. Измерив емкость путем воздействия на клетку электрическим полем, можно оценить ее фактическую поверхность по известной поверхностной плотности емкости мембраны различных биологических клеток, составляющей около 1 мкФ/см² [1, 6, 7]. Поэтому электрическую емкость клетки (мембраны) можно принять в качестве адекватного критерия ее жизнедеятельности, а также влияния различных физико-химических факторов в биотехнологических процессах: реконструкции, криоконсервации, электропорации и т. д.

Основными методами измерений емкости мембраны являются довольно сложный в техническом отношении пэтч-кламп, его модификации, а также им подобные микрока-

пиллярные методы [5, 7—10]. Емкость обычно измеряется на переменном токе частотой десятки килогерц как часть импеданса, который включает активную и реактивную (в данном случае емкостную) составляющие; импульсное электрическое поле (ИЭП) практически не используется. Техника измерения импеданса двухэлектродная с введением одного микрокапилляра, наполненного проводящей средой, внутрь клетки, а второй остается снаружи [5, 9, 10]. Сопротивление (проводимость) и емкость мембраны можно измерить одновременно в составе импеданса (адмиттанса) и

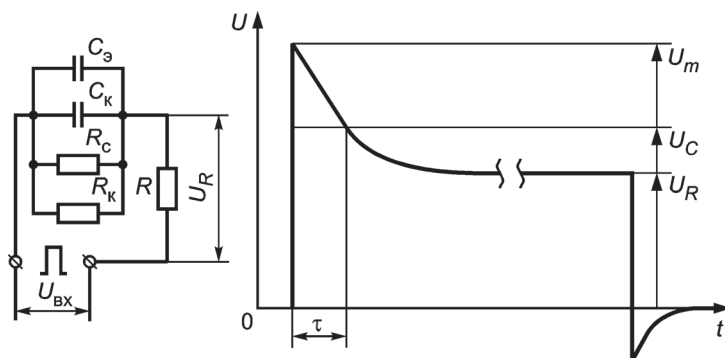


Рис. 1. Эквивалентная электрическая схема клетки в среде между микроэлектродами и эпюра напряжения на калиброванном резисторе R

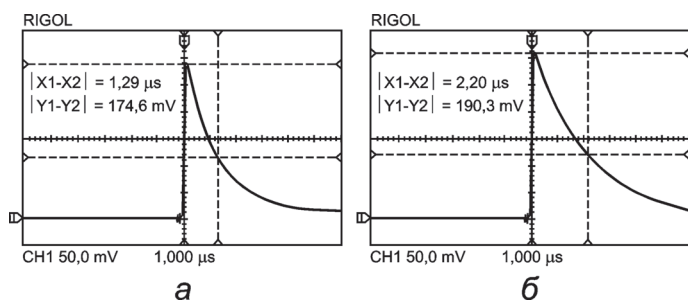


Рис. 2. Осциллограммы дифференцированного по фронту напряжения прямоугольного импульса в среде с клеткой (б) и при ее отсутствии (а)

отдельно, используя эквивалентную электрическую схему измерения и модели [2, 6—8, 11]. Общие положения рассмотрены в теоретических моделях импеданса, построенных для искусственных билипидных мембран [12]. Представив мембрану и клетку эквивалентной электрической схемой, можно установить значения их электрических параметров при воздействии переменных электрических полей, в том числе и ИЭП [7, 9, 11].

В качестве модельного объекта для измерений импеданса и (или) емкости биологических клеток часто используют репродуктивные клетки (ооциты) шпорцевой лягушки [2, 4, 13, 14]. Ооциты, а также ранние эмбрионы млекопитающих в этом отношении почти не изучены, имеются лишь единичные работы по этим клеткам [15]. Между тем, это основные объекты интенсивно развивающихся ныне методов репродуктивной биотехнологии животных и медицины, а также криобиологии.

Таким образом, разработка новых методов и технических средств измерений емкости биологических клеток, особенно репродуктивных, является целесообразной и актуальной задачей в связи с широким вовлечением этих объектов в различные биотехнологические процессы.

