

Дифференциальный импульсный кондуктометр для измерений проводимости биологических клеток

В. А. ШИГИМАГА

Национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенко,
Харьков, Украина, e-mail: vash105@gmail.com

Разработан дифференциальный импульсный кондуктометр для измерений собственной удельной проводимости биологических клеток в жидких средах в зависимости от напряжённости электрического поля. Представлены результаты этих измерений.

Ключевые слова: дифференциальный импульсный кондуктометр, напряжённость поля, собственная проводимость, биологическая клетка, жидкая среда.

Differential pulse conductometer designed for measurements of own conductivity of biological cells in liquid media, depending on electric field strength. The measurement results of biological cells own conductivity in several liquid media is presented.

Key words: differential pulse conductometer, field strength, own conductivity, biological cell, liquid medium.

Кондуктометры, в том числе и дифференциальные, широко представлены на современном рынке измерительной техники [1–5]. Несмотря на разнообразие областей применения, технических характеристик и конструкций все они имеют сходные принципы получения первичного сигнала датчика. Датчики кондуктометров формируют электрический сигнал о проводимости объекта или её разности во времени и (или) в пространстве. Основная техническая особенность всех известных серийных кондуктометров состоит в том, что их датчики питаются от стабильного и небольшого по амплитуде источника напряжения [1, 5]. Эта конструктивная особенность не позволяет измерять проводимость объектов, чувствительных к переменам напряжения, точнее, к изменяемой напряжённости импульсного электрического поля (ИНИЭП) между электродами кондуктометрического датчика. К таким объектам относятся биологические клетки, окружённые непроводящей мембраной с проводящей цитоплазмой внутри [6, 7].

Основная проблема при разработке кондуктометра для биологических клеток заключается в выборе конструкции датчика и принципа преобразования его сигнала, которые должны обеспечить получение первичного электрического сигнала, пропорционального только измеряемой величине. Дальнейшая обработка этого сигнала не представляет принципиальных сложностей, поскольку современные радиотехнические методы измерений и средства микроэлектроники развиты достаточно хорошо и постоянно совершенствуются [1, 5, 8].

При определении проводимости биологической клетки, находящейся в жидкой среде, датчик преобразует в общий электрический сигнал, согласно закону Кольрауша [9], суммарную информацию о проводимости клетки и среды [10, 11]. Если проводимость жидкой среды, содержащей клетку, незначительна, как, например, в растворах сахарозы, многоатомных спиртов или крипротекторов на деионизованной воде, то вкладом такого раствора в общую проводимость можно пренебречь. Напротив, в случае применения солевых растворов и жидких сред, содержащих ионы (например, фосфатно-солевого буфера (ФСБ) питательной среды с белково-гормональными добавками и др.), их проводимостью пренебречь уже нельзя. Про-

водимость таких жидких сред составляет значительную долю общей проводимости и даже превышает проводимость клетки. Поэтому для измерения её собственной проводимости необходимо проводимость жидкой среды вычесть из общей проводимости клеток.

Таким образом, процесс определения собственной проводимости клетки в ИНИЭП сводится к выделению сигнала, пропорционального только измеряемой величине. Наиболее удобным и проверенным на практике методом такого выделения является дифференциальный способ, который позволяет получать полезную информацию ещё на этапе преобразования измеряемой величины. Это достигается при использовании одинаковых датчиков в мостовой схеме [1, 4, 12].

Схема разработанного кондуктометра, принцип работы, результаты измерений собственной проводимости биологических клеток. Дифференциальный импульсный кондуктометр разработан для измерений собственной электропроводности биологических клеток в зависимости от ИНИЭП в различных жидких средах без учёта их проводимости. В качестве прототипа этого кондуктометра взят импульсный кондуктометр для биологических клеток и жидких сред, содержащий одну пару микроэлектродов [13]. В процессе разработки дифференциального кондуктометра указанный прототип был усовершенствован. При этом в измерительную схему дополнительно ввели вторую пару соосных микроэлектродов с прецизионным резистором, параллельную первой паре. Также в схему добавили дифференциальный усилитель, входы которого включены между резисторами дифференциальной пары. Тем самым было обеспечено измерение проводимости клетки с автоматическим исключением проводимости среды, в которой клетка находится.

