

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА ІМЕНІ ПЕТРА ВАСИЛЕНКА

Шигимага Віктор Олександрович

УДК 621.3: 543.555: 57.086.8

**БІОТЕХНІЧНИЙ КОМПЛЕКС ІМПУЛЬСНОЇ КОНДУКТОМЕТРІЇ
І ЕЛЕКТРОМАНІПУЛЯЦІЇ З КЛІТИНАМИ ТВАРИН**

05.11.17 – біологічні та медичні прилади і системи

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора технічних наук

Харків - 2014

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі біотехнології репродукції сільськогосподарських тварин Інституту тваринництва Національної академії аграрних наук України та на кафедрі кібернетики Харківського національного технічного університету сільськогосподарства ім. Петра Василенка

Науковий консультант:

доктор технічних наук, професор **Мегель Юрій Євгенович**, Харківський національний технічний університет сільськогосподарства імені Петра Василенка, завідувач кафедри кібернетики

Офіційні опоненти:

доктор технічних наук, професор **Павлов Сергій Володимирович**, Вінницький національний технічний університет, проректор з наукової роботи, завідувач кафедри загальної фізики та фотоніки;

доктор технічних наук, професор **Піротті Євген Леонідович**, Національний технічний університет "Харківський політехнічний інститут", професор кафедри комп'ютерної математики та математичного моделювання;

доктор технічних наук, доцент **Аврунін Олег Григорович**, Харківський національний університет радіоелектроніки, професор кафедри біомедичної інженерії.

Захист відбудеться „27” __червня__ 2014 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.832.01 у Харківському національному технічному університеті сільськогосподарства імені Петра Василенка за адресою: 61002, Україна, м. Харків, вул. Артема, 44.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Харківського національного технічного університету сільськогосподарства імені Петра Василенка.

Автореферат розісланий „23” __травня__ 2014 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



д.т.н., проф. О.Д. Черенков

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В останній час прискорюється і набуває практичного значення впровадження у біомедицину, відтворення сільськогосподарських та інших тварин таких сучасних біотехнологічних методів, як екстракорпоральне запліднення *in vitro*, отримання монозиготних близнюків, клонування, реконструкція ембріонів, химеризація і т. ін., які за рахунок використання новітніх технічних засобів реалізують різні електромагнітні технології, що застосовують електроманіпуляції з живими клітинами тварин. Тому розвиток цих біотехнологічних напрямів і пошук шляхів підвищення їх ефективності є актуальними задачами сьогодення.

Основним з відомих методів електроманіпуляції є електропорація, що адекватно діє на транспортну функцію мембрани шляхом тимчасового підвищення її проникності за рахунок утворення електропір в імпульсному електричному полі (ІЕП), яке формується спеціальною апаратурою в середовищі з клітинами між мікроелектродами. Застосування методу електропорації вимагає обґрунтування вибору певних електричних режимів обробки в ІЕП живих клітин. Для цього потрібно знати критичні і безпечні параметри ІЕП, сформованою апаратурою так, щоб клітини залишилися живими і повністю функціональними для подальшого використання, зокрема, у відтворенні тварин. Значення цих параметрів визначаються багатьма факторами, в першу чергу, електричними характеристиками мембрани, клітини і рідкого середовища, його фізико-хімічними умовами, а, крім того, видовою специфічністю клітин, розміром і т.п. Тому для практичного застосування електропорації в клітинних біотехнологіях завжди актуальним є знання конкретних значень електричних характеристик клітин в різних умовах рідких середовищ.

Значний внесок у розробку теорії електропорації, моделювання на штучних мембранах, ліпосомах, суспензіях клітин та її практичне застосування зробили зарубіжні вчені: Kinoshita K., Neumann E., Чизмаджев Ю.А., Weaver J.C., Zimmermann U., Chang D.C., Krassowska W., Teissie J., Miklavčič D., Smith K.C., Davalos R.V., Pakhomov A.G. і ін. та вітчизняні: Колеснікова А.О., Смольянінова Є.І., Гордієнко Є.О., Подольцев О.Д. та ін., а в обґрунтування технічних характеристик і конструювання спеціальної апаратури для електропорації: Hofmann G.A., Evans G.A., Рус M., Reberšek M., Яковенко С.А., Хохлов А.М., Нікітін В.А., Лісін В.І. та ін.

Не дивлячись на ці численні, але розрізнені дослідження, в сучасній науково-технічній літературі відсутня загальна концепція систематизації застосувань методу електропорації, що базується на єдиній методичній платформі. Однак, узагальнення наявних даних може бути виконане в рамках одного універсального методу з відповідним технічним оформленням при використанні фактору безперервної зміни ІЕП. Проте, в сучасному арсеналі апаратури і методів електропорації такі засоби визначення електричних характеристик живих клітин відсутні.

Аналітичний огляд робіт з математичного моделювання електропорації і провідності мембрани також показав відсутність теоретичних моделей клітин тварин, зокрема, репродуктивних і ембріональних, особливо за умови дії на них ІЕП змінної напруженості. Враховуючи те, що ці клітини є головними біооб'єктами репродукти-

вної біотехнології, проблеми побудови теоретичних моделей, розробки на їх основі методів та апаратури для визначення і прогнозування електричних характеристик живих клітин на різних стадіях їх розвитку (ооцити, ембріони) є актуальними. Крім того, інструментальна, прижиттєва оцінка стану цих клітин технічними засобами практично невідома, а традиційна морфологічна не здатна виявити деякі функціональні відхилення і приховані дефекти на ранніх стадіях розвитку, що, зокрема, веде до 30 % втрат в біотехнології репродукції тварин.

В зв'язку з зазначеним розробка теорії, методичної бази для науково-технічного обґрунтування параметрів й режимів дії ІЕП змінної напруженості на репродуктивні клітини та ембріони і апаратних засобів для визначення їх електричних характеристик дозволить вирішити ці актуальні проблеми для підвищення ефективності всього біотехнологічного процесу репродукції тварин в цілому.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження за темою дисертації проводились протягом 1996-2013 рр. відповідно до програм загального тематичного плану НДР та ДКР відділу біотехнології репродукції сільськогосподарських тварин Інституту тваринництва НААН, де виконувались науково-технічні роботи за темами:

1. "Розробити методи електрофізичного впливу на гамети та зародки сільськогосподарських тварин для використання в сучасних біотехнологіях" (держ. реєстр. № 0196U011390, 1996-2000 рр.).

2. "Розробити та удосконалити методи мікрomanipуляцій з ембріональним матеріалом та методи електрофізичного впливу на клітини ссавців для використання в сучасних ембріональних біотехнологіях" (держ. реєстр. № 0101U003378, 2001-2005 рр.).

3. "Розробити та удосконалити ембріоінженерні методи отримання реконструйованих ембріонів і молекулярно-генетичні підходи для застосування у відтворенні та селекції сільськогосподарських тварин" (держ. реєстр. № 0106U007396, 2006 р.).

4. "Обґрунтувати та розробити альтернативну концепцію реконструювання ембріонів і напрямки молекулярно-генетичних досліджень для застосування у відтворенні сільськогосподарських тварин" (держ. реєстр. № 0107U011259, 2007-2010 рр.).

5. "Розробити і оптимізувати системи клонування, химеризації, гібридизації та біофізичної оцінки якості ооцитів, ембріонів і репродуктивної функції самиць" (держ. реєстр. № 0111U003445, 2011-2015 рр.).

Мета і завдання дослідження: метою дисертаційної роботи є розробка теоретичних основ і комплексу методів з технічними засобами дії ІЕП змінної напруженості на клітини тварин.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні задачі:

1. Виконати аналітичний огляд проблем, методів, технічних засобів електроманіпуляції й кондуктометрії, явища електропорації мембрани клітини, моделювання її електричних параметрів та дії на клітини ІЕП у біотехнологічних процесах.

2. Теоретично обґрунтувати процес імпульсної кондуктометрії в ІЕП змінної напруженості з використанням концептуальних моделей провідності мембрани, цитоплазми і клітини в цілому на основі електрофізичних моделей одно- та багатоклі-

тинних біооб'єктів.

3. Побудувати фізико-математичні моделі процесу електропорації мембрани, як головного елементу провідної електрофізичної системи клітини за умов дії на неї ІЕП змінної напруженості.

4. Обґрунтувати критерії і параметри впливу ІЕП на клітини та побудувати моделі для математичного аналізу електричних параметрів електропорації мембрани в процесі імпульсної кондуктометрії.

5. Розробити, теоретично обґрунтувати і визначити апаратний параметр мікроелектродної кондуктометричної комірки зі змінною геометрією і необхідні для цього параметри візуалізації її провідного об'єму методом діелектрофорезу.

6. Розробити теоретичні основи методу, принципи побудови і електричні схеми технічних засобів імпульсної кондуктометрії клітин тварин.

7. Експериментально дослідити вплив ІЕП змінної напруженості на клітини різних видів тварин, встановити закономірності зміни їх провідності в рідких середовищах з різними фізико-хімічними параметрами та показати можливості застосування розробленої апаратури в біотехнологічних процесах електроманіпуляції з клітинами тварин.

Об'єкт дослідження: процес взаємодії ІЕП змінної напруженості з клітинами тварин.

Предмет дослідження: теоретичні основи, методи і технічні засоби імпульсної кондуктометрії в ІЕП змінної напруженості у клітинних біотехнологіях.

Методи дослідження. В роботі використані: методи загальної фізики, теоретичні основи електротехніки, теорія електролітів, математичне моделювання параметрів електропорації мембран клітин, моделювання біологічних клітин елементами електричних ланцюгів, статистична обробка даних кондуктометричних експериментів, відцифрування зображень клітин, методи проектування апаратури і метрологічної атестації засобів нестандартної вимірювальної техніки.

Наукова новизна отриманих результатів полягає у наступному:

- вперше теоретично обґрунтовано комплекс імпульсної кондуктометрії клітин тварин під дією ІЕП змінної напруженості, що дозволяє на єдиній апаратно-методичній базі реалізувати електропорацію, електрозлиття, електростимуляцію і необоротний електропробій, які застосовуються у процесах репродуктивної біотехнології тварин та біомедицини;

- вперше розроблено принцип отримання апаратного параметра безкорпусної кондуктометричної комірки зі змінною геометрією мікроелектродів, що дозволяє забезпечити визначення питомої провідності біооб'єкту між парою співвісних мікроелектродів з різним співвідношенням діаметру та відстані між ними;

- вперше на основі побудованих електричних моделей провідності ооцитів та 2-16 клітинних ембріонів, представлених еквівалентними схемами на елементах RC -ланцюгів, та фізико-математичної моделі електропорації мембрани на основі вірогідності виникнення електропір, проведено оцінку динаміки дії зростаючого ІЕП на мембрану і клітину в цілому, що дозволяє прогнозувати поведінку клітин в різних середовищах за провідністю та визначити головну причину її підвищення за рахунок

лавиноподібного зростання середнього радіусу електропір при електропробі;

- вперше побудовано геометричну модель зміни поверхні і об'єму клітини в середовищах з різною осмотичною концентрацією на основі обліку внеску мікровілі мембрани, що дозволяє теоретично пояснити концентраційні залежності напруженості електропробою мембран ооцитів та 2-клітинних ембріонів на основі різної швидкості зміни поверхнево-об'ємного відношення;

- вперше експериментально досліджено дію ІЕП зростаючої напруженості на живі клітини тварин, одержані характеристики їх провідності від оборотного до необоротного електропробіів мембран в різних фізико-хімічних умовах непровідних середовищ, що дозволяє використати отримані дані для визначення електричних режимів електроманіпуляції з клітинами різних видів тварин;

- одержав подальший розвиток процес діелектрофорезу еритроцитів, використаний для візуалізації силових ліній градієнтного електричного ВЧ поля, що дозволяє забезпечити безпосередню оцінку форми провідного об'єму між мікроелектродами різної геометрії для визначення функції їх апаратного параметру;

- одержало подальший розвиток обґрунтування параметрів синтезу автоматизованих технічних засобів на сучасній елементній базі для розробки та удосконалення систем електроманіпуляції з клітинами, що дозволяє виконувати необхідні біотехнологічні процедури, пов'язані із застосуванням ІЕП і передбачені протоколами клонування, отримання трансгенних, химерних ембріонів тощо.

Практичне значення отриманих результатів. На основі теоретичних і експериментальних досліджень впливу змінного ІЕП на клітини тварин розроблений біотехнічний комплекс з універсальними можливостями, що базуються на визначенні параметрів питомої провідності клітин при відповідній напруженості поля. За допомогою цих параметрів обґрунтовуються електричні режими, необхідні і достатні для реалізації різних методів електроманіпуляції з клітинами, - електрозлиття, електропорації, електротрансфекції, стимуляції розвитку і т.п., чим досягається їх методична та апаратна єдність. Комплекс додатково дає можливість проводити дослідження впливу ІЕП на рівні інфраструктури живої клітини, здійснити автоматизовану регуляцію транспортної функції мембрани, підвищити достовірність прижиттєвої діагностики стану і прихованих змін в клітині, які істотно впливають на подальший розвиток в ембріональному онтогенезі.

Розроблена методика метрологічної атестації нового нестандартного технічного засобу вимірювання питомої провідності клітин і рідких середовищ, що може стати основою метрологічного забезпечення різних методів електроманіпуляції.

Результати дисертації впроваджені і використані в НДР Інституту тваринництва НААН України, що підтверджено актами впровадження. Це дозволило одержати для потреб сільськогосподарської репродуктивної біотехнології стимульовані ооцити і реконструйовані ембріони великої рогатої худоби, химерні ембріони мишей, які можуть бути застосовані також в загальній біології і як модельні біооб'єкти в експериментальній репродуктивній медицині.

Теоретичні основи методу та апаратури імпульсної кондуктометрії використовуються в учбовому процесі кафедри молекулярної і медичної біофізики радіофізи-

чного факультету Харківського національного університету ім. Каразіна в курсі лекцій "Електроніка в біології і медицині" (акти впровадження).