В основу метода измерений положен известный в радиотехнике принцип дифференцирования прямоугольного импульса RC -цепью [16]. Измерительная схема реализована на базе описанной ранее схемы импульсного кондуктометра с применением тех же технических средств [17]. Ем-

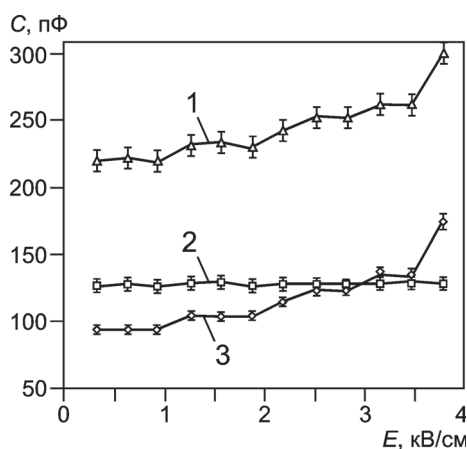


Рис. 3. Зависимости емкости от напряженности ИЭП: 1 — ооцита мыши и микроэлектродов в среде; 2 — микроэлектродов; 3 — ооцита мыши

кость клетки, как и проводимость, измеряют при использовании калиброванного резистора, включенного между микроэлектродами последовательно с объектом и входящего в дифференцирующую RC -цепь. На рис. 1 показана эквивалентная электрическая схема клетки в среде между микроэлектродами и эпюра напряжения на резисторе, где C_0 — емкость микроэлектродов в жидкой среде; C_k , R_k — емкость и сопротивление клетки; R_c — сопротивление жидкой среды; R , U_R — калиброванный резистор и падение напряжения на его сопротивлении; $U_{вх}$ — напряжение на входе схемы, U_m — максимальное напряжение по фронту при заряде емкости, U_c — напряжение на емкости, уменьшенное после ее разряда в $e \approx 2,72$ раза; τ — постоянная времени разряда емкости.

Для измерения емкости клетки, как и ее проводимости, используют непроводящие водные растворы сахарозы или многоатомных спиртов, а сопротивление клетки в режиме обратимой электропорации определяется, в основном, большим сопротивлением мембраны постоянному току, который задается прямоугольным импульсом на входе измерительной схемы. Поэтому общее сопротивление жидкой среды и клетки также будет велико по сравнению с калиброванным резистором, который выбирают заведомо меньше каждого из них. Следовательно, можно считать, что процесс дифференцирования импульса по фронту полностью определяется зарядно-разрядным процессом суммарной емкости клетки и микроэлектродов в среде через калиброванный резистор. Остается лишь выделить эти две составляющие, чтобы найти емкость клетки. Для этого снимают отдельно осциллограммы дифференцированного по фронту импульса при расположении микроэлектродов в среде с клеткой и без нее. Емкость клетки легко найти вычитанием емкости микроэлектродов в среде без клетки из общей емкости (см. рис. 1). Условие дифференцирования импульса [18]:

$$t_{и} \gg \tau = R(C_0 + C_k), \quad (1)$$

где $t_{и}$ — длительность импульса.

Постоянная времени τ — характеристика экспоненциального процесса, определяющая время, через которое амплитуда уменьшится в e раз [16]. Длительность импульса такая же, как и при кондуктометрии, т. е. 50 мкс; емкость разряжается примерно за 2 мкс, так что условие (1) соблюдается. Дифференцирование тем точнее, чем точнее выполняется неравенство [16]:

$$(R_c^{-1} + R_k^{-1})^{-1} \gg R. \quad (2)$$

Сопротивление калиброванного резистора R выбирают 10 кОм, сопротивление клетки в режиме электропорации обычно около 3 МОм, а среды не менее 15 МОм, суммарное сопротивление клетки и среды, через которое происходит утечка заряда емкости, составляет около 2,5 МОм, что удовлетворяет условию (2).

Емкость клетки измеряют следующим образом. Вначале на экране осциллографа по оси времени растягивают начальную фазу импульса для увеличения точности измере-

ния. Затем измеряют амплитуду U_m напряжения импульса по переднему фронту. Далее отмечают линию ординаты по значению напряжения U_C , которое в 2,72 раза меньше U_m :

$$U_C = \frac{U_m - U_R}{e} + U_R \approx \frac{U_m - 1,72U_R}{2,72}. \quad (3)$$

По оси абсцисс определяем постоянную времени τ разряда емкости объекта. На рис. 2 показаны осциллограммы дифференцированного по фронту импульса напряжения с растяжкой разряда емкости во времени и курсорными линиями, которые дают разность напряжений с учетом падения в e раз и разность времени по горизонтальной развертке до точки их пересечения.