На рис. 1 показана функциональная схема дифференциального импульсного кондуктометра. Данный кондуктометр содержит генератор прямоугольных импульсов ГПИ напряжения с пошагово изменяемой амплитудой, измерительную ячейку в виде двух пар одинаковых микроэлектродов 1, 2, два одинаковых калиброванных резистора R_k , дифференциальный усилитель ДУ на базе сдвоенного операционного усилителя (ОУ),

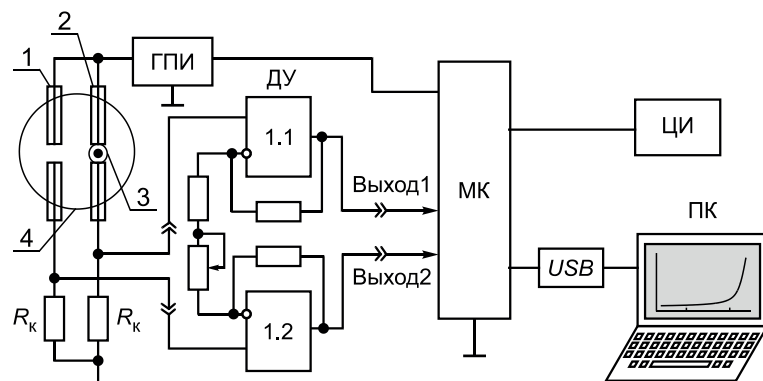


Рис. 1. Функциональная схема дифференциального импульсного кондуктометра для биологических клеток:

1, 2 – дифференциальная пара микроэлектродов; 3 – биологическая клетка; 4 – капля жидкой среды; ГПИ – генератор прямоугольного импульса; ДУ – дифференциальный усилитель; ПК – персональный компьютер; МК – микроконтроллер; ЦИ – цифровой индикатор

микроконтроллер МК, USB-интерфейс, цифровой индикатор ЦИ и персональный компьютер ПК. К резисторам R_k в точках их соединения с микроэлектродами 1, 2 параллельно подключены входы двух ОУ, образующих дифференциальный усилитель. Выходы этого дифференциального усилителя соединены с микроконтроллером. Также к микроконтроллеру подключён цифровой индикатор, который отображает значения проводимости и температуру жидкой среды. Для автоматической компенсации изменения проводимости в зависимости от температуры среды в измерительную схему введён термодатчик с усилителем, подключённым к микроконтроллеру (на схеме не показаны).

Дифференциальный импульсный кондуктометр работа-

ет следующим образом. В капле 4 жидкой среды соосно, торцами друг к другу расположены микроэлектроды 1, 2. Между микроэлектродами 2 одной из пар находится измеряемая биологическая клетка 3. Микроэлектроды пары 1 размещены свободно в среде 4 и на таком же расстоянии друг от друга, как и в первой паре. Импульсное напряжение с ГПИ подаётся на последовательно включённые микроэлектроды 1, 2 и резисторы R_k , подобранные как в рассмотренном прототипе [9]. Разность падения напряжения, возникающая при прохождении тока через пары электродов, попадает на дифференциальный усилитель, который усиливает только разницу сигналов с резисторов, значительно ослабляя при этом все синфазные помехи и шумы. При воздействии ИНИЭП на клетку 3 происходит постепенная электропорация её мембраны вплоть до электропробоя, что резко повышает проводимость между микроэлектродами 2 на фоне проводимости среды между микроэлектродами 1. В результате дифференциального усиления выполняется автоматическое вычитание сигнала, соответствующего проводимости жидкой среды, как бы она ни изменялась.

Микроконтроллер через USB-интерфейс выдаёт оцифрованные данные в персональный компьютер, где они обрабатываются прикладной программой [11]. Технические и метрологические характеристики дифференциального кондуктометра и его прототипа практически совпадают, за исключением основной погрешности измерений, которая уменьшена до 1 % из-за дифференциальной и цифровой обработки первичного сигнала.

На рис. 2 представлены результаты измерений собственной проводимости ооцита мыши, находившегося в водном растворе 0,3 М сахарозы, который содержал следы ФСБ. Наблюдается обратимая электропорация (колебания проводимости) и необратимый электропробой мембраны ооцита при $E=2,25$ кВ/см.

Таким образом, дифференциальный кондуктометр позволяет измерять собственную проводимость клетки, исключая вклад следов различных проводящих и неконтролируемых примесей в растворах, а также влияние исходной воды, чистоты посуды и реактивов, применяемых в исследованиях.

На рис. 3, а, б показаны результаты измерений проводимости двух ооцитов мыши в растворе ФСБ в зависимости от ИНИЭП. Из рис. 3, а следует, что суммарные с раствором проводимости клеток несколько ниже проводимости ФСБ. Этот факт можно объяснить экранирующим влиянием мембраны клетки, как хорошего диэлектрика. Из рис. 3, б следует, что собственные проводимости клеток без учёта ФСБ существенно отличаются по характеру и значениям от таких же в сахарозе. Вероятно, это происходит вследствие сопоставимых концентраций ионов снаружи и внутри клетки, а также движения их из ФСБ внутрь клетки и обратно через мембрану при её электропорации в ИНИЭП. Заметим, что колебания кривых собственной проводимости клеток аналогичны, что является следствием ускоренного выхода ионов K^+ и Na^+ из цитоплазмы, в частности, при $E=0,5$ кВ/см. Электропробой мембран обоих ооцитов при $E \geq 2,25$ кВ/см в ФСБ не наблюдается, как это обычно происходит в сахарозе (см. рис. 2). Полученные данные в настоящее время трудно интерпретировать однозначно, необходимы дополнительные исследования с помощью предложенного измерительного инструмента.

Преимущество дифференциального импульсного кондукто-

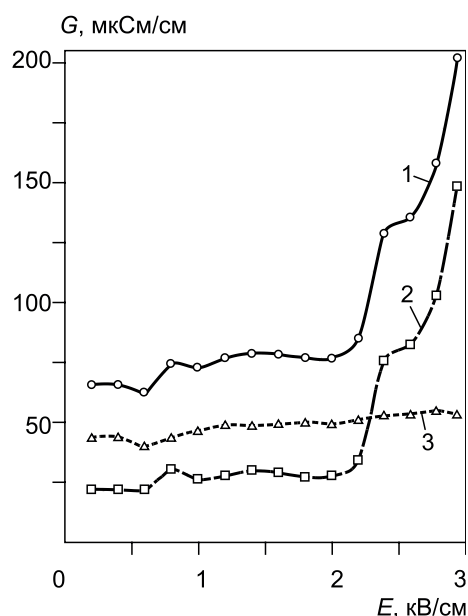


Рис. 2. Проводимость ооцита мыши в растворе 0,3М сахарозы и его собственная проводимость в зависимости от измеряемой напряжённости электрического поля:

1 – суммарная проводимость ооцита и 0,3М сахарозы; 2 – собственная проводимость ооцита; 3 – проводимость 0,3М сахарозы

метра перед прототипом состоит в том, что кондуктометр позволяет измерять собственную проводимость клетки в чистом виде даже на таком мощном солевом фоне, как ФСБ. Последнее обстоятельство становится особенно актуальным для измерений в жидких средах, содержащих электролиты, биохимические добавки (гормоны) и др., проводимость которых существенно влияет на результат измерений проводимости клетки и, следовательно, может её исказить.

Область применения предложенного дифференциального кондуктометра не исчерпывается только клеточной биотехнологией. С помощью данного устройства можно также измерять скорости диффузии ионов в ИНИЭП, например, в задачах физической химии при растворении различных солей в воде. Для этого достаточно поместить кристалл соли в каплю деионизованной воды между микроэлектродами одной из пар в дифференциальной ячейке и измерить время, по истечении которого разность проводимостей между парами в ячейке начнет значительно уменьшаться. Измерив расстояние между парами микроэлектродов в дифференциальной ячейке и приняв во внимание время пробега ионов, можно определить скорость их диффузии при растворении кристалла соли. Этим способом можно определять скорости диффузии ионов при растворении различных солей в условиях изменения физико-химических параметров раствора, таких как температура, вязкость, осмотическое давление и т.п.

Дифференциальный кондуктометр можно использовать для дистанционных измерений в составе автоматизированных биотехнологических комплексов в клеточной инженерии, например, для неразрушающей диагностики клеток в процессе культивирования или исследования особенностей их развития в питательных жидких средах. Информация об изменении проводимости клетки, находящейся в питательной среде в инкубаторе со специальным газовым составом, может передаваться дистанционно по радиоканалу прямо в компьютер. Компьютер с помощью прикладных программ обрабатывает данные в реальном времени, строит и анализирует графики, предлагает прогноз развития клеток в культуре.

Заключение. Разработанный дифференциальный импульсный кондуктометр позволяет измерять собственную проводимость биологических клеток в ИНИЭП, находящихся в жидких средах с произвольной проводимостью. Это расширяет сферу его применения в биотехнологических процессах, где необходима объективная диагностика состояния живых клеток по собственной проводимости при их взаимодействии с биохимическими компонентами различных жидких сред.

Л и т е р а т у р а

1. Латышенко К. П., Первухин Б. С. Метрология и измерительная техника. Микропроцессорные анализаторы жидкости. М.: Юрайт, 2017.

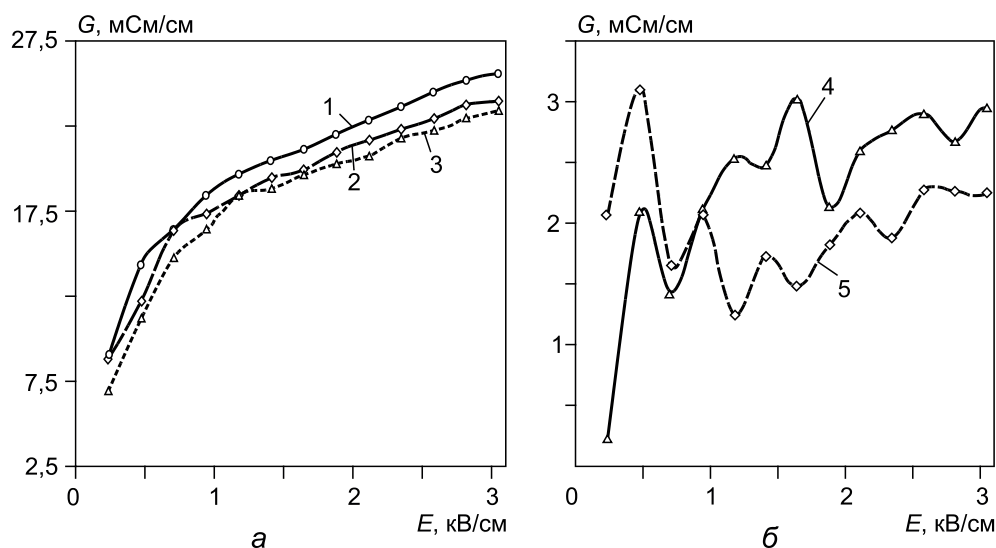


Рис. 3. Проводимость двух ооцитов мыши в растворе фосфатно-солевого буфера (а) и без учёта проводимости фосфатно-солевого буфера (б) в зависимости от измеряемой напряжённости электрического поля: 1 – проводимость раствора фосфатно-солевого буфера; 2, 3 – соответственно суммарная проводимость каждого из ооцитов и раствора фосфатно-солевого буфера; 4, 5 – первый и второй ооциты, соответственно

2. Приборы и средства автоматизации. Т. 5. Приборы для определения состава и свойств газов, жидкости, твердых и сыпучих веществ: каталог. М.: Научтехлитиздат, 2007.

3. Латышенко К. П. Кондуктометры на рынке промышленных приборов // Мир измерений. 2008. № 2. С. 9–17.

4. Смирнов Д. Н. Автоматическое регулирование процессов очистки природных и сточных вод. М.: Стройиздат, 1985.

5. Кагиров А. Г. Разработка и реализация импульсного способа контактной кондуктометрии с треугольной формой питающего напряжения: Автореф. дисс. на соиск. учён. степ. канд. техн. наук, Томск, 2013.

6. Рубин А. Б. Биофизика: в 2 т. Биофизика мембранных процессов. М.: МГУ, 2004. Т. 2. Ч. 3. С. 17–45.

7. Бигдай Е. В., Вихров С. П., Гривенная Н. В., Редькин В. М., Самойлов В. О., Чигирев Б. И. Биофизика для инженеров: Учебное пособие в 2 т. М.: ГЛТ, 2008.

8. Афонский А. А., Дьяконов В. П. Электронные измерения в нанотехнологиях и микроэлектронике. М.: ДМК Пресс, 2011.

9. Дамаскин Б. Б., Петрий О. А., Цирлина Г. А. Электрохимия. М.: Химия, 2006.

10. Шигимага В. А. Кондуктометрия клеток животных в средах с произвольной проводимостью // Вестник НТУ «ХПИ». 2010. № 57. С. 100–104.

11. Шигимага В. А. Биотехнический комплекс импульсной кондуктометрии и электроманипуляции с клетками животных: Автореф. дисс. на соиск. учён. степ. док. техн. наук. Харьков, 2014.

12. Мельник В. Г. Исследование чувствительности мостовой измерительной цепи с дифференциальным кондуктометрическим датчиком // Труды Института электродинамики НАН Украины. 2009. № 22. С. 115–118.

13. Шигимага В. А. Импульсный кондуктометр для биологических клеток и жидких сред // Измерительная техника. 2012. № 11. С. 45–49.

Дата принятия: 28.04.2017.