Результати дисертаційної роботи впроваджені і використані в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, що підтверджено актами впровадження. Одержані результати відкривають можливість оцінювати та прогнозувати ефективність кріоконсервації клітин в кріобіології і репродуктивній медицині для збереження генетичних ресурсів, а також вести цілеспрямований пошук нових ефективніших кріозахисних середовищ для клітин.

Розроблені методи математичного моделювання електричних параметрів клітини використовуються в учбовому процесі кафедри кібернетики Харківського національного технічного університету сільського господарства ім. П.Василенко в курсі лекцій "Математичне моделювання" та "Прикладна математика" (акт впровадження).

Особистий внесок автора. Особистий внесок полягає у формулюванні ідеї, обґрунтуванні мети, задач дисертаційної роботи і способів їх вирішення шляхом розробки методу і апаратури імпульсної кондуктометрії для дослідження провідності біологічних клітин і рідких середовищ в ІЕП змінної напруженості, використання результатів в методах: електропорації, стимуляції і електролізу клітин. Результати дисертації, одержані здобувачем особисто, опубліковані в одноосібних роботах. У наукових роботах за фахом, написаних в співавторстві з колегами, особистий внесок автора полягає в наступному: в роботі [4] дана технічна ідея та розроблена електрична схема підключення датчиків, в тому числі і мікроелектродів, безпосередньо до ПЕОМ; у працях [10,11] виконано вимірювання провідності у різних середовищах; у працях [12,18] виконані розрахунки ключового режиму транзисторів імпульсного генератора та запропонована схема вимірювань; у роботі [14] дана ідея та схема математичного підходу до моделювання мембрани біологічної клітини; у працях [16,17] виміряна провідність та оброблено результати за розробленим алгоритмом; в роботі [22] дана теоретична схема фізико-математичного підходу за вірогідністю електропорації до моделювання провідності мембрани клітини в ІЕП; в роботі [23] розроблено лінійну електричну модель провідності клітини; в роботі [25] дана технічна ідея кондуктометра, розроблений імпульсний генератор та електрична схема вимірювання провідності; в роботі [26] розроблена конструкція, методики спорядження заготівки та автоматичного заточення торців мікроелектродів.

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи доповідались на 17-ти міжнародних науково-технічних конференціях: "Використання сучасних молекулярно-генетичних і біотехнологічних розробок у генетико-селекційних дослідженнях" (II міжнар. конф., Київ, 1998); "Нові методи досліджень у тваринництві" (ІТ УААН, Харків, 2001); "Проблеми енергозабезпечення та енергозбереження в АПК України" (НТУСГ, Харків, 2001,2003,2005,2013); "Тваринництво ХХІ сторіччя: новітні технології, досягнення і перспективи" (ІТ УААН, Харків, 2006); "Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных" (ВГНИИЖ РАСХН, Дубровицы, 2006); "Биофизика живой клетки. Крיוконсервация как способ сохранения биологического разнообразия" (ИБК РАН, Пущино, 2008); "Новые криотехнологии для решения фундаментальных и прикладных задач меди-

цины" (ИПКиК, Харьков, 2008,2012); "Актуальные вопросы биологической физики и химии, БФФХ–2011" (VII НТК, СевНТУ, Севастополь, 2011); "Наукова періодика слов'янських країн в умовах глобалізації" (Київ, 2012); "European Biophysics Congress" (8-th EBSA, Budapest, Hungary, 2011); "Metrology and metrology assurance 2012" (22th National scientific symposium, Sozopol, Bulgaria, 2012); "Проблемы фундаментальных и прикладных естественных и технических наук в современном информационном обществе" (55-я Всеросс. научн. конф. МФТИ-55, Москва, 2012); "Metrology and metrology assurance 2013" (23th National scientific symposium, Sozopol, Bulgaria, 2013).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 49 наукових праць, з них 26 у фахових періодичних виданнях, з яких 9 цитовані у міжнародних наукометричних базах; 8 тез доповідей на наукових конференціях, отримано 9 патентів України.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, 7 розділів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Повний обсяг дисертації з додатками 350 сторінок, у тексті 90 ілюстрацій та 13 таблиць, додатки на 21 сторінці, 494 найменування використаних літературних джерел на 44 сторінках.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

У вступі обґрунтовується актуальність теми дисертаційної роботи, встановлюється наукова проблема, стан і необхідність її вирішення існуючими та новими технічними засобами. Показується зв'язок роботи з темами, програмами та планами НДР, формулюється мета та задачі наукового дослідження. Визначається наукова новизна, практичне значення одержаних результатів дослідження за темою та особистий внесок здобувача в роботах, що вийшли з друку. Надається інформація про апробацію проведених досліджень.

У першому розділі представлено науково-історичний аспект світового розвитку методів електроманіпуляції, виконано аналітичний огляд літературних джерел за основними напрямками, що стосуються теми дисертації. З аналітичного огляду впливає: у побудованих біофізичних моделях електропорації не розглядається ефект зміни провідності реальної клітини, як цілісного біооб'єкту, залежно від зміни напруженості ІЕП; у науковій і патентній літературі із застосування явища електропорації у біомедичній техніці і методах та фундаментальних академічних дослідженнях не знайшли віддзеркалення ефекти зміни провідності клітини залежно від напруженості ІЕП; серед відомих технічних засобів і методів традиційної кондуктометрії відсутні такі, що визначають провідності рідин і біооб'єктів у змінному за напруженістю ІЕП; для визначення провідності клітин тварин необхідно розробити нову кондуктометричну комірку зі змінною геометрією, а для оцінки її параметрів доцільно використати візуалізацію структури провідного об'єму за допомогою явища діелектрофорезу; з існуючої професійної серійної вимірювальної та/або спеціалізованої апаратури електроманіпуляції не можливо вибрати відповідний за технічними даними генератор для імпульсної кондуктометрії клітин та рідких середовищ,

тому виникає необхідність його розробки.

У другому розділі представлені електричні моделі клітини і її структурних елементів у зв'язку з дією змінного ІЕП: електролітична провідність цитоплазми та провідність ооцита і 2-16-клітинних ембріонів у вигляді еквівалентних електричних схем RC -ланцюгів з метою теоретичного обґрунтування параметрів біотехнічного комплексу імпульсної кондуктометрії та режимів електропорації.

Біологічна мембрана клітини розглянута як електрична ємність, в якій провідниками є електроліти середовища та цитоплазми. Цитоплазма клітини представлена у вигляді іонного провідника другого роду. Сила та щільність струму, що виникає в результаті переміщення в одиниці об'єму іонів, несучих заряди одного знаку, є:

$$I = \sum_{i=1}^n q_i C_i / t = n S z e v = n (z e)^2 S E / f, \quad \text{щільність струму: } j = n (z e)^2 E / f, \quad (1)$$

де $v = z e E / f$ - швидкість руху іона у електричному полі; f - коефіцієнт тертя; e - елементарний заряд; z - валентність; E - напруженість поля; q_i - заряд іона; C_i - концентрація; t - час руху іона в ІЕП (тривалість імпульсу); S - перетин іонного провідника.

При переміщенні в ІЕП іонів з різними електричними зарядами та припущенням електричної нейтральності $n^+ z^+ + n^- z^- = 0$, виходячи з закону Ома $j = \sigma E$, щільність струму та провідність цитоплазми виражаються формулами:

$$j = n^+ (z^+ e)^2 (1/f^+ + n^- / n^+ f^-) E, \quad \sigma = n^+ (z^+ e)^2 (1/f^+ + n^- / n^+ f^-). \quad (2)$$

Виходячи з того, що при імпульсній кондуктометрії амплітуда прямокутного імпульсу виникає стрибком, доцільно будувати електричні моделі (ЕМ) клітин на еквівалентних елементах ємності і опору, тобто паралельно-послідовних RC -ланцюгах.

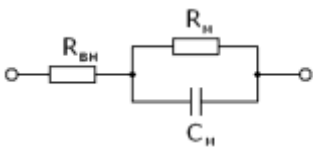


Рис. 1 Еквівалентна лінійна електрична схема мембрани клітини

Лінійна еквівалентна електрична схема ємності мембрани з витокм показана на (рис. 1), де C_m і R_m - ємність і опір витоку мембрани, а також невеликий зовнішній опір $R_{вн}$ з'єднуючих провідників вимірною схеми.

При дії імпульсної напруги на цей ланцюг виникає перехідний процес заряду еквівалентної ємності мембрани. Закон зміни ємкісної еквівалентної провідності мембрани у цьому процесі з витокм ємності є:

$$G_{\text{экв}} = G_C^M + G_M = \frac{1}{R_{вн}} [\exp(-t/\tau_C) / (1 - \exp(-t/\tau_C))] + G_M, \quad (3)$$

де $\tau_C = R_{вн} C_m$ - постійна часу ланцюга; G_M - активна провідність витоку ємності; G_C^M - ємкісна провідність мембрани.

Використовуючи інтеграл Дюамеля, одержана функція падіння напруги на ємності U_C з урахуванням тривалості τ_u і амплітуди U_0 прямокутного імпульсу ІЕП:

$$U_C(t) = U_0 \{ [1 - \exp(-t/\tau_C)] \cdot 1(t) - [1 - \exp(-(t - \tau_u)/\tau_C)] \cdot 1(t - \tau_u) \}. \quad (4)$$

Функція (4) і аналогічна їй на $R_{вн}$ описують відомі електротехнічні процеси уповільнення фронту і диференціювання імпульсу відповідно, за умови $\tau_u \gg \tau_C$, яка виконується завжди при імпульсній кондуктометрії. Якщо замість $R_{вн}$ в схему (рис. 1)

включити відомий калібрований опір R_k , що задовольняє умові $R_M \gg R_k \gg R_{вн}$, то за падінням напруги на ньому можна вимірювати провідність клітини, в яку входить провідність цитоплазми і мембрани, що теоретично обґрунтовує метод імпульсної кондуктометрії.

Для визначення процесу загальної провідності клітини в режимі зворотної електропорації, тобто без електропробою мембрани, виконана суперпозиція провідностей,

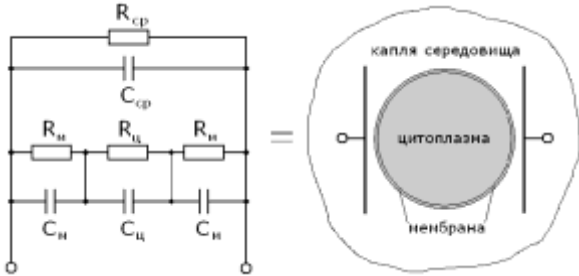


Рис. 2 Лінійна еквівалентна електрична схема ЕМ клітини в середовищі між двома мікроелектродами

викликаних проходженням імпульсного струму через цитоплазму і мембрану, що представлені відповідно іонним провідником і RC -ланцюгом в рамках повної еквівалентної лінійної схеми ЕМ клітини, (рис. 2).

Еквівалентна лінійна схема ЕМ утворена з елементів (рис. 1) шляхом додавання опору цитоплазми R_u , опору і ємкості середовища R_{cp} , C_{cp} . Ємкість цитоплазми C_u створює з мембраною електролітичний конденсатор близько 4 пф. Загальна еквівалентна провідність клітини за схемою, (рис. 2), є:

$$G_{кл}^{заг} = \frac{1}{2R_m^{екв} + R_u^{екв}} + \frac{1}{R_{cp}^{екв}} = \frac{(G_m + G_C^M) \cdot G_u}{2(G_u + G_C^u) + G_m + G_C^M} + G_C^{cp} + G_{cp}, \quad (5)$$

$$\text{де } R_{cp}^{екв} = (1/R_{cp} + 1/R_C^{cp})^{-1}; \quad R_m^{екв} = (1/R_m + 1/R_C^M)^{-1}; \quad R_u^{екв} = (1/R_u + 1/R_C^u)^{-1}.$$

У виразі (5) провідності, G_{cp} , G_m і G_u мають активний характер. При проходженні прямокутного імпульсу амплітуда розподіляється на них відповідно до закону Ома. Решта провідностей має реактивний характер (3), під час проходження фронту імпульсу ємкості швидко заряджаються і надалі в загальній сумі (5) участі не беруть.

Обґрунтовано процес загальної провідності клітини в режимі нелінійної електропорації мембрани, виходячи з того, що із зростанням напруженості ІЕП мембрана

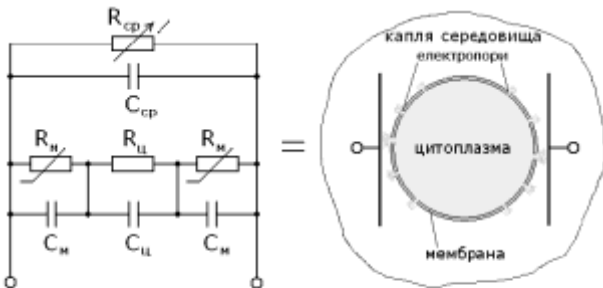


Рис. 3 Нелінійна еквівалентна електрична схема ЕМ клітини в середовищі між двома мікроелектродами

клітини електропорується все більшою мірою та настає момент її необоротного електропробою з різким зростанням провідності. Виконано моделювання провідності клітини нелінійною еквівалентною схемою ЕМ з нелінійним елементом опору витoku мембрани, (рис. 3).

Електрична змінна, від якої повинен залежати нелінійний опір мембрани визначається функцією ВАХ $i=f(u)$, що аналітично задається функцією апроксимації у вигляді ряду Тейлора, який можна представити поліномом, обмеженим третім ступенем (для спрощення розрахунку):

$$i = \sum_{j=0}^3 a_j (u - u_0)^j, \quad (6)$$

де a_j - коефіцієнти полінома, які підбираються при апроксимації полінома до

ВАХ. У стаціонарній стадії імпульсу нелінійна провідність мембрани є відношенням поточних величин струму і напруги:

$$G_m(u) = \frac{i(u)}{u} = \left[i_0 + \sum_{k=1}^3 a_k (u - u_0)^k \right] / u . \quad (7)$$

У нелінійну еквівалентну електричну схему ЕМ, (рис. 3), також введений новий змінний елемент - лінійна провідність (опір) середовища, залежна від вхідної зростаючої імпульсної напруги:

$$G_{cp}(u) = G_{cp}^o + k u , \quad (8)$$

де G_{cp}^o - початкова (власна) провідність середовища; k - нахил функції.

Лінійність функції (8) обумовлена повільним зростанням провідності середовища за рахунок поступового виходу іонів цитоплазми у нього при електропорації мембрани. Узагальнюючи елементи лінійної і нелінійної ЕМ, можна знайти, що після проходження фронту прямокутного імпульсу загальна провідність стає функцією тільки вхідної напруги:

$$G_{кл}^{заг} \Big|_{t > \tau_\phi} = \varphi(u) = \frac{G_m(u) \cdot G_y}{2G_y + G_m(u)} + G_{cp}^o + k u . \quad (9)$$

Вимірювальна серія вхідних прямокутних імпульсів напруги зростаючої амплітуди представлена математично, як послідовність парафазних одиничних стрибків з кроком зростання амплітуди ΔU і періодом слідування T в часі вимірювання t :

$$U_{вх}(t) = n \Delta U \cdot [1(t + (n-1)T) - 1(t + (n-1)T - \tau_u)] , \quad (10)$$

де n - порядковий номер імпульсу.

Використовуючи основні співвідношення (7), (9), (10), загальна активна провідність одиночної клітини при дії прямокутного імпульсу напруги зростаючої амплітуди після проходження фронту, згідно ЕМ, дорівнює:

$$G_{кл}^{заг} \Big|_{t > \tau_\phi} = \frac{\left[i_0 + \sum_{k=1}^3 a_k (u - u_0)^k \right] \cdot \{ G_y + k n \Delta U \cdot [1(t + (n-1)T) - 1(t + (n-1)T - \tau_u)] \}}{2G_y n \Delta U \cdot [1(t + (n-1)T) - 1(t + (n-1)T - \tau_u)] + i_0 + \sum_{k=1}^3 a_k (u - u_0)^k} + \frac{2G_y k \{ n \Delta U \cdot [1(t + (n-1)T) - 1(t + (n-1)T - \tau_u)] \}^2}{2G_y n \Delta U \cdot [1(t + (n-1)T) - 1(t + (n-1)T - \tau_u)] + i_0 + \sum_{k=1}^3 a_k (u - u_0)^k} + G_{cp}^o . \quad (11)$$

Таким чином показано, що провідність клітини у середовищі залежить від апаратних параметрів імпульсу і завжди є адитивною функцією згідно закону Кольрауша, формула (11). Для визначення власної провідності клітини достатньо виключити провідність середовища із загальної провідності апарату на етапі вимірювання первинних величин або методично на етапі математичної обробки даних експериментів з імпульсної кондуктометрії.

Процес розвитку від однієї клітини до багатоклітинного ембріона йде шляхом ділення на бластомери. При визначенні провідності ембріона бластомери займають довільне положення у міжелектродному просторі середовища. Встановлено, що як-

Виходячи з цього, знайдені провідності 4, 8 та 16-клітинних ембріонів, (рис. 5).

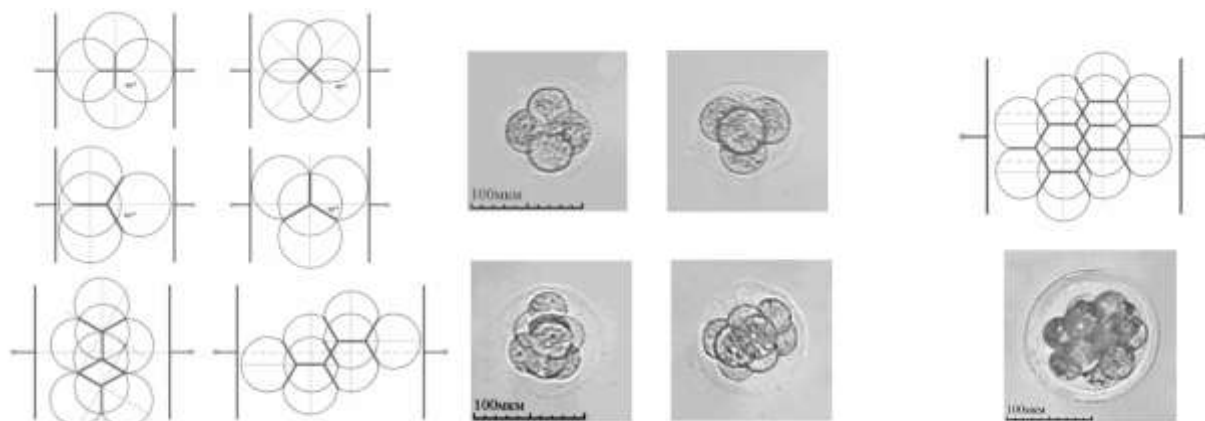


Рис. 5 Основні орієнтації моделей 4-16-клітинних ембріонів між мікроелектродами і фото ембріонів миші (4-8) та корови (16)

Узагальнюючи провідності 2-16-клітинних ембріонів, отримано вираз для обчислення їх провідності згідно нелінійної ЕМ:

$$G_{emb}^{заг} = \sum_{i=1}^m (n-m) G_i^{||} + \left(\sum_{j=1}^{m-n} 1/(n G_j^{\perp}) \right)^{-1} + \sum_{i=1}^{m-n} n \cos \alpha (G_{mk})^i + G_{cp}, \quad (14)$$

де $G_i^{||}$ і G_j^{\perp} - провідності i -го і j -го бластомерів в паралельному і послідовному включенні за схемою ЕМ; m і n - кількість бластомерів, включених паралельно або послідовно; кут α має значення, залежно від кількості бластомерів в ембріоні.

У третьому розділі розглянуті: геометрична модель мікровілі мембрани клітини у зв'язку з провідністю в різних середовищах та фізико-математична модель провідності клітини на основі вірогідності утворення електропір в мембрані з метою теоретичного обґрунтування режимів електропорації для імпульсної кондуктометрії клітини в середовищах з різною осмотичною концентрацією та лавиноподібного характеру зростання загальної провідності клітини відповідно.

Мембрана клітин ссавців має мікроскладки, так звані мікровілі, які за рахунок розпрямлення-ущільнення дають можливість зміни об'єму клітини в умовах різної осмотичної концентрації середовища, чим пояснюються особливості провідності клітини при електропорації в неізотонічних середовищах. З урахуванням цього побудована геометрична модель клітини у вигляді сфери, поверхня якої утворює безліч періодичних чашоподібних западин і виступів, (рис. 6).

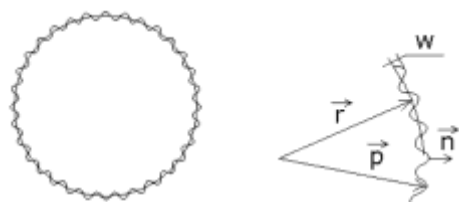


Рис. 6 Двовірна модель мікровілі мембрани і радіус-вектори кола клітини, мікровілі і нормалі до них

Зміна радіус-вектора клітини, початок якого знаходиться в центрі кола, а кінець описує синусоїдоподібну криву (уздовж мікровілі), (рис. 6):

$$\vec{p}(x, y) = \vec{r}(x, y) + w(x, y)\vec{n} \quad \vec{n} = r/|\vec{r}| = \vec{r}/R \quad \vec{n} \parallel \vec{r}. \quad (16)$$

Загальний об'єм клітини, використовуючи перетворення координат:

Загальний об'єм сферичної клітини змінюється з урахуванням об'єму мікровілі за формулою:

$$V = V_{cf} \pm V_{\mu}. \quad (15)$$

Зміна радіус-вектора клітини, початок якого знаходиться в центрі кола, а кінець описує синусоїдоподібну криву (уздовж мікровілі), (рис. 6):

$$V = \int_0^{p(u,v)} \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} r^2 \sin \theta d\theta d\varphi dr = \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} p(u,v) |d\theta d\varphi|, \text{ де } u = u(\varphi, \theta); v = v(\varphi, \theta). \quad (17)$$

Обчислення інтеграла (17) дає загальний об'єм клітини з мікрівілі:

$$V = 4/3 \pi R^3 + 2\pi^2 R^3/3 = 2\pi R^3 (\pi + 2)/3. \quad (18)$$

Загальна площа поверхні сфери, включаючи мікрівілі:

$$S = S_{cf} + \sum_{i=1}^K S_{\mu}^i = 4\pi R^2 + 4\pi R^2 = 8\pi R^2. \quad (19)$$

Обчислення поверхнево-об'ємного відношення (ПОВ) дає:

$$\begin{aligned} \text{моделі - сфера з мікрівілі: } S/V &= 4 \cdot 3/R(\pi + 2) \approx 2/R; \\ \text{гладка сфера: } S/V &= 3/R. \end{aligned} \quad (20)$$

Проведене порівняння ПОВ для ооцитів та 2-клітинних ембріонів, розраховане для обох моделей, - сфери гладкої і з мікрівілі показало, що обидві пари концентраційних залежностей ПОВ мають точку перетину, але з різними абсцисами, (рис. 7).

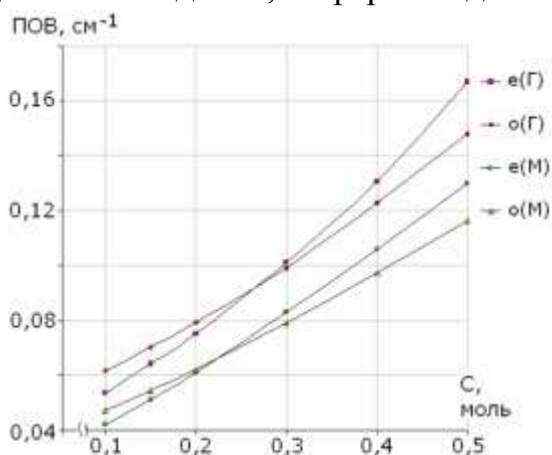


Рис. 7 Концентраційна залежність ПОВ ооцитів (о) і 2-клітинних ембріонів (е) для двох моделей - гладкої сфери (Г) і з мікрівілі (М)

Для обчислення абсциси точок перетину побудовані і вирішені спільно регресійні рівняння, як поліноми другого порядку:

гладка сфера:

$$\text{ПОВ } e(\Gamma) = 0,24C^2 + 0,14C + 0,04 \quad (R^2 = 0,999)$$

$$\text{ПОВ } o(\Gamma) = 0,13C^2 + 0,14C + 0,05 \quad (R^2 = 0,999)$$

сфера з мікрівілі:

$$\text{ПОВ } e(M) = 0,08C^2 + 0,18C + 0,02 \quad (R^2 = 0,999)$$

$$\text{ПОВ } o(M) = 0,06C^2 + 0,14C + 0,03 \quad (R^2 = 0,999)$$

Рішення рівняння (21) для гладкої сфери дає концентрацію $C \approx 0,28$ М, а для моделі з

мікрівілі $C \approx 0,22$ М, що ближче до експериментального $C = 0,19$ М і означає кращу згоду з ним моделі з мікрівілі. Побудована модель клітини з мікрівілі дозволяє пояснити експериментально отриманий перетин кривих напруженості електропробою ооцитів і 2-клітинних ембріонів, що дозволяє використовувати модельні значення концентрацій у різних клітинних технологіях, зокрема, для полегшення електролізу або транспорту речовин через мембрану.



Рис. 8 Апроксимація електропори циліндром на поверхні мембрани

При електропорації мембрани пробиваються і потім еволюціонують електропори різного калібру унаслідок взаємодії з ІЕП. Показано, що на процес і результат взаємодії мембрани з полем впливає її неоднорідна структура, що приводить до неоднорідності провідності, яка є одночасно індикатором та інтегральною характеристикою процесу електропорації. Оскільки природну структуру мембрани змодельовати складно, запропоновано застосувати

вірогідніший підхід до утворення електропори, де вона апроксимована круглим циліндром радіусу r , висотою h (товщина мембрани), (рис. 8).

Вільна енергія електропори є сумою:

$$\Delta E = \Delta E_m + \Delta E_e + E_o, \quad (22)$$

де ΔE_m і ΔE_e - механічна і електрична складові; E_o - довільна константа.

Механічна складова енергії пори:

$$\Delta E_m = \pi(2E_p r - E_{mw} r^2), \quad (23)$$

де E_p - лінійне натягнення краю пори; E_{mw} - поверхневе натягнення при взаємодії мембрана-вода.

Електрична складова енергії (22) представляє пору, як конденсатор з деякою провідністю витoku:

$$\Delta E_e = -\frac{\pi(\varepsilon_w - \varepsilon_m)U^2}{h^2} \int_{r_{\min}}^r g^2 r dr, \quad g(r) = \left[\frac{2hG_s}{2hG_s + \pi r G_p(r)} \right], \quad (24)$$

де ε_w і ε_m - ДП води і ліпідів мембрани відповідно; U - ТМП; $g(r)$ - функція, що враховує ефект розподілу зовнішньої напруги на краю (до середовища) і усередині пори; G_p і G_s - об'ємні провідності усередині пори і середовища біля входу в пору.

Для обчислення сумарної провідності через поверхню мембрани, введено поняття щільності вірогідності утворення електропір $n(r,t)$, як функції, залежної від радіусу пори і часу. Розподіл за радіусами описано функцією щільності $p(r)$. Кількість електропір $w(t)$ змінюється в часі завдяки їх виникненню і репарації. Звідси витікає, що розподіл за радіусами і часом - дві незалежні функції, тому загальна щільність вірогідності утворення електропір $n(r,t) = p(r)w(t)$, а провідність через всю мембрану:

$$G(r,t) = \frac{I(r,t)}{U} = 2\pi \int_{r_{\min}}^r \left[\frac{G_s G_p r^2}{2hG_s + \pi r G_p} p(r)w(t) \right] dr. \quad (25)$$

Для визначення виду функції $n(r,t)$ використана швидкість її зміни, одержана на основі диференціального рівняння Смолюховського:

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D_p \left[\frac{\partial^2 n}{\partial r^2} + \frac{1}{kT} \frac{\partial}{\partial r} \left(n \frac{\partial \Delta E}{\partial r} \right) \right], \quad (26)$$

де D_p - ефективна константа дифузії для пори.

Враховуючи, що при електропорації мембрани кількість електропір складає $\sim 10^4$ - 10^5 , розподіл їх за радіусами у будь-який момент еволюції підкоряється статистиці Гауса:

$$n(r,t) = p(r)w(t) = 1/\sqrt{2\pi} \exp(-r^2/2)w(t). \quad (27)$$

Підставляючи співвідношення (27) в рівняння (26), одержуємо рішення:

$$w(t) = \exp[A(r)t], \quad (28)$$

де $A(r)$ - позначення частини функції, залежної від радіусу пори.

Рішення (28) і вираз (27) дають функцію $n(r,t)$:

$$n(r,t) = 1/\sqrt{2\pi} \exp[A(r)t - r^2/2]. \quad (29)$$

Інтеграл провідності мембрани знаходиться підстановкою вірогідності (29) у формулу (25) з урахуванням всіх проміжних виразів:

$$G(r,t) = \sqrt{2\pi} \int_{r_{\min}}^r \frac{G_s G_p \exp\left[A(r)t - \frac{r^2}{2}\right] r^2}{\pi r G_p + 2G_s h} dr = \exp\left(A(r) - \frac{r^2}{2}\right) \left\{ \exp\left(\frac{2\pi E_p D_p}{kT} t\right) \cdot K_1 + \frac{K_2}{2t\sqrt{K_3}} \cdot \left[\frac{\ln|r - K_3|}{\ln|r + K_3|} - K_4 \right] \right\}, \quad (30)$$

де K_i - деякі константи, $i=1,2,3,4$.

Аналіз формули (30) показує, що залежність провідності мембрани від радіусу електропір має експоненціальний характер. В припущенні, що радіус електропір є

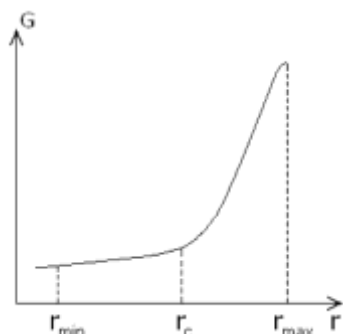


Рис. 9 Залежність провідності мембрани від середнього радіусу електропір за моделлю вірогідності

середнім (найвірогіднішим) значенням при даній напруженості ІЕП, згідно формулі (30) отримуємо середнє значення провідності у момент часу t . Тоді із зростанням напруженості ІЕП середній радіус електропір і провідність також ростимуть, а функція (30) описує цей процес. Із зростанням напруженості ІЕП радіус електропір поволі росте, досягаючи критичного, а при $r > r_c$ і далі до r_{max} мембрана необоротно руйнується, що відповідає критичній напруженості поля, (рис. 9). Інтервал $r_{min} < r < r_c$ відповідає фазі оборотної електропорації мембрани з різним ступенем її пошкодження і репарації. Функція (30) якісно співпадає з даними експериментів з вимірювання провідності клітин в ІЕП із зростаючою напруженістю.

Таким чином, основною причиною нелінійного зростання провідності клітини в ІЕП є лавиноподібний характер зростання середнього радіусу електропір, що приводить до електропробою мембрани. Це дозволяє використовувати дану модель при обґрунтуванні параметрів апаратури для імпульсної кондуктометрії клітин.

У четвертому розділі теоретично обґрунтовано та розроблено методи математичного аналізу параметрів електропорації та електропробою, необхідних для апаратної реалізації процесу імпульсної кондуктометрії клітини у ІЕП зростаючої напруженості.

Для визначення параметрів електропорації від оборотного до необоротного електропробою розроблено два графоаналітичні методи, засновані на апроксимації цих залежностей різними функціями.

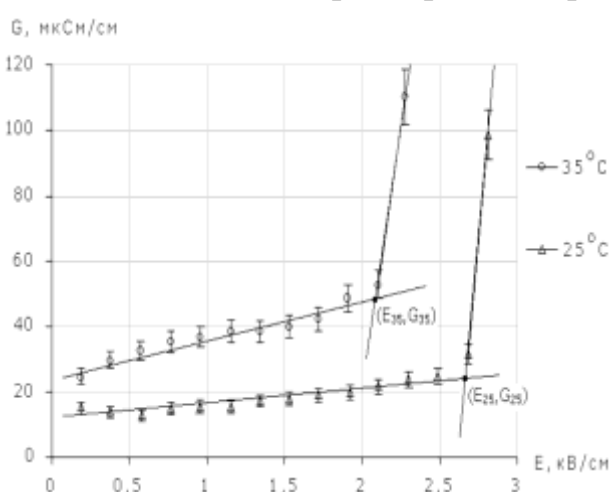


Рис. 10 Залежності провідності ооцитів миші від напруженості ІЕП при температурі 25°C та 35°C і апроксимуючі прямі

Перший метод - шматково-лінійна апроксимація, при якій крива провідності умовно ділиться на дві прямі гілки – квазі-лінійного зростання з невеликою швидкістю до пробую і різкого зростання після необоротного електропробою мембрани. Значення параметрів електропробою мембрани знаходяться, як координати точки перетину двох апроксимуючих прямих, одержаних методом найменших квадратів, (рис. 10).

Координати точок перетину апроксимуючих прямих для кожної залежності обчислюються за формулами аналітичної геометрії, через визначник системи лінійних рівнянь за правилом Крамера. Наприклад, електропробой мембрани ооцита миші при $t=25^\circ\text{C}$ має параметри: напруженість поля $E_{25}=2,67$ кВ/см, і провідність у момент розриву мембрани $G_{25}\approx 25$ мкСм/см, при

$t=35\text{ }^{\circ}\text{C}$: $E_{35}=2,09\text{ кВ/см}$ і $G_{25}\approx 48\text{ мкСм/см}$, відповідно. Особливість моделі шматково-лінійної апроксимації у тому, що вона придатна тільки для визначення параметрів необоротного електропробою.

Другий метод – нелінійна апроксимація кривої провідності поліномом непарного ступеня. За допомогою цієї моделі можуть бути одержані не тільки параметри не-

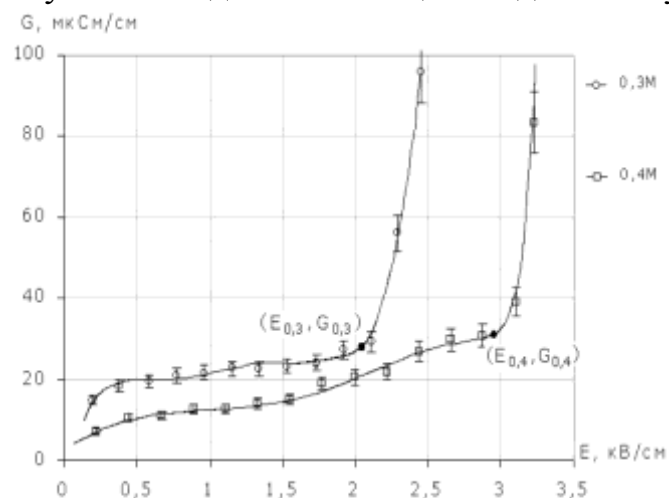


Рис. 11 Залежності провідності ооцитів миші від напруженості ІЕП в 0,3 і 0,4М маніті та апроксимуючі поліноми

оборотного електропробою мембрани клітини, як координати точки максимальної кривизни функції полінома, але і всіх проміжних екстремумів, тобто оборотної електропорації, (рис. 11). Апроксимація рівнянь поліномів до експериментальних точок виконана за рівнянням полінома не нижче 5 ступеня:

$$G = a + bE + cE^2 + dE^3 + eE^4 + fE^5, \quad (36)$$

де a, b, c, d, e, f - коефіцієнти полінома.

Кривизна полінома визначена аналітично за формулою диференціальної геометрії, як функція напруженості поля, математичний аналіз якої дає всі її екстремуми, в тому числі і максимальну кривизну,

прирівнюючи нулю її першу похідну:

$$K = \frac{G''}{[1 + (G')^2]^{3/2}} = f(E), \quad \text{похідна: } f'(E) = \frac{dK}{dE} = 0, \quad (37)$$

де K - поточна кривизна полінома; G' і G'' - перша і друга похідні полінома відповідно.

З рівняння (37) знаходиться декілька коренів, з яких найбільший - абсциса точки максимальної кривизни полінома, тобто напруженість поля при необоротному електропробою мембрани, яка при підстановці в рівняння полінома (36) дає провідність клітини. Наприклад, параметри електропробою мембрани ооцита миші у 0,4 М маніті: напруженість поля $E_{0,4}=2,92\text{ кВ/см}$, провідність в момент розриву мембрани $G_{0,4}\approx 32\text{ мкСм/см}$; у 0,3М маніті, відповідно: $E_{0,3}=2,03\text{ кВ/см}$, $G_{0,3}\approx 28\text{ мкСм/см}$.

Таким чином, за допомогою запропонованих математичних моделей обчислюються параметри ІЕП і провідності клітини (у середовищах з різними фізико-хімічними умовами), необхідні для апаратної реалізації кондуктометрії, як методу електроманіпуляції, заснованого на явищі електропорації мембрани клітини.

У п'ятому розділі теоретично обґрунтовані параметри візуалізації силових ліній електричного поля на основі використання явища діелектрофорезу еритроцитів для обґрунтування і визначення апаратного параметру мікроелектродної кондуктометричної комірки щодо вимірювання провідності клітин та рідких середовищ.

Явище діелектрофорезу використано з метою встановлення форми провідного об'єму між мікроелектродами за розподілом візуалізованих силових ліній поля для визначення апаратного параметру кондуктометричної комірки змінної геометрії. Те-

оретичне обґрунтування дії діелектрофореzu розглянуто з метою визначення факторів, що можуть стати на заваді цього процесу. До них віднесено частоту ВЧ поля та концентрацію клітин. Обґрунтовано, що індукований на мембрані у зовнішньому полі диполь періодично з частотою поля піддається дії сил, що створюють обертальний момент відносно центру маси сферичної клітини-диполя.

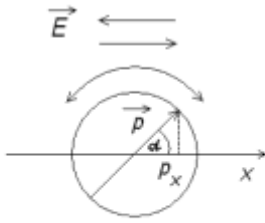


Рис. 12 Клітина-диполь, як гармонійний осцилятор

Отже, у ВЧ полі певної частоти можливі небажані щодо візуалізації обертальні коливання клітини-диполя, (рис. 12). Диференціальне рівняння зміни проекції вектора дипольного моменту з урахуванням опору в'язкого середовища для сферичної клітини в

одновимірному випадку є:

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} = -F_e + F_m = -\frac{1}{2r} (M_e - M_m) \cos \alpha = -2\pi r^2 (\varepsilon \varepsilon_0 E^2 - 2\eta \omega) \cos \alpha, \quad (31)$$

де F_e - обертаюча квазіупружна сила, діюча на клітину-диполь з боку поля; F_m - сила опору в'язкого середовища при обертальному коливанні сфери; M_e - момент сил електричного поля на клітину-диполь; $M_m = -8\pi\eta\omega r^3$ - момент сил опору в'язкого середовища при обертанні сфери; η - в'язкість середовища; ω - кругова частота обертання. Одержане рівняння (31) приведено до гармонійного вигляду з рішенням:

$$f_0 = \frac{\omega_0}{2\pi} \sqrt{1 - \frac{\eta}{E} \sqrt{\frac{4\pi r}{m\varepsilon\varepsilon_0}}}, \quad (32)$$

де $\omega_0 = 2\pi f_0$, а повний розмах коливань проекції вектора дипольного моменту p_x досягається за умови $\alpha=0$. Маса клітини: $m=4/3\pi r^3 \rho \approx 12,5 \cdot 10^{-14}$ кг, $\rho=1,1 \cdot 10^3$ кг/м³ - щільність, $r \approx 3 \cdot 10^{-6}$ м - радіус. Підстановка у формулу (32) маси і решти числових значень: $\varepsilon_0=8,85 \cdot 10^{-12}$ ф/м, $\varepsilon \approx 2700$, $E=1,5 \cdot 10^5$ В/м, $\eta=1,04 \cdot 10^{-3}$ Па·с дає значення частоти механічного резонансу клітини: $f_0 \approx 20$ кГц. Таким чином, отримана частота дозволяє стверджувати, що побічний ефект ротації еритроцитів ніколи не буде досягнутий на частотах понад 100 кГц (для гарантованого уникнення явищ поляризації та електролізу), що можна вважати нижньою частотною межею діелектрофореzu.

Розрахована верхня межа частоти ВЧ поля для діелектрофореzu. Згідно теорії Максвела-Вагнера діелектрик має максимальні втрати на частоті $f_w=1/2\pi\tau_t$, де τ_t - час релаксації при температурі t . Для розбавленої суспензії еритроцитів, які можна представити діелектричними сферами, час релаксації складає 0,12 мкс. Зона дисперсій ДП і провідності суспензії, таким чином, лежить у області частот близько 1 МГц. Унаслідок сумісної дії сил зовнішнього електричного поля і ВЧ нагріву при релаксації клітин в зоні дисперсії виникають передумови теплового і електричного пробиву їх мембран, спричиняючи лізис клітин. Звідси витікає, що діапазон діелектрофореzu еритроцитів повинен лежати в межах 0,1-1 МГц.

Проведена оцінка оптимальної концентрації еритроцитів в суспензії в припущенні, що індуковані поля близьких один до одного клітин порушують процес утворення ланцюжків через взаємний вплив. Власні поля клітин малі і не враховані. Напруженість поля індукованого диполя складає: $E=p/4\pi\varepsilon_0 R^3$. Для нехтування взаємним впливом полів сусідніх клітин-диполів достатньо вважати, що поле будь-якого з

них спадає у 100 разів. Таким чином, відстань між клітинами повинна бути $n = \sqrt[3]{100} \approx 5$ їх діаметрів. При рівномірному розподілі сферичних клітин за заданим об'ємом концентрація обчислюється за формулою:

$$C = 8/(2+n)^3 \cdot 100 [\%], \quad (33)$$

Згідно з формулою (33) $C \sim 3-4 \%$, що відповідає концентрації $10^8/\text{см}^3$. Розраховані значення частотного діапазону та концентрації для стійкого діелектрофорезу еритроцитів використані при розробці комірки зі змінною геометрією.

У результаті порівняння параметрів кондуктометричної комірки з традиційно жорсткою та зі змінною геометрією, яка пропонується, встановлено, що форма силових ліній поля в жорсткій комірці значення не має, а в "комірці" зі змінною геометрією мікроелектродів (МЕ) має вирішальне значення, оскільки вплив їх на середовище вже не обмежений корпусом, (рис. 13).

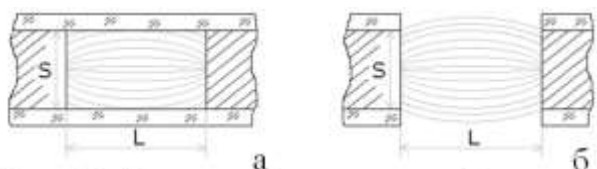


Рис. 13 Кондуктометрична комірка з геометрією: а – жорсткою, б – змінною, L – відстань, S – площа електроду

Апаратний параметр, що характеризує жорстку комірку $k_1 = L/S$ є константою. Якщо геометрія комірки змінюється при роботі з різними клітинами, апаратний параметр буде функцією, яку необхідно знайти.

Геометрична форма нової "комірці" апроксимована еліпсоїдом з віссю симетрії,

що співпадає із загальною віссю МЕ. Виходячи з цього провідність визначається об'ємом усіченого еліпсоїда, побудованого на кінцях провідних торців МЕ в просторі між ними, (рис. 14). Для визначення функції апаратного параметру враховано збільшення об'єму "комірці" за рахунок виходу силових ліній поля за межі циліндрового об'єму, обмеженого L і S , (рис. 13). Параметр жорсткої комірки k_1 скоректовано: $k_2 = k_1 F$, де F - формфактор, рівний відношенню об'ємів провідного середовища в комірках з жорсткою і змінною геометрією відповідно, тобто $F = V_{ц}/V_{ел}$. Таким чином, формула для обчислення апаратного параметру кондуктометричної "комірці" зі змінною геометрією за об'ємом усіченого еліпсоїда обертання має вигляд:

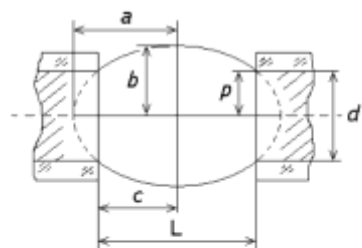


Рис. 14 Елементи усіченого еліпса, побудованого на співвісних МЕ (велика вісь $2a$, мала вісь $2b$, фокусна відстань $c=L/2$ і параметр $p=b^2/a$)

$$k_2 = F \frac{L}{S} = \frac{V_u L}{V_{ел} S} = \frac{L^2}{V_{ел}} = 12 \left(1 + \sqrt{1 + \frac{4L^2}{d^2}} \right) / \pi \left[3 \frac{d^2}{L} \left(1 + \sqrt{1 + \frac{4L^2}{d^2}} \right) + 4L \right]. \quad (34)$$

Отриманий апаратний параметр (34) є функцією двох змінних $k_2 = f(d, L)$ і застосовується для пари співвісних циліндрових МЕ різних діаметрів та відстані між торцями. У випадку розташування МЕ не вільно в об'ємі краплі, а безпосередньо на поверхні предметного скла, що лежить на столику мікроскопа, значення апаратного параметру k_2 уточнено, (рис. 15). Силові лінії поля в нижній частині об'єму усіченого еліпсоїда "відсікаються" площиною предметного скла (сірий сегмент). На основі рівнянь Максвелла для струмів і ЕМП показано, що вони фізично не формують оміч-

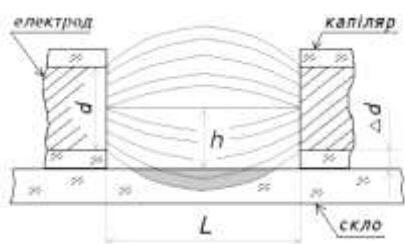


Рис. 15 Розташування МЕ співвісно на поверхні предметного скла

ний провідний об'єм у міжелектродному просторі, оскільки скло – діелектрик. Тому з об'єму усіченого еліпсоїда потрібно відняти об'єм сегменту, що відсікається площиною предметного скла, (рис. 15):

$$V_{ел} - V_{сегм} = \pi \left[(Lb^2 - L^3 d^2 / 48b^2) - 4b/3d (b^3 - h^3) \right]. \quad (35)$$

Апаратний параметр k_2 для цього випадку розраховується підстановкою (35) у (34) замість величини $V_{ел}$. Побудовані графіки апаратного параметру комірок із співвісними циліндровими МЕ з урахуванням формфактору для обчислених

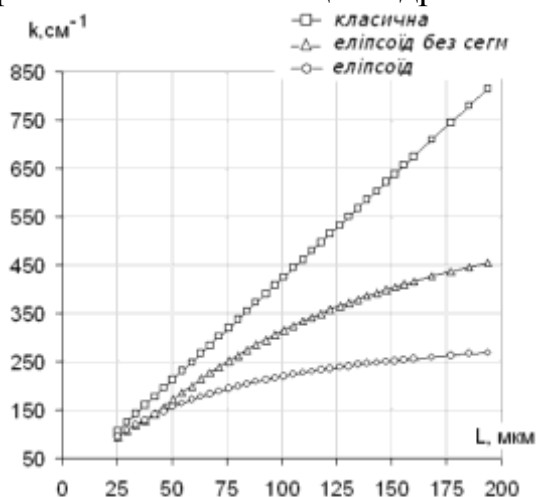


Рис. 16 Залежність апаратного параметра комірок k із співвісними циліндровими МЕ від міжелектродної відстані

вище об'ємів усіченого еліпсоїда і еліпсоїда без сегменту порівняно з класичною константою жорсткої кондуктометричної комірки, (рис. 16). Отримана залежність для малих відстаней між МЕ (25-35 мкм) показує, що значення параметра k є близькими для всіх комірок, (рис. 16). Тобто при вимірюванні провідності невеликих клітин (бластомери, соматичні клітини) або невеликих об'ємів середовища, виходом силових ліній електричного поля за межі діаметру МЕ можна нехтувати. При вимірюванні провідності великих клітин, як ооцити або ембріони різних стадій розвитку ($L \geq 80-150$ мкм), зневажа формфактором може привести до погрішності, що у декілька разів перевищує саме виміряне значення.

У шостому розділі приведені результати розробки біотехнічного комплексу імпульсної кондуктометрії з розрахунком основних електричних характеристик та оптимізацією параметрів, суть методу, методика вимірювання, опис технічного засобу для вимірювання провідності, конструкція, метрологічна атестація, розробка автоматизованого імпульсного кондуктометра з розрахунками параметрів принципової електричної схеми.

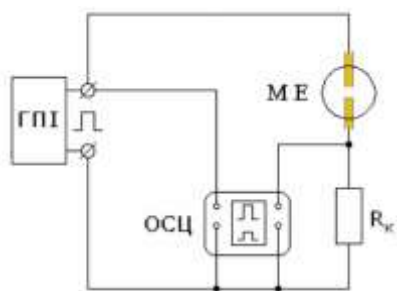


Рис. 17 Вимірювальна схема імпульсного кондуктометра

За основу вимірювання взято принцип послідовного включення об'єкту у вимірювальний ланцюг, (рис. 17). Склад вимірювальної схеми: генератор прямокутного імпульсу (ГПІ) зі змінною амплітудою та тривалістю, цифровий двоканальний запам'ятовуючий осцилограф (ОСЦ), декадний дільник з прецизійних резисторів R_x і співвісні вимірювальні мікроелектроди у якості кондуктометричної комірки. Параметри МЕ встановлені, виходячи з можливості вимірювання провідності поодиноких клітин з розмірами 80-150 мкм. Матеріал МЕ біологічно інертний, витримує дію різних рідких середовищ, має високу провідність і стійкість до електрохімічного розчинення під дією ІЕП і струмів високої щільності, а також має низьку поляризацію. МЕ повністю ізольовані (запанні в скляний капіляр з

Матеріал МЕ біологічно інертний, витримує дію різних рідких середовищ, має високу провідність і стійкість до електрохімічного розчинення під дією ІЕП і струмів високої щільності, а також має низьку поляризацію. МЕ повністю ізольовані (запанні в скляний капіляр з

пірексу), окрім торцевої контактної поверхні з досліджуваним об'єктом та виконані з металів Au $\varnothing 55$ мкм і W $\varnothing 100$ мкм. Торцювання МЕ проведене патентованим способом автоматизованого заточування заготовок.

Обґрунтовано електричні параметри ГПІ, де форма імпульсу прямокутна з плоскою вершиною. Максимальна амплітуда вихідної напруги ГПІ 100 В, враховуючи розміри клітин та напруженість електропробою мембрани. Тривалість імпульсу 60 мкс, що є оптимальною, враховуючи індукований потенціал, напруженість поля, розміри клітини, співвідношення провідностей середовища та клітини і час релаксації мембрани. Одним з критичних параметрів електропорації мембрани клітини є крутизна імпульсу, яка складає близько 1 В/нс, звідки тривалість фронту при максимальній амплітуді напруги дорівнює близько 100 нс. Вихідна потужність ГПІ розрахована так, щоб забезпечити незмінну амплітуду сигналу при роботі на низькоомне навантаження, що характерно для буферних поживних клітинних середовищ з високим вмістом солей. Для цього достатньо забезпечити максимальну амплітуду на на-

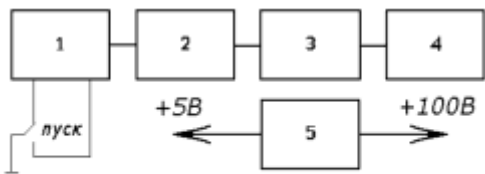


Рис. 18 Спрощена блок-схема ГПІ

вантаженні ГПІ $R_{ен}=50$ Ом, звідки пікова вихідна потужність, визначена для прямокутного імпульсу, складає ~ 200 Вт в імпульсі. Спрощена схема ГПІ представлена на (рис. 18). Схема містить: формувач 1 і задаючий генератор 2 з ручною перед-установкою, які забезпечують фронт імпульсу і стабільність тривалості відповідно; підсилювач-узгоджувач 3, який узгоджує низьковольтний вихід задаючого генератора 2 з високовольтною частиною схеми; високовольтний підсилювач потужності 4 (ВПП). Блоки живляться від стабілізованого джерела +5 В і +100 В ($\pm 0,1$ %). Схема також містить канал ручного запуску. В роботі наведені принципова електрична схема та технічні характеристики розробленого ГПІ.



Рис. 19 Комплекс апаратури і обладнання для імпульсної кондуктометрії клітин і рідких середовищ

Запропонована вимірювальна схема є головною складовою частиною у біотехнічному комплексі кондуктометричної апаратури, (рис. 19). Комплекс є єдиною вимірювальною системою радіоелектронних, оптичних і механічних пристроїв у складі: вимірювальний пристрій за схемою (рис. 17); позиціонери; МЕ, що знаходяться у полі зору інвертованого мікроскопа з авторегулятором температури столика; віброгасяча плита для придушення коливань МЕ і клітини в процесі вимірювань. Для спостереження і відеозапису морфологічної динаміки клітин в середовищах під впливом ІЕП в окуляр мікроскопа вбудована кольорова мікровідеокамера з виходом на відеореєстратор і монітор. У інший окуляр мікроскопа вбудована шкала для вимірювання геометричних параметрів клітини і мікроелектродної комірки.

Розроблено методику вимірювання первинних електричних величин і розрахунку провідності клітин та рідких середовищ, (рис. 20). Номінал резистора R_k вибирається декадним перемикачем з ряду 0,01...100 кОм ($\pm 0,05$ %). На об'єкт подається періоди-

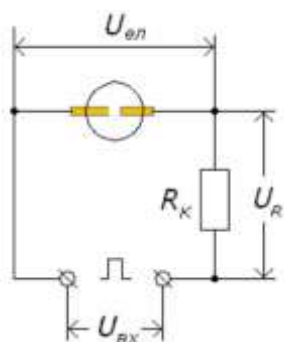


Рис. 20 Первинні вимірювані електричні величини

чно зростаюча за амплітудою прямокутна імпульсна напруга, що забезпечує відповідно зростаючу напруженість поля між МЕ.

Провідність об'єкту в послідовному ланцюзі між МЕ обчислюється за формулою:

$$G_{en} = U_R / R (U_{ex} - U_R) . \quad (38)$$

Для обліку зміни геометричних параметрів мікроелектродної комірки, вираз (38) множиться на апаратний параметр, що їх враховує, і робоча формула для питомої провідності об'єкту є:

$$G_n = G_{en} \cdot k_2 , \quad (39)$$

де k_2 – апаратний параметр кондуктометричної МЕ комірки змінної геометрії, формула (34).

Проведено дослідження метрологічних характеристик (МХ) імпульсного кондуктометра. Атестовані МХ вимірювальної схеми: діапазон вимірювання провідності, основна відносна інструментальна погрішність, лінійність вимірювальної схеми.

Діапазон вимірювання провідності за допомогою групи прецизійних резисторів R_N склав $(0,00997-2,003 \cdot 10^3)$ мкСм. Згідно отриманим значенням провідності в групах визначено середнє значення провідності для кожного номіналу резистора, середньоквадратичне відхилення провідності в кожній групі, абсолютна і відносна інструментальні погрішності вимірювання в групах.

Основна відносна інструментальна погрішність обчислена за формулою:

$$\delta = \pm \sqrt{\delta_G^2 + \delta_N^2 + \delta_o^2 + \delta_t^2 + \delta_R^2} , \quad \delta = \pm 3,4 \% , \quad (40)$$

де $\delta_G = \pm 1,6 \%$ - максимальна відносна інструментальна погрішність вимірювання по групах; $\delta_N = \pm \sqrt{4kT(R_k + R_N)\Delta f} / U_R \cdot 100 = 0,07 \%$ - відносна погрішність вимірювання напруги через тепловий шум Найквіста на резисторах R_k і R_N { $\Delta f = (2,5\tau_\phi)^{-1}$ - смуга пропускання, τ_ϕ - тривалість фронту імпульсу (100 нс), k - константа Больцмана, T - абсолютна температура (300К)}; $\delta_o = 3 \%$ - відносна погрішність цифрового осцилографа RIGOL DS5022M (паспорт); $\delta_t = 0,015 \%$ - відносна погрішність ТКО прецизійних резисторів типу С2-29В (допуск ТУ); $\delta_R = 0,1 \%$ - відносна погрішність опору використаного каліброваного резистора типа С2-29В (допуск ТУ).

Лінійність схеми перевірена шляхом одночасного вимірювання двоканальним осцилографом амплітуди напруги U_R на резисторі R_k і вихідної напруги від ГП. Побудована залежність першої напруги від другої, тобто апаратна функція, і визначено шляхом лінійної апроксимації виміряних значень максимальне відхилення експериментальних точок апаратної функції від апроксимуючої прямої. Це відхилення не перевищило $\pm 0,8 \%$. Значення досліджених МХ імпульсного кондуктометра, порівняно з приведеними в інструкції з експлуатації (ІЕ), зведені в табл. 1.

Таким чином, імпульсний кондуктометр атестований, як нестандартний засіб вимірювання провідності поодиноких клітин тварин і рідких середовищ з видачею метрологічного свідчення встановленого зразка за стандартом ДСТУ 3215-95.

Відповідність одержаних МХ заявленим в ІЕ

Технічна характеристика	Заявлена	Фактична
діапазон вимірювання провідності, мкСм	$0,01-2 \cdot 10^3$	$0,00998-2,003 \cdot 10^3$
основна відносна інструментальна погрішність вимірювання провідності, %	$\pm 3,5$	$\pm 3,4$
нелінійність вимірювальної схеми менш, %	$\pm 1,0$	$\pm 0,8$

Для застосування біотехнічного комплексу кондуктометричної апаратури у біо-

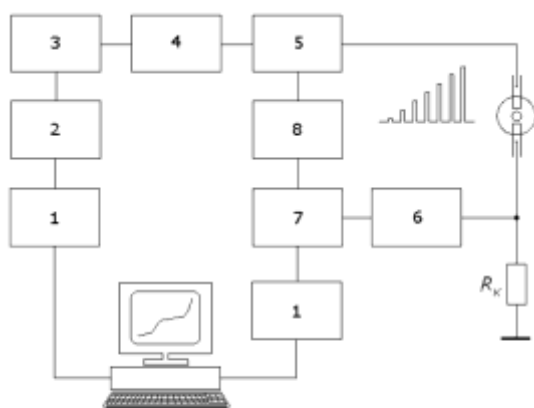


Рис. 21 Блок-схема автоматизованого комплексу апаратури імпульсної кондуктометрії

технологічних процесах, що використовують електроманіпуляції з клітинами, зокрема, у репродукції тварин, спроектовано автоматизований варіант на сучасній елементній базі. Блок-схема автоматизованого комплексу показана на (рис. 21). Схема містить блоки: USB-інтерфейс 1, мікроконтролер 2, цифро-аналоговий перетворювач (ЦАП) 3, узгоджувачий блок 4, високовольтний підсилювач потужності 5, попередній підсилювач 6, двоканальний аналого-цифровий перетворювач (АЦП) 7, підсилювач-атенуатор 8 та IBM-сумісну ПЕОМ. Блоки живляться від стабілізованого джерела +3 В та +150 В ($\pm 0,1\%$). Блоки 1-5 утворюють автоматичний ГПП із зростаючою амплітудою, що керується програмно через USB інтерфейс. Параметри імпульсів задаються оператором ПЕОМ і передаються в мікроконтролер генератора, що керує ЦАП-ом, який дозовано змінює струм вихідного блоку 5, що видає серію прямокутних імпульсів зростаючої напруги. Можливе збереження в постійній пам'яті мікроконтролера параметрів імпульсу, які використовуються в генераторі "за умовчанням". Відцифровані за допомогою АЦП первинні напруги, (рис. 20), записуються в окремий текстовий файл, який оброблюється прикладною програмою згідно розробленого алгоритму та в результаті на монітор виводиться графік у координатах провідність-напруженість.

У цьому розділі приведені: загальні характеристики об'єктів дослідження провідності - репродуктивних клітин (ооцитів), ранніх ембріонів, рідких середовищ; експериментальні дані з розробки апаратури та дослідження діелектрофорезу; одержані і проаналізовані закономірності зміни параметрів провідності клітин під впливом основних зовнішніх факторів середовища (температура, осмотична концентрація) і ІЕП (напруженість поля); наведено рекомендації щодо методики та приклади застосування біотехнічного комплексу кондуктометричної апаратури для електроманіпуляції у біотехнологічних процесах.

Явище позитивного діелектрофорезу використано для експериментального дослідження розподілу силових ліній поля між мікроелектродами кондуктометричної комірки змінної геометрії, (рис. 22). Генератор високочастотного меандру (ГВЧМ)

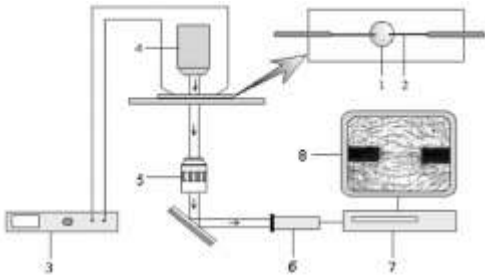


Рис. 22 Схема установки для діелектрофорезу: 1 - крапля з клітинами, 2 - МЕ, 3 - ГВЧМ, 4, 5 - мікроскоп, 6 - відеокамера, 7 - відеомагнітофон, 8 - монітор

забезпечує ВЧ неоднорідне поле так, щоб клітини-маркери пересувалися уздовж силових ліній для зближення у ланцюги. Розроблено ГВЧМ, потужністю 300 мВт, достатньою для діелектрофорезу в краплі непровідного середовища з еритроцитами. Теоретично обґрунтовані технічні характеристики ГВЧМ: частота 40-820 кГц, амплітуда меандру ± 15 В (± 3 %). Мікроелектроди виготовлені декількох типів і конфігурацій. Як маркер, що візуалізує структуру поля, використані еритроцити свіжої крові лабораторних щурів. Необхідна концентрація суспензії еритроцитів на основі середовища 0,3 М маніту або сахарози (SIGMA) підібрана методом послідовних розведень, керуючись формулою (33) під контролем окуляр-мікрометра мікроскопа. Для вибудовування еритроцитів в ланцюжки на мікроелектроди подається напруга з ГВЧМ частотою 250-450 кГц, поступово збільшуючи амплітуду. Явище діелектрофорезу спостерігається, починаючи з 8-10 В, залежно від відстані між мікроелектродами і їх конфігурації. Розподіл еритроцитів уздовж силових ліній в процесі діелектрофорезу фіксувався на відеомагнітофон, з якого робилося відеозахоплення кадрів з подальшою обробкою на



Рис. 23 Візуалізовані силові лінії електричного поля (ланцюжки еритроцитів) між парою МЕ

комп'ютері. Отриманий розподіл силових ліній електричного поля між основними типами МЕ показано на (рис. 23), що експериментально підтверджує теоретичні дослідження еліпсоїдальної форми провідного

об'єму кондуктометричної комірки зі співвісних МЕ.

Схожість будови ооцитів і ранніх ембріонів всіх ссавців дозволяє розглянути їх основні елементи на прикладі ооцитів і 2-клітинних ембріонів миші. Після запліднення ооцита починається ембріональна стадія розвитку, перший етап дроблення – 2-клітинний ембріон, потім йде подвоєння кожної з клітин в геометричній прогресії. Ооцит та ембріон оточені зоною пелюцида (ЗП), (рис. 24). У ооцита і ембріона між ЗП і мембраною (М) є перивітеліновий простір (ПВП).

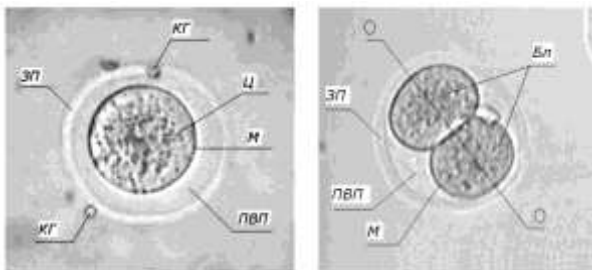


Рис. 24 Ооцит і 2-клітинний ембріон миші в середовищі сахарози 0,3М (x200)

Матеріал ЗП електрично не провідний, але добре проникний для води та іонів, тобто не впливає на провідність. Гелеподібна цитоплазма (Ц) клітини є провідником другого роду, оскільки містить дісоційовані іони солей 1- і 2-валентних металів. Мембрана оточує цитоплазму і є діелектриком. Будова ембріона миші на 2-клітинній стадії розвитку подібна будові ооцита, за винятком того, що об'єм бластомерів (Бл) менше і далі при дробленні об'єм цитоплазми, закладений в ооциті, майже не зміню-

ється до стадії 8-клітин. Об'єм ПВП у 2-клітинних ембріонів більше, ніж у ооцитів, що пов'язано з поверхнево-об'ємним відношенням (ПОВ) клітин. На прикладі 2-клітинного ембріона показана головна вісь симетрії, яка проходить по діаметрах бластомерів, перпендикулярно їх площині зіткнення, (рис. 24) (лінія ОО, є максимально ефективною для електропорації) тому вона повинна бути колінеарною вектору напруженості ІЕП.

У 2-клітинного ембріона бластомери стикаються частиною поверхні, яку умовно названо виключеною. Площа виключеної поверхні зменшується із зростанням осмотичної концентрації середовища за рахунок радіусу бластомера. Виключена поверхня знайдена напівемпіричним шляхом, вимірюючи окуляр-мікрометром довжину видимої в мікроскоп лінії l зіткнення бластомерів радіусу R і обчислюючи площу поверхні сферичного сегменту за формулами:

$$S_s = 2\pi R \left(R - \sqrt{R^2 - l^2/4} \right), \quad K = 1 - S_s/S_b, \quad S_a = S_b - S_s = K \cdot S_b, \quad (41)$$

де S_b - повна поверхня бластомера; S_s - виключена поверхня; S_a - активна доля поверхні бластомера; K - коефіцієнт корекції, що враховує доступну до середовища активну частку поверхні мембрани.

Розглянуті геометричні властивості виконують провідну роль в поясненні одержаних експериментальних результатів вимірювання провідності клітин і пробою мембрани в різних середовищах, табл.2.

Таблиця 2

Геометричні параметри ооцитів (о) і 2-клітинних ембріонів (е) миші в маніті з різною осмотичною концентрацією

C, моль	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4	0,5
$S_e, 10^2 \text{ мкм}^2$	3,02	2,23	1,74	1,11	0,74	0,51
$l, \text{ мкм}$	68,0	57,5	49,5	38,0	29,5	23,5
K	0,6	0,64	0,67	0,71	0,75	0,78
ПОВ _о	0,061	0,071	0,08	0,1	0,123	0,144
ПОВ _е	0,052	0,064	0,077	0,101	0,130	0,167

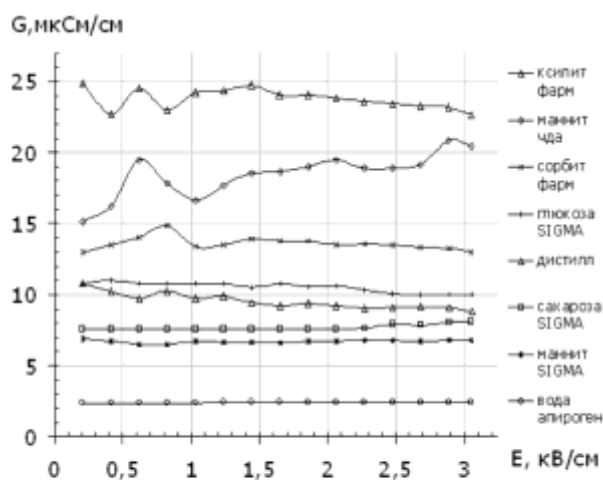


Рис. 25 Залежність провідності води і деяких діелектричних водних середовищ від напруженості ІЕП

Експериментальні дослідження виявили загальні вимоги до середовища для вимірювання провідності клітин: добрі діелектричні властивості, водна основа і нетоксичність для клітини. Цим умовам задовольняють водні розчини сахарози і маніту, провідність яких показана на (рис. 25). Найкращі діелектричні властивості має апірогенна деіонізована вода: $(2,41 \pm 0,04)$ мкСм/см при 20°C і не залежить від напруженості поля. На цій воді доцільно готувати середовища для вимірювання провідності клітин. На (рис. 25) приведені також графіки провідності розчи-

нів одних і тих же речовин різної хімічної кваліфікації, від різних виробників, тобто метод імпульсної кондуктометрії дозволяє проводити експрес-аналіз середовищ перед їх застосуванням.

Одними з основних фізико-хімічних параметрів середовища для клітин є температура та осмотична концентрація. Проведено дослідження дії на клітини зростаючого ІЕП в середовищі з різними параметрами. Таке дослідження має технологічні

перспективи щодо підвищення ефективності процесу електроліття.

Вплив температури і осмотичної концентрації середовища на клітину досліджено за характером провідності в ІЕП, а критерієм цього вибрано напруженість електропробою мембрани. Встановлено, що напруженість електропробою ооцитів із зростанням температури зменшується, причому, при 10 °С його не відбувається зовсім, (рис. 26). Це пояснюється тим, що мембрана клітини є рідкокристалічною структурою, ліпідні компоненти якої зазнають фазовий перехід між 10 і 17 °С і втрачають рухливість, тому електропробий неможливий навіть при максимальному значенні напруженості поля. Провідність 2-клітинних ембріонів має аналогічний характер залежності від температури, як і у ооцитів.

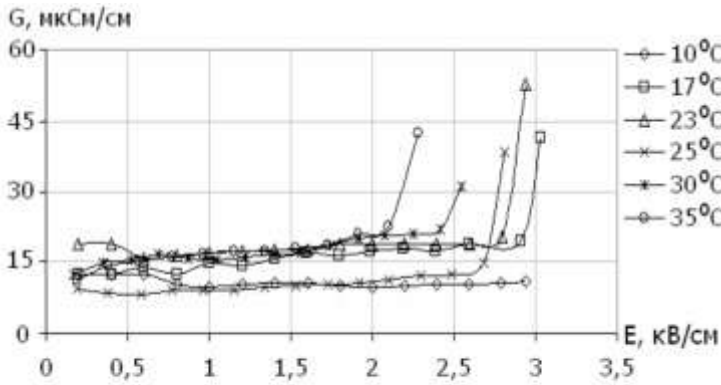


Рис. 26 Сімейство температурних залежностей провідності ооцитів в ІЕП в 0,3М маніті

ється тим, що мембрана клітини є рідкокристалічною структурою, ліпідні компоненти якої зазнають фазовий перехід між 10 і 17 °С і втрачають рухливість, тому електропробий неможливий навіть при максимальному значенні напруженості поля. Провідність 2-клітинних ембріонів має аналогічний характер залежності від температури, як і у ооцитів.

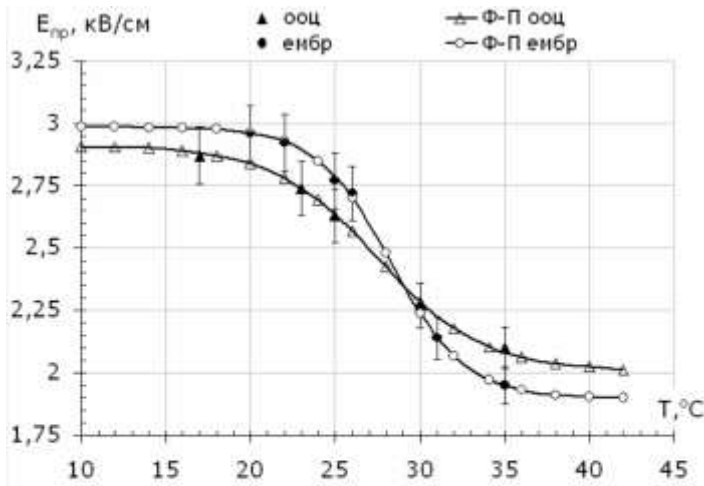


Рис. 27 Модельні функції Ферхюльста-Перла (білі точки) експериментальної температурної залежності напруженості електропробою ооцитів і 2-клітинних ембріонів (чорні точки)

За допомогою графоаналітичного методу шматково-лінійної апроксимації виконано моделювання одержаних сімейств температурних залежностей ооцитів і ембріонів та обчислені напруженості електропробою $E_{np}(T)$ мембрани клітин, (рис. 27). Отримані залежності $E_{np}(T)$, (рис. 27), дозволяють вибрати у якості моделі, логістичну функцію Ферхюльста-Перла:

$$E_{np} = a - b / \{1 + \exp[-c(T - d)]\}, \quad (42)$$

де a, b, c, d - параметри моделі, T - температура, E_{np} - напруженість пробою.

Модельні функції і експериментальні криві мають точку перегину і обмежені асимптотами, які фізично обґрунтовані тим, що при температурі нижче 15 °С мембрана "замерзає" і напруженість її пробою максимальна, а при температурі вище 40 °С настає тепла деструкція і напруженість пробою мінімальна. Параметри моделі зведені в табл. 3 (коефіцієнт детерміна-

ції $R^2=0,999$ - критерій згоди експеримент – модель).

Таблиця 3

Параметри логістичної моделі для ооцитів і 2-клітинних ембріонів

Параметр	Клітини	
	Ооцити	Ембріони
a	2,91	2,97
b	0,91	1,10
c	0,95	1,07
d	27,51	28,29

Математичний аналіз моделі (42), згідно необхідній умові наявності точки перегину, $d^2 E_{np}/dT^2=0$, дає формулу для обчислення температури:

$$T = [cd - \ln(c/2 - c)]/c, \quad (43)$$

Підстановкою у формулу (43) числових значень моделі з табл. 3 обчислені температури точок перегину функції (42) для ооцитів $T=27,6$ °С і ембріонів $T=28,2$ °С відповідно. Підвищена температура для ембріонів, швидше за все, пов'язана зі складом ліпідів і розподілом мікрівілі їх мембран.

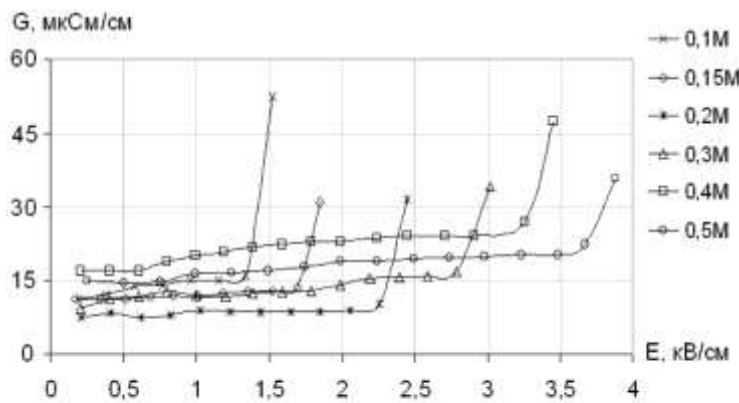


Рис. 28 Сімейство концентраційних залежностей провідності ооцитів в ІЕП

стискається за рахунок виходу води і ущільнення мікрівілі (розділ 3), викликаючи ефект “зміцнення” мембрани, що приводить до збільшення електричної міцності на пробіях.

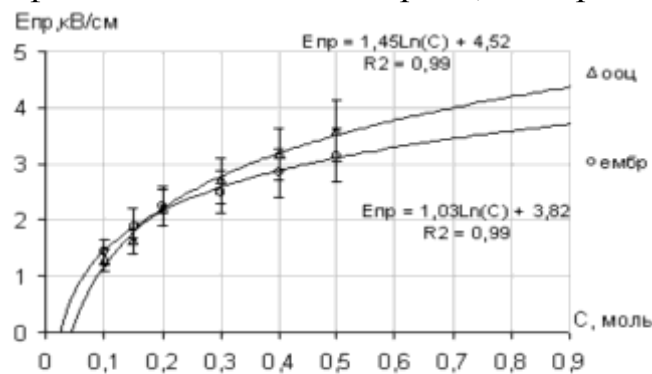


Рис. 29 Модельні функції (лінії) експериментальних концентраційних залежностей (білі точки з погрешностями) напруженості електропробою ооцитів і 2-клітинних ембріонів

Встановлено, що напруженість пробою ооцитів із зростанням концентрації маніту ($T=22$ °С) збільшується, (рис. 28). Це пояснюється тим, що в середовищі $C < 0,3$ М мікрівілі мембрани розправляються, об'єм клітини збільшується завдяки осмотичному тиску зсередини і, отже, механічна напруга мембрани росте, вона стає чутливішою до пошкоджень ІЕП. У розчині $C > 0,3$ М навпаки, осмотичний тиск зовні більше, клітина

має аналогічний характер залежності від концентрації, як і у ооцитів.

Математичний аналіз одержаних сімейств концентраційних залежностей ооцитів та ембріонів виконано за допомогою графоаналітичного методу шматково-лінійної апроксимації. Обчислені напруженості електропробою $E_{np}(C)$ мембрани клітин, (рис. 29). Отримана експериментальна залежність напруженості пробою мембрани клітин від осмотичної концен-

трації середовища допускає логарифмічну модель. Вона заснована на фізичному ефекті зміни ПОВ клітини W за рахунок розтягування-стиснення мікровілі мембрани клітини, схильної до впливу сил осмотичного тиску, а швидкість зміни величини W обернено пропорційна концентрації:

$$W = S/V \approx 2/R, \text{ швидкість: } dW/dC = 1/C, \quad (44)$$

де S – поверхня; V - об'єм; R - радіус сферичної клітини; C - осмотична концентрація розчину.

Рішення рівняння (44) дає логарифмічну функцію, а напруженість електропробою мембрани клітини обернено пропорційна радіусу, звідки слідує:

$$1/R = \ln C/2 + K \Rightarrow E_{np} = a \ln C + b, \quad (45)$$

де K , a , b - деякі константи.

Параметри логарифмічних моделей для ооцитів і ембріонів зведені в табл.4. ($R^2=0,997$ та $0,998$ відповідно).

Таблиця 4

Параметри логарифмічної моделі для ооцитів і ембріонів

Параметр	Клітини	
	Ооцити	Ембріони
a	1,45	1,03
b	4,52	3,82

Спільне рішення логарифмічних рівнянь для ооцитів і ембріонів з числовими параметрами, табл.4., дає точку перетину моделюючих функцій з координатами: $E_{np}=2,1$ кВ/см і $C=0,19$ М, що означає рівність провідних властивостей клітин за рахунок схожої геометричної структури мембран при певному укладанні мікровілі. Це витікає з рівності ПОВ цих клітин, (рис. 29). За допомогою моделі визначено, що при концентрації $C < 0,19$ М ембріони легше витримують гіпотонію, ніж ооцити, при $C > 0,19$ М - навпаки, ембріони більш уразливі. Екстраполяція моделюючих функцій до нульової напруженості електропробою дає концентрацію маніта $C=0,044$ М (для ооцитів) і $C=0,025$ М (для ембріонів), як рішення відповідних рівнянь: $1,45 \ln C + 4,52 = 0$ і $1,03 \ln C + 3,82 = 0$. Проте, отримання експериментальних даних при концентраціях менше $0,1$ М і більше $0,5$ М пов'язане з певними методичними труднощами. Побудована логарифмічна модель дозволяє передбачити поведінку клітин у відповідних середовищах, які можна застосувати у клітинних технологіях для керування транспортною функцією мембрани або спрощення процесів електроманіпуляції, які передбачають дозований вплив на мембрану при електропорації.



Рис.30 Розташування клітини між МЕ при вимірюванні провідності

Далі у розділі наведено рекомендації щодо застосування біотехнічного комплексу для електроманіпуляції з клітинами у біотехнологічних процесах. Для цього на предметне скло мікроскопа наносять краплю будь-якого, вживаного в клітинній біотехнології, середовища з клітиною. Занурюють в нього МЕ, розташовують між ними клітину, (рис. 30), та вимірюють первинні ве-

личини, (рис. 20). Обчислені значення питомої провідності наносять на графік залежно від напруженості ІЕП. Тобто застосування розробленого біотехнічного комплексу імпульсної кондуктометрії полягає у визначенні електропровідних властивостей клітин і середовищ за характером одержаних графічних залежностей питомої провідності від напруженості ІЕП.

Типові залежності провідностей ооцита та ембріона показані на (рис. 31). Керу-

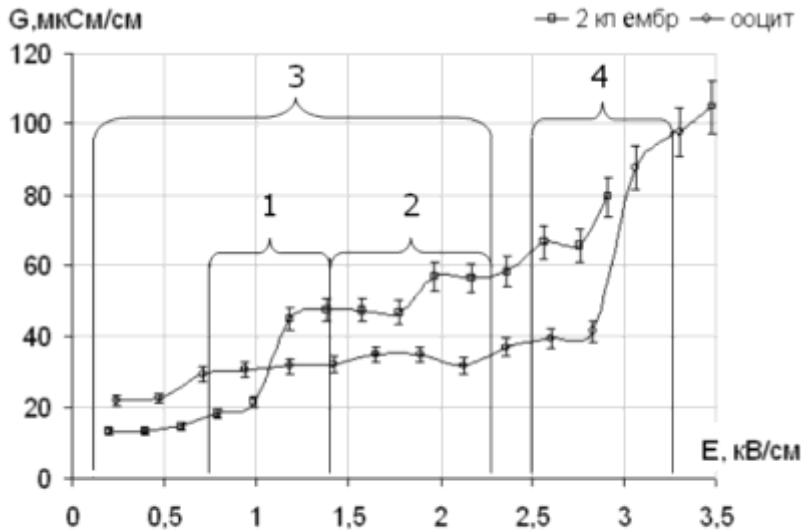


Рис. 31 Залежність провідності ооцита та ембріона з інтервалами напруженості, що відповідають основним режимам електроманіпуляції

ються характером цих кривих, на графіках виділені інтервали напруженості, які відповідають конкретним режимам електроманіпуляції: 1 - електрозлиття, 2 - стимуляція, 3 - зворотна електропорація, що об'єднує режими 1 і 2, 4 – необоротний електропробій.

Обираючи відповідну напруженість ІЕП, можна не тільки реалізувати будь-який з означених режимів, але й керувати процесами, знаходячись у зворотній області електропорації 3. При цьому мембрана клітини залишається повністю функціональною, що доводиться оборотністю її провідності у даному режимі.

Наведено приклади застосування біотехнічного комплексу імпульсної кондуктометрії для визначення питомої провідності 2-8 клітинних ембріонів мишей, ооцитів мишей, корови та кроля. Встановлено, що згідно побудованих нелінійних ЕМ ембріонів із зростанням кількості клітин провідність поступово зменшується за рахунок зростання числа міжклітинних зазорів і кількості мембран, що лежать на шляху проходження імпульсу струму через опори витоку мембран.

На основі теоретичних та експериментальних досліджень електропорації мембрани клітин за провідністю у зростаючому за напруженістю ІЕП з використанням розроблених для цього автоматизованих апаратних засобів імпульсної кондуктометрії проведено декілька електроманіпуляцій та отримано: стимульовані ооцити миші та корови, модельні біооб'єкти з 2-клітинних ембріонів миші та реконструйовані ембріони великої рогатої худоби, партеногенетичні ембріони з ооцитів та химерні ембріони з бластоцист миші.

Таким чином, експериментально підтверджені побудовані математичні та електричні моделі і показана можливість застосування розробленої біотехнічної апаратури імпульсної кондуктометрії до електроманіпуляції з клітинами різних видів тварин, зокрема, у процесах репродуктивної сільськогосподарської біотехнології.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової проблеми визначення електричних параметрів клітин тварин на основі комплексу імпульсної кондуктометрії у змінному за напруженістю електричному полі. Одержані результати дозволяють підвищити ефективність методів електроманіпуляції для відтворення в тваринництві, а також у репродуктивній біотехнології та біомедицині.

1. В аналітичному огляді науково-технічної і патентної літератури встановлено, що серед численних фундаментальних досліджень і прикладних розробок відсутня теоретична база, апаратні і методичні засоби, необхідні для узагальнення на єдиній основі моделей, методів і застосувань електропорації мембрани одиночної клітини, як цілісного біооб'єкту. Тому в роботі розв'язана проблема створення загальної концепції, теоретичної бази, моделей і методів біотехнічного комплексу кондуктометрії клітин в імпульсному електричному полі змінної напруженості, на основі яких обґрунтовані і визначені режими електроманіпуляції з клітинами тварин для застосування в різних біотехнологічних процесах.

2. Теоретично обґрунтовано процес імпульсної кондуктометрії з використанням концептуальних моделей провідності клітини в ІЕП змінної напруженості. Для цього побудовані: електролітична модель провідності цитоплазми; електричні моделі провідності одно- та багатоклітинних біооб'єктів на еквівалентних RC -ланцюгах; модель вірогідності електропорації мембрани з лавиноподібним зростанням середнього радіусу електропір при перевищенні його критичного значення; геометрична модель мембрани клітини з мікрівілі у зв'язку з провідністю в середовищах з різною осмотичною концентрацією.

3. Розроблено принцип побудови кондуктометричної комірки зі змінною геометрією співвісних мікроелектродів для одиночних клітин тварин. Аналітично визначена функція апаратного геометричного параметру комірки на основі візуалізації структури електричного ВЧ поля в провідному об'ємі міжелектродного простору, для чого встановлені параметри та використано явище діелектрофорезу еритроцитів в діапазоні частоти 0,1-1 МГц при оптимальній концентрації 3-4 %.

4. Для узагальнення результатів досліджень електропорації мембрани живої клітини, що знаходиться в різних фізико-хімічних умовах рідкого середовища, розроблені графоаналітичні методи математичного аналізу експериментальної функції провідності клітини від напруженості ІЕП шляхом шматково-лінійної і поліноміальної апроксимацій. З використанням цих методів встановлені напруженість поля і провідність клітини для оборотної електропорації мембрани та/або її необоротного електропробу, який, зокрема, для ооцитів миші при 25 °С відбувається при $E_{25}=2,67$ кВ/см і $G_{25}\approx 25$ мкСм/см відповідно.

5. Вперше теоретично обґрунтований і реалізований біотехнічний комплекс імпульсної кондуктометрії для визначення питомої провідності клітин тварин різних видів в рідких середовищах різної природи і фізико-хімічного стану під дією ІЕП змінної напруженості. Показано, що для кондуктометрії клітин і середовищ необхідно використовувати імпульсний генератор з основними технічними характерис-

тиками: зростаюча амплітуда прямокутного імпульсу напруги 0-100 В ($\pm 0,1$ %), максимальна вихідна потужність 200 Вт (50 Ом), тривалість імпульсу 60 мкс, тривалість фронту не більш 115 нс (при 100 В), період слідування не менш 10 с.

6. Метрологічно атестований технічний засіб імпульсної кондуктометрії клітин тварин і рідких середовищ для визначення провідності в діапазоні $0,01-2 \cdot 10^3$ мкСм з основною відносною інструментальною погрішністю $\pm 3,5$ % і нелінійністю менше 1 %, що дає змогу підвищити достовірність діагностування клітин тварин за провідністю для електроманіпуляції в різних біотехнологічних процесах.

7. На основі теоретичних і експериментальних досліджень питомої провідності ооцитів та ембріонів встановлено, що для реалізації режиму оборотної електропорації мембрани клітин тварин необхідно використовувати інтервал напруженості імпульсного поля 0,2-2 кВ/см, а для необоротного електропробою, - 2,5-5 кВ/см в діапазоні провідності клітини 10-300 мкСм/см.

8. З використанням графоаналітичних методів і моделей та експериментальних значень провідності ооцитів і 2-клітинних ембріонів миші, що знаходяться в середовищі маніту при температурі 10-35 °С або осмотичній концентрації 0,1-0,5 М, встановлено, що напруженість необоротного електропробою мембрани підкоряється логістичній залежності від температури і логарифмічній - від концентрації. В першому випадку це пояснюється процесами виникнення і репарації електропір, рівновага яких досягається в точках перегину при $T=27,5$ °С і $T=28,2$ °С відповідно, у другому - зміною поверхнево-об'ємних відношень клітин за рахунок щільності укладання мікровілі мембрани, причому, рівність їх значень для обох видів клітин досягається при $C=0,19$ М.

9. Встановлені основні технічні вимоги, принципи і практичні рекомендації, на основі яких створено автоматизований біотехнічний комплекс імпульсної кондуктометрії на базі керованого мікроконтролером генератора з параметрами: серія прямокутних імпульсів напруги із зростаючою амплітудою в діапазоні 0,1-100 В, дискретністю 0,1 В (400 Вт, навантаження 50 Ом); кількість в серії 1-25; тривалість в діапазоні 2-300 мкс, дискретністю 2 мкс; період повторення усередині серії в діапазоні 1-20 с, дискретністю 1 с. Комплекс можна застосувати для реалізації різних процесів електроманіпуляції: електрозлиття, стимуляції, оборотного і необоротного електропробоїв і т.п., режими яких визначаються за параметрами провідності клітини в ІЕП.

10. В результаті застосування біотехнічного комплексу імпульсної кондуктометрії встановлені параметри електропробою і електропорації, які використовуються, як адекватні критерії впливу на мембрану і клітину напруженості ІЕП та факторів середовища при визначенні видової специфічності провідності і міцності мембрани клітин тварин різних видів, що необхідно для реалізації різних методів електроманіпуляції з живими клітинами в біомедицині і репродуктивній біотехнології.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Шигимага В.О. Апаратура для електрозлиття та вивчення провідності клітин / В.О. Шигимага // Вісник ХДТУСГ.– Харків.– 2001.– Вип.6.– С. 386-389.

2. Шигимага В.А. Концепция развития аппаратуры в технологии реконструкции клеток животных методом электрослияния / В.А. Шигимага // Вісник ХДТУСГ. - Харків.- 2003.- Вип. 19.- Т. 2.- С. 118-123.
3. Шигимага В.А. Определение проводимости эмбриональных клеток животных / В.А. Шигимага // Проблемы бионики.- Харьков.- 2003.- Вып. 59.- С. 60-64.
4. Шигимага В.А. Прямой ввод в компьютер сигналов датчиков / В.А. Шигимага, И.В. Пинигин // Вісник ХДТУСГ.- Харків.- 2005.- Вип. 37.- Т. 2.- С. 202-206.
5. Шигимага В.А. Опыт разработки аппаратуры и технологии электроманипуляции с клетками животных / В.А. Шигимага // Електрифікація та автоматизація сільського госп-ва.- Київ.- 2007.- № 1(20).- С. 53-63.
6. Шигимага В.А. Графоаналитические методы определения параметров необратимого импульсного пробоя мембраны клетки (часть 1) / В.А. Шигимага // Бионика интеллекта.- Харьков.- 2007.- Вып. 2(67) .- С. 84-87.
7. Шигимага В.А. Графоаналитические методы определения параметров необратимого импульсного пробоя мембраны клетки (часть 2) / В.А.Шигимага // Бионика интеллекта.- Харьков.- 2008.- Вып. 1(68) .- С. 117-123.
8. Шигимага В.А. Форм-фактор кондуктометрической ячейки с изменяемой геометрией / В.А. Шигимага // Восточно-европейский журнал передовых технологий.- Харьков.- 2010.- № 6/5 (48) .- С. 45-48.
9. Шигимага В.А. Кондуктометрия клеток животных в средах с произвольной проводимостью / В.А. Шигимага // Вестник НТУ "ХПИ" Сб. трудов "Новые решения в современных технологиях".- Харьков: НТУ (ХПИ), 2010.- № 57.- С. 100-104.
10. Шигимага В.А. Исследование проводимости клеток при изменении осмотической концентрации среды / В.А. Шигимага, Ю.Е. Мегель // Восточно-европейский журнал передовых технологий.- Харьков.- 2011.- № 2/5(50) .- С. 53-55.
11. Шигимага В.А. Метод определения проводимости ооцитов и эмбрионов в различных условиях диэлектрической среды / В.А. Шигимага, Ю.Е. Мегель // Вестник НТУ "ХПИ" //Сб. трудов "Новые решения в современных технологиях".- Харьков:НТУ (ХПИ), 2011.- № 9.- С. 140-144.
12. Шигимага В.А. Применение метода импульсной кондуктометрии для исследования электрических характеристик биологических клеток / В.А. Шигимага, Ю.Е. Мегель // Праці Інституту електродинаміки НАНУ.- Київ.- 2012.- Вип. 31.- С. 147-155.
13. Shigimaga V.A. Impulse conductometer for biological cells and liquid media / V.A. Shigimaga // Measurement Techniques.- N.Y.: Springer New York, LCC, 2013.- V. 55.- N 11.- P.1294-1300.
14. Шигимага В.А. Математическое моделирование мембраны в связи с проводимостью клетки в различных рас творах / В.А. Шигимага, Д.А. Левкин, Ю.Е. Мегель // Восточно-европейский журнал передовых технологий.- Харьков.- 2012.- № 4/4(58) .- С. 32-35.
15. Шигимага В.А. Физико-математические модели импульсного пробоя мембраны клеток в различных рас творах / В.А. Шигимага // Технологический аудит и резервы производства // Научный журнал.- Харьков: Технологический центр, 2012.- № 3/1 (5) .- С. 3-4.

16. Колесникова А.А. Влияние стимуляции созревания на электропроводность и оплодотворяемость ооцитов мыши / А.А. Колесникова, В.А. Шигимага, Е.И. Смольянинова // *Фундаментальные исследования.*– Пенза.– 2013.– № 4.– ч. 4.– С. 896-899.
17. Strikha O.A. The effect of ovary hormone stimulation on mouse oocyte and early embryo electric conductivity / O.A. Strikha, E.I. Smolyaninova, E.O. Gordienko, V.A. Shigimaga, A.A. Kolesnikova // 8-th EBSA European Biophysics Congress.-Budapest, Hungary. 23-27.08.11 / *Eur. Biophys. J.*– 2011.– V. 40.– P. 240.
18. Шигимага В.А. Измерение электропроводности биологических клеток методом импульсной кондуктометрии / В.А. Шигимага, Ю.Е. Мегель, А.И. Рыбалка, И.И. Калиманова // *Proceedings 22th National scientific symposium “Metrology and metrology assurance 2012”* 10-14.09.12, Sozopol, Bulgaria.– 2012.– P. 212-218.
19. Шигимага В.А. Импульсная кондуктометрия одиночных клеток животных / В.А. Шигимага // *Проблемы фундаментальных и прикладных естественных и технических наук в современном информационном обществе: Труды 55-й Всеросс. научн. конф. МФТИ-55.*– М.: МФТИ, 2012.– С. 30-31.
20. Шигимага В.А. Метод и аппаратура импульсной кондуктометрии одиночных клеток животных и жидких сред / В.А. Шигимага // *Актуальн. вопр. биофизики и химии: мат. VII межд. н.-тех. конф., СевНТУ.*– Севастополь, 2011.– С. 25-26.
21. Шигимага В.А. Нелинейная электрическая модель проводимости биологической клетки / В.А. Шигимага // *Технічна електродинаміка.*– Київ.– 2013.– № 6.– С. 30-35.
22. Megely Y.E. Measuring and modeling assessments conductivity cell / Y.E. Megely, V.A. Shigimaga, D.A. Levkin, I.I. Kalimanova, A.I. Rubalka // *Proceedings 23th National scientific symposium “Metrology and metrology assurance 2013”* 9-13.09.13, Sozopol, Bulgaria.– 2013.– P. 260-267.
23. Шигимага В.А., Мегель Ю.Е. Линейные электротехнические модели проводимости биологической клетки / В.А. Шигимага, Ю.Е. Мегель // *Вісник ХНТУСГ.*– Харків.– 2013.– Вип. 141.– С. 126-127.
24. Пат. № 20187 Україна, МПК G01N 27/06, G01R 27/22. Спосіб визначення провідності рідких середовищ / Шигимага В.О.; заявник та патентовласник Інститут тваринництва.– № u200607704; заявл. 10.07.06, опубл. 15.01.07. Бюл. № 1.
25. Пат. № 22334 Україна, МПК G01R 27/22. Імпульсний кондуктометр для рідин / Шигимага В.О., Лісін В.І.; заявник та патентовласник Інститут тваринництва.– № u200610922; заявл. 16.10.06; опубл. 25.04.07. Бюл. № 5.
26. Пат. № 26158 Україна, МПК B24B 3/00, 7/20. Спосіб заточення торців ізольованих склом металевих мікроелектродів / Шигимага В.О., Пінігін І.В.; заявник та патентовласник Інститут тваринництва.– № u200703566; заявл. 02.04.07; опубл. 10.09.07. Бюл. № 14.
27. Шигимага В.А. Визуализация электрического поля между микроэлектродами различной геометрии посредством диэлектрофореза эритроцитов / В.А. Шигимага, И.В. Пинигин // *Збірн. наук. праць ЛНАУ.*– Луганськ.– 2007.– № 75(98) .– С. 34-40.
28. Шигимага В.О. Эффект імпульсної стимуляції розвитку ОКК миші *in vitro* / В.О. Шигимага, А.О. Колеснікова // *Наук. вісник Львів. нац. ун-т вет. медицини та біотехнологій ім. Гжицького.*– Львів.– 2005.– Т. 7.– № 4(27,ч2).– С. 172-176.

29. Шигимага В.О. Енергетика електрозлиття як методу реконструкції клітин / В.О. Шигимага // Наук. техн. бюл. ІТ УААН.– Харків.– