

12. Jansen H., Alvarez Sanchez P., Bart Pedersen S., Dehning B., Dobos D., Effinger E., Ferrari A., Griesmayer E., Gschwendtner E., Kozsar I., Missiaen D., Pernegger H., Sala P. R., Serrano J., Ward C. Verification of the CNGS Timing System using Fast Diamond Detectors // J. of Inst. 2013. V. 8. P. 01017.

13. Weiss C., Griesmayer E., Guerrero C. Response of CVD Diamond Detectors to 14 MeV Neutrons // CERN-ATS-Note-2012-093 TECH, 2012-11-16, 2012.

14. Pat. 20110233418 US. Horstall A. B., Silvie J. A. Radiation detector // Bae Systems. plc (London, GB. 2011).

15. Маталин Л. А., Чубаров С. И., Тимохин Л. А., Смирнов В. И., Нестеренко В. С. Электронные методы ядерной физики. М.: Атомиздат. 1973.

16. Козлов С. Ф. Алмазные детекторы ядерных излучений. Алмаз в электронной технике. М.: Энергоатомиздат. 1990.

17. Попов В. И. Методы ЛПЭ — спектрометрии ионизирующих излучений. М.: Атомиздат. 1978.

18. NIST: Stopping-power and range tables for electrons [Электрон. версия]: <http://physics.nist.gov/PhysRefData/Star/Text/ESTAR.html> (дата обращения 16.05.2016).

19. Carron N. J. An Introduction to the Passage of Energetic Particles through Matter. CRC Press, Taylor & Francis Group. 2007.

20. Geant4: A toolkit for the simulation of the passage of particles through matter [Офици. сайт] <http://geant4.web.cern.ch/geant4/> (дата обращения 15.03.2016).

Дата принятия: 15.06.2016.

МЕДИЦИНСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ

576.332:621.3.005.1

Методика измерений поляризуемости клеток в неоднородном переменном электрическом поле

К. В. ГЕНЕРАЛОВ¹, В. М. ГЕНЕРАЛОВ¹, М. В. КРУЧИНИНА²,
Г. В. ШУВАЛОВ³, Г. А. БУРЯК¹, А. С. САФАТОВ¹

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия, e-mail: vector.nsr.ru

² Научно-исследовательский институт терапии и профилактики СО РАМ, Новосибирск, Россия, e-mail: kruchmargo@yandex.ru

³ Сибирский научно-исследовательский институт метрологии, Новосибирск, Россия, e-mail: gvshuvalov@mail.ru

Приведены экспериментальная методика и результаты измерений поляризуемости эритроцитов крови человека и латексных частиц в неоднородном переменном электрическом поле. Показано, что экспериментальные и теоретические значения поляризуемости латексных частиц совпадают.

Ключевые слова: диэлектрофорез, поляризуемость, эритроцит, частица.

The experimental method is described and the measurement results of the value of polarizability of erythrocytes and latex particles in a non-uniform alternating electric field are presented. The results show that the values of experimentally measured and theoretically calculated polarizability of latex particles are in good agreement.

Key words: dielectrophoresis, polarizability, erythrocyte, particles.

Для изучения патогенеза многих заболеваний человека необходимо всестороннее исследование клеток крови [1]. В середине прошлого века была создана теория диэлектрофореза, описывающая поведение клеток в неоднородном переменном электрическом поле (НПЭП) [2, 3]. Накопленные за последние 50 лет экспериментальные данные свидетельствуют о новых уникальных возможностях исследования клеток с помощью НПЭП в широком диапазоне частот. Клетка крови, а также её молекулы, белки и многочисленные компоненты поляризуются во внешнем электрическом

поле. Поляризация характеризует процесс перераспределения электрических зарядов по всему объёму клетки, её физико-химическую и структурную уникальность. Описать поляризацию можно с помощью феноменологического коэффициента пропорциональности объёмной поляризуемости a (далее — поляризуемость) [4, 5]. Связь между свойствами клетки на макроскопическом уровне и её структурой, количеством, концентрацией атомов и молекул показана на амплитудно-частотной характеристике поляризуемости [6–8]. Прикладные методы диэлектрофореза долгое время не

разрабатывали из-за сложности автоматизации измерений. Однако стремительный прогресс в области цифровой микроскопии, развитие компьютерной техники и цифровой записи изображений позволили значительно снизить трудоёмкость исследований и способствовали внедрению диэлектрорефа в фундаментальную науку и практику [9].