Для расчета емкости клетки измеряют постоянную времени τ_3 разряда емкости микроэлектродов в среде при отсутствии клетки, используя (3) и осциллограмму рис. 2, а. Емкость микроэлектродов находим по формулам

$$\tau_3 = RC_3; C_3 = \tau_3 / R.$$

Затем между микроэлектродами помещаем клетку и аналогично находим суммарную (общую) емкость C_0 микроэлектродов в среде и клетки, используя осциллограмму рис. 2, б. Емкость клетки $C_K = C_0 - C_3$. Также емкость клетки можно определить по разнице постоянных времени

$$\tau_K = \tau - \tau_3 = R(C_3 + C_K) - RC_3 = RC_K; C_K = (\tau - \tau_3) / R,$$

где τ_K , τ — постоянные времени соответственно разряда емкости клетки и суммарная.

На рис. 3 показаны зависимости суммарной емкости клетки (ооцита мыши) и микроэлектродов в среде, а также каждой из них в отдельности от напряженности ИЭП. Из рис. 3 следует, что емкость микроэлектродов в среде не зависит от напряженности поля, а емкость ооцита немного возрастает до 3,4 кВ/см, после чего происходит электропробой мембраны с истечением цитоплазмы в межэлектродное пространство, и в результате емкость быстро растет. Следует заметить, что в отличие от проводимости емкости клетки менее чувствительна к напряженности поля [17]. Это можно объяснить тем, что при электропорации в ИЭП толщина мембраны, оказывающая основное влияние на емкость клетки, не меняется вплоть до электропробоя, когда через временно открывающиеся электропоры, происходит приток ионов цитоплазмы в межэлектродное пространство, что приводит к росту проводимости и небольшому росту межэлектродной емкости.

Путем экстраполяции кривой 3 (см. рис. 3) к нулевой напряженности поля найдем емкость интактного (невозмущенного) ооцита мыши, равную 95 пФ. Представив клетку сферой радиусом $R = 30$ мкм, вычислим площадь поверхности мембраны $S = 4\pi R^2 = 113,1 \cdot 10^{-6}$ см². По полученным данным поверхностная емкость мембраны ооцита мыши составит 0,8 мкФ/см², что близко к известному значению около 1 мкФ/см² [1, 6, 7], и, следовательно, основной вклад в емкость клетки дает мембрана. Для сравнения, емкость зрелых ооцитов кролика около 1—2 нФ [15], однако их радиус почти втрое больше.

Заключение. Емкость клетки должна быть чувствительна к изменению диэлектрических свойств мембраны, кото-

рые могут меняться при взаимодействии с веществами различной химической природы. Таковы, например, некоторые криопротекторы, витальные мембранные красители, ингибиторы ионных насосов, модификаторы ионных каналов и прочие вещества, специфически связывающиеся с мембраной и, следовательно, изменяющие ее диэлектрическую проницаемость, а также вещества, проникающие в клетку через поры естественным путем или посредством электропорации мембраны в ИЭП [1, 3—6]. Поскольку емкость мембраны — главная составляющая емкости клетки, то последнюю можно рассматривать в качестве показателя эффективности указанных взаимодействий.

Таким образом, импульсный метод и кондуктометр [17] можно использовать для одновременного измерения проводимости и емкости клетки. Это повышает функциональные возможности и информативность метода, а также расширяет сферу его применения в биотехнологических процессах, где необходима диагностика состояния живых клетки и мембраны при их взаимодействии с различными физико-химическими средами.

Л и т е р а т у р а

1. **Рубин А. Б.** Биофизика: в 2 т. Биофизика мембранных процессов. М.: МГУ, 2004. Т. 2. Ч. 3. С. 17—45.
2. **Awayda M. S. e. a.** ENaC-membrane interactions: regulation of channel activity by membrane order // *J. Gen. Physiol.* 2004. V. 123. N. 6. P. 709—727.
3. **Мусаев Н. А., Юрин В. М., Соколик А. И.** Потенциал, сопротивление и электрическая емкость плазматической мембраны клеток *Nitellopsis obtusa* при действии диэтилстилбестрола // *Труды Белорус. гос. ун-та.* Минск: БГУ. 2009. Т. 4. Ч. 1. С. 74—78.
4. **Cohen R., Schmitt B. M., Atlas D.** Reconstitution of Depolarization and Ca²⁺-Evoked Secretion in *Xenopus* Oocytes Monitored by Membrane Capacitance // *Methods in Molecular Biology.* V. 440. Exocytosis and Endocytosis / Ed. A. I. Ivanov. Totowa (NJ, USA): Humana Press, 2008. P. 269—282.
5. **Bertrand C. A., Hopfer U.** Measurement of Membrane Capacitance in Epithelial Monolayers // *Epithelial cell culture protocols.* Totowa (NJ, USA): Humana Press, 2002. V. 188. P. 315—327.
6. **Kado R. T.** Membrane area and electrical capacitance // *Methods in enzymology.* 1993. V. 221. P. 273—299.
7. **Sakaba T., Hazama A., Maruyama Y.** Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols / Ed. Ya. Okada. Tokyo, London, N.Y.: Springer, 2012. P. 277—286.
8. **Rohlicek V., Rech F.** Improvement of the accuracy by the measurement of the electrical cell membrane parameters // *Physiol. Res.* 2002. V. 51. P. 169—177.
9. **Gillis K. D.** Techniques for Membrane Capacitance Measurements / *Single-Channel Recording.* N.Y.: Springer, 1995. P. 155—198.
10. **Harvard Apparatus** [Официальный сайт] http://www.harvardapparatus.com/hapdfs/HAI_DOCCAT_4/OC_725C.pdf (дата обращения 12.08.2013 г.)
11. **Gimsa J., Wachner D.** A unified resistor-capacitor model for impedance, dielectrophoresis, electrorotation, and induced transmembrane potential // *Biophys. J.* 1998. V. 75. P. 1107—1116.
12. **Ziebert F., Lacoste D.** A planar lipid bilayer in an electric field: membrane instability, flow field and electrical impedance / *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes.* 2011. V. 14. P. 63—97.

13. **Schmitt B. M., Koepsell H.** An Improved Method For Real-Time Monitoring of Membrane Capacitance in *Xenopus laevis* Oocytes // *Biophys. J.* 2002. V. 82. P. 1345—1357.

14. **Dharia S., Ayliffe H. E., Rabbitt R. D.** Single cell electric impedance topography: mapping membrane capacitance // *Lab. Chip.* 2009. V. 9. N. 23. P. 3370—3377.

15. **Mcculloh D. H., Levitan H.** Rabbit oocyte maturation: Changes of membrane resistance, capacitance, and the frequency of spontaneous transient depolarizations // *Develop. Biol.* 1987. V. 120. P. 162—169.

16. **Матханов П. Н.** Основы анализа электрических цепей. Линейные цепи: Учеб. пособие. М.: Высшая школа, 1990.

17. **Шигимага В. А.** Импульсный кондуктометр для биологических клеток и жидких сред // *Измерительная техника.* 2012. № 11. С. 45—49; **Shigimaga V. A.** Pulsed conductometer for biological cells and liquid media // *Measurement Techniques.* 2012. V. 55. N. 11. P. 1294—1300.

18. **Ицхоки Я. С., Овчинников Н. И.** Импульсные и цифровые устройства. М.: Сов. радио, 1972. С. 187—190.

Дата принятия 10.12.2013 г.

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ!

Начинается выплата гонорара за издание статей в англоязычной версии журнала «Измерительная техника» (“MEASUREMENT TECHNIQUES”), опубликованных в русском издании в 2012 г. Выплата осуществляется Российским авторским обществом (РАО). Формы необходимых документов для получения гонорара размещены на сайте РАО www.rao.ru

Адрес РАО: 123995 Москва, ГСП-5, ул. Б. Бронная, д. 6-а, стр. 1.

Телефон: +7(495) 697-33-35

Факс: +7(495) 609-93-63