Цель настоящей работы — создание методики измерений поляризуемости эритроцитов крови человека в НПЭП.

Материалы и методы. Коэффициент поляризуемости a можно определить из уравнения [10]:

$$a = 12\pi\eta_{\text{ср}} \mathbf{v}_{\text{кп}} r_{\text{кп}} / (\varepsilon_0 |\nabla E_{\text{ср}}^2|), \quad (1)$$

где η_{cp} — вязкость клеточной суспензии; $\mathbf{v}_{\text{кл}}$ — вектор скорости поступательного движения клетки в измерительной камере; $r_{\text{кл}}$ — радиус клетки; $\varepsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12}$ — диэлектрическая постоянная; $|\nabla E_{\text{cp}}^2|$ — модуль градиента квадрата напряжённости электрического поля среды, скалярная величина.

На основании выражения (1) была построена установка для измерений поляризуемости [11, 12]. Для нахождения коэффициента a необходимо определить параметр $|\nabla E_{\text{ср}}^2|$ в каждой точке траектории поступательного движения клет-

ки. Алгоритм для расчёта $\left| \nabla E_{cp}^2 \right|$ в измерительной камере следующий. Поверхности первого и второго электродов, а также пространство между ними виртуально покрывают двумя сетками, имеющими размер 8×8 и линейный шаг $25 \cdot 10^{-6}$ м (рис. 1). Шаг сеток выбирают с учётом диаметра исследуемых клеток, погрешности определения их местоположения в измерительной камере и временными затратами, связанными с нахождением электрических характеристик. Уменьшение размеров ячеек и увеличение их количества значительно усложняет вычисления характеристик поля. На поверхности каждого электрода размещают по 64 ячейки. Каждой ячейке первого электрода присваивают индекс от 1 до 64, а второго — от 65 до 128. Поверхность измерительной камеры покрывают собственной виртуальной сеткой из 128 ячеек с линейным шагом $1 \cdot 10^{-6}$ м. В каждую ячейку на поверхности электродов помещают элементарный заряд электрона $q_i = 1,6 \cdot 10^{-19}$ К. В каждой точке виртуальной сетки измерительной камеры методом суперпозиции определяют потенциал ϕ электрического поля

$$\varphi_{x,y} = \sum_{i=1}^{i=128} q_i / (4\pi\epsilon_{cp} \epsilon_0 r_{i,k}),$$

где $\varepsilon_{\text{ср}}$ — диэлектрическая проницаемость среды; $r_{i,k}$ — расстояние между центрами виртуальных ячеек, т. е. электродом и камерой.

Сумма потенциалов φ соответствует некоторому напряжению U между электродами 1, 2:

$$\left. \begin{aligned} c_{1,1}q_1 + c_{1,2}q_2 + \dots + c_{1,128}q_{128} &= U; \\ c_{2,1}q_1 + c_{2,2}q_2 + \dots + c_{2,128}q_{128} &= U; \\ &\vdots \\ c_{128,1}q_1 + c_{128,2}q_2 + \dots + c_{128,128}q_{128} &= U. \end{aligned} \right\} \quad (2)$$

где $c_{i,k} = (4\pi\epsilon_{\text{ср}}\epsilon_0 r_{i,k})^{-1}$ — коэффициент пропорциональности.

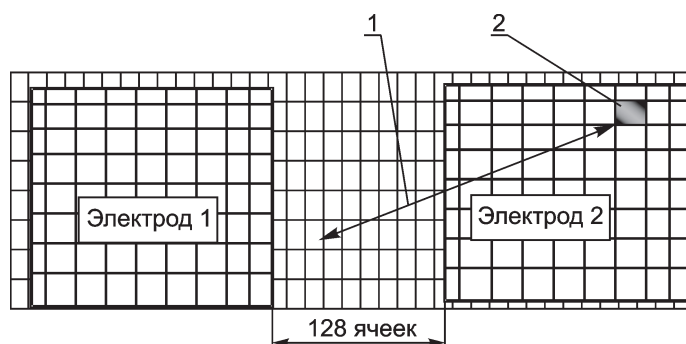


Рис. 1. Виртуальные сетки в измерительной камере и на поверхности электродов:

1 — расстояние $r_{i,k}$ между ячейками виртуальных сеток измерительной камеры и электрода; 2 — ячейка виртуальной сетки на поверхности электрода

При решении уравнения (2) значение q_i увеличивается до тех пор, пока разность потенциалов $\phi_1 - \phi_2$ между первым и вторым электродами не достигнет напряжения U , при котором планируется измерять поляризуемость.

Напряжённости в каждой точке электрического поля по координатам x, y вычисляют как $E_x = \frac{\partial \varphi}{\partial x}$; $E_y = \frac{\partial \varphi}{\partial y}$, следо-

вательно, $|E^2| = \sqrt{E_x^2 + E_y^2}$. Градиент квадрата напряжённости двухмерного электрического поля в каждой точке камеры находят по формуле

$$|\nabla E^2| = \left[\left(\frac{\partial E_x^2}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial E_y^2}{\partial y} \right)^2 \right]^{1/2}.$$

В случае изменения конструкции, размеров измерительной камеры, количества ячеек в каждой из виртуальных секторов потенциал φ , напряжённость E и градиент $|\nabla E_{\text{ср}}^2|$ электрического поля следует вычислять заново. Результаты расчёта характеристик НПЭП многократно используют в процессе определения поляризуемости каждой наблюдаемой клетки в любой точке траектории её поступательного движения.

Для клеток и латексных частиц сопоставляли экспериментально полученное значение поляризуемости с теоретически ожидаемым. Латексные частицы отличаются от клеток стабильностью своих характеристик и, как следствие, ожидаемым значением поляризуемости. Поэтому теоретически поляризуемость клетки или латексной частицы можно найти из выражения [9]:

$$a = 4\pi r_{\text{кп}}^3 \epsilon_{\text{ср}} (\epsilon_{\text{кп}} - \epsilon_{\text{ср}}) / (\epsilon_{\text{кп}} + 2\epsilon_{\text{ср}}).$$

Условия эксперимента. Измеряли поляризуемость эритроцитов человека, а также латексных частиц (*divinilbenzene*, производство Dow Chemical, США) диаметром $5,7 \cdot 10^{-6}$ м. Кровь объёмом 10 мкл забирали из пальца пациента в цитратный буфер и хранили в холодильнике не более 12 ч. Непосредственно перед экспериментом кровь разводили 30 раз в 0,3 молярном растворе сахарозы. Расчётное содер-

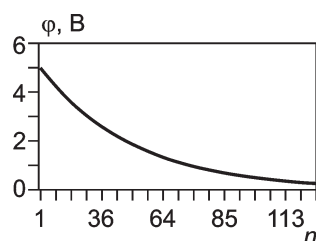


Рис. 2. Зависимость изменения потенциала между электродами

жание соли в клеточной суспензии составляло 5 ммоль NaCl. Раствор сахарозы готовили на деионизированной воде. Измерения проводили при комнатной температуре. Сразу после разведения полученную клеточную суспензию объемом 10 мкл вносили в измерительную камеру и накрывали покровным стеклом. Оптическую систему микроскопа фокусировали на клетки в пространстве измерительной камеры. На электроды измерительной ячейки подавали напряжение $U = 8$ В последовательно на четырех фиксированных частотах $f = 10^6$; $5 \cdot 10^5$; 10^5 ; $5 \cdot 10^4$ Гц. На каждой частоте осуществляли видеозапись динамики поведения эритроцитов в НПЭП, с помощью которой определяли скорость поступательного движе-

ния и радиус каждой наблюдаемой клетки. Измерения поляризуемости латексных частиц выполняли с целью определения погрешности и воспроизводимости полученных результатов. Латексные частицы, также как и клетки, перевели в 0,3 молярный раствор сахарозы, в который дополнительно вносили 5 ммоль соли NaCl. При этом полагали, что разведение не оказывает влияния на структуру латексных частиц и их поляризуемость. Пациенты принимали участие в исследованиях с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности.

Результаты и обсуждение. На рис. 2 показана расчётная зависимость изменения потенциала между электродами в измерительной камере. Расстояние между электродами разбито на 128 виртуальных ячеек. В табл. 1, 2 представлены расчётные и экспериментальные значения поляризуемости эритроцитов и латексных частиц в сопоставимых объёмах. Из общего числа экспериментально наблюдаемых латексных частиц выбирали лишь те, радиус которых не отличался более чем на $\pm 0,5$ мкм для получения близких величин их объёмов и, таким образом, корректного сравнения поляризуемости между ними. Приведённая величина $\epsilon_{\text{лат}}^*$ — справочная [13]. Относительная погрешность измерений

Таблица 1

Результаты сравнения теоретической и экспериментальной поляризуемости латексных частиц

$\varnothing_{\text{лат}} = 5,7 \cdot 10^{-6}$, м	$r_{\text{кл}} \cdot 10^{-6}$, м	$a_{\text{т}} \cdot 10^{-14}$, м ³	$a_{\text{эк}} \cdot 10^{-14}$, м ³	$ \nabla E_{\text{ср}}^2 \cdot 10^{13}$, В ² /м ³	$v_{\text{кл}} \cdot 10^{-5}$, м/с	$\eta_{\text{ср}} \cdot 10^{-3}$, Па · с	$ (a_{\text{эк}} - a_{\text{т}})/a_{\text{эк}} $, %	$\epsilon_{\text{лат}}$	$\epsilon_{\text{ср}}$
Проба 1	2,8	-1,10	-1,1	2,5	2,0	1,1	10	2,4	79
Проба 2	2,8	-0,96	-1,1	2,5	2,0	1,1	4	2,4	79
Проба 3	2,8	-1,00	-1,1	2,5	2,0	1,1	0	2,4	79
Проба 4	2,8	-1,00	-1,1	2,5	2,0	1,1	0	2,4	79
Проба 5	2,7	-1,00	-0,97	2,5	2,0	1,1	3	2,4	79
Проба 6	2,6	-0,99	-1	2,5	2,0	1,1	1	2,4	79
Проба 7	2,7	-0,89	-1	2,5	2,0	1,1	11	2,4	79
Проба 8	2,7	-0,79	-0,90	2,5	1,8	1,1	13	2,4	79
Проба 9	2,8	-0,89	-1,1	2,5	2,0	1,1	11	2,4	79
Среднее	2,7	-0,96	-0,98	2,5	2,0	1,1	3	2,4	79

Таблица 2

Результаты измерений характеристик эритроцитов в серии последовательных опытов на одной пробе крови

$n_{\text{об}}$	$r_{\text{кл}} \cdot 10^{-6}$, м	Количество эритроцитов для вычисления среднего радиуса, шт	$v_{\text{кл}} \cdot 10^{-5}$, м/с	$ \nabla E_{\text{ср}}^2 \cdot 10^{13}$, В ² /м ³	$\eta_{\text{ср}} \cdot 10^{-3}$, Па · с	$\epsilon_0 \cdot 10^{-12}$, Ф/м	$a \cdot 10^{-14}$, м ³
1	3,8	76	1,9	2,5	1,1	8,85	1,4
2	3,4	83	1,8	2,5	1,1	8,85	1,1
3	3,5	89	1,9	2,5	1,1	8,85	1,2
4	3,6	62	1,8	2,5	1,1	8,85	1,2
5	3,7	50	1,2	2,5	1,1	8,85	0,8
6	3,3	31	1,8	2,5	1,1	8,85	1,1
7	3,6	87	1,9	2,5	1,1	8,85	1,3
8	3,6	42	1,9	2,5	1,1	8,85	1,3
9	3,6	57	1,8	2,5	1,1	8,85	1,2
10	3,5	69	1,7	2,5	1,1	8,85	1,1
Среднее	3,6	65	1,8	2,5	1,1	8,85	1,2

поляризуемости в обоих случаях составила не более $\delta(a_{\text{кл}}) \leq 17,4$ %. Абсолютная погрешность измерений $\Delta r_{\text{кл}} = \pm 0,5$ мкм. Абсолютная погрешность измерений скорости частицы $\Delta v_{\text{кл}} = \pm 0,5$ мкм/с. Относительная погрешность измерений вязкости ± 1 %. Частота зондирования — 10^6 Гц. Было использовано $n = 10$ образцов. Стандартная ошибка при измерениях характеристик

эритроцитов $m_x = \pm \sigma / \sqrt{n}$ составила для среднего радиуса $r_{\text{кл}}$ эритроцитов и их средней скорости $v_{\text{кл}}$ соответственно $\pm 4,5 \cdot 10^{-8}$ и $\pm 6,7 \cdot 10^{-7}$. Для средней объёмной поляризуемос-

ти эритроцитов а стандартная ошибка $m_a = \pm 4,9 \cdot 10^{-16}$. При сравнении теоретической и экспериментальной величины поляризуемости латексных частиц стандартная ошибка составила $\pm 2,4 \cdot 10^{-8}$; $\pm 3,4 \cdot 10^{-16}$; $\pm 1,0 \cdot 10^{-16}$; $\pm 2,2 \cdot 10^{-7}$ для $r_{\text{кл}}$, $a_{\text{т}}$, $a_{\text{эк}}$, $v_{\text{кл}}$, соответственно.

Анализ приведённых данных показал, что ожидаемые теоретические и экспериментальные значения поляризуемости частиц и клеток согласуются.

Таким образом, поляризуемость высокочувствительна к изменению объёма клетки, её диэлектрической проницаемости, а также окружающей среде. Заложенные в основу методики измерения поляризуемости клеток в НПЭП, принципы и технические приёмы универсальны для анализа частиц любой природы. Существует множество научных

методик и производственных технологий, которые используют частицы (клетки) микрометрового размера. Рассмотрим основные области, где применяется представленная методика. В области медицины методику используют для ранней диагностики заболеваний сердца и печени, таких как ишемия сердца, фиброз и цирроз. Существуют реальные перспективы расширения перечня заболеваний, диагностируемых с помощью методики. Среди них: инсульты, тромбозы, анемии. В области вирусологии методику применяют для индикации вирусов, исследования механизмов взаимодействия вирусов с клетками. В микробиологии — для оценки влияния антибиотиков и других химических ингредиентов на бактерии. В биотехнологиях — для разработки методов фильтрации, концентрирования, сепарации клеток по коэффициенту поляризуемости; измерения электрических и вязкоупругих характеристик клеток. Проводят исследования причин и механизмов клеточного разрушения, состояния клеточных культур в процессе культивирования. В лакокрасочном производстве методику применяют для технологического контроля свойств и качества мелкодисперсных частиц в процессе производства.

Заключение. Разработанная методика позволяет выполнять измерения поляризуемости клеток в НПЭП с относительной погрешностью не более $\delta(a_{\text{кл}}) \leq 17,4\%$. Методика служит основой для развития нового направления в области метрологии — измерения физической величины объёмной поляризуемости частиц микрометрового размера.

Л и т е р а т у р а

1. Кручинина М. В., Курилович С. А., Громов А. А., Рабко А. В., Генералов В. М., Бакиров Т. С., Шакиров М. М. Патология печени и сердца алкогольного генеза: общность и различия в параметрах эритроцитов // Что такое сибирское здоровье? Сб. матер. II съезда терапевтов Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск, 2010. С. 60—61.

2. Jones T. B. Basic theory of dielectrophoresis and electro-rotation // IEEE Eng. Med. Biol. Magazine. 2003. V. 22. N. 6. P. 33—42.

3. Пастушенко В. Ф., Кузьмин П. И., Чизмаджев Ю. А. Диэлектрофорез и электровращение клеток: единая теория для сферически симметричных клеток с произвольной структурой мембраны // Биологические мембраны. 1988. Т. 5. № 1. С. 65—78.

4. Потапов А. А. Диэлектрический метод исследования вещества. Иркутск: Изд-во Иркутского ун-та, 1990.

5. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теоретическая физика. Т. 8. Электродинамика сплошных сред. М.: Наука, 1982.

6. Фейнман Р., Лейтон Р., Сэндс М. Фейнмановские лекции по физике. Электричество и магнетизм. Т. 5. М.: Мир, 1977.

7. Markx G. H., Davey C. L. The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies. Application in biotechnology // Enzyme Microb. Technol. 1999. V. 25. N. 3—5. P. 161—171.

8. Марченко С. М., Крышталь О. А., Слепушкин В. А., Букринская А. Г. Индуцированные вирусами изменения проводимости клеточной мембраны // Биологические мембраны. 1987. Т. 4. № 7. С. 747—755.

9. Hughes M. P. Nanoelectromechanics in Engineering and biology. Boca Raton, London, N. Y., Washington, D. C.: CRC PRESS Boca Raton, 2003.

10. Генералов В. М., Кручинина М. В., Дурыманов А. Г., Медведев А. А., Сафатов А. С., Сергеев А. Н., Буряк Г. А., Курилович С. А., Громов А. А. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. Новосибирск: ЦЭРИС, 2011.

11. Генералов В. М., Бакиров Т. С., Пак А. В., Звольский И. Л., Зайцев Б. Н., Дурыманов А. Г., Кручинина М. В., Курилович С. А., Сергеев А. Н. Автоматизированная установка измерения вязкоупругих характеристик эритроцитов // Научно-технические проблемы. 2008. Т. 9. № 12. С. 28—33.

12. Закс Л. Статистическое оценивание / Под ред. Ю. П. Адлера, В. Г. Горского. М.: Статистика. 1976.

13. Физические величины. Справочник / Под ред. И. С. Григорьевой, Е. З. Мейлихова. М.: Энергоатомиздат, 1991.

Дата принятия: 13.01.2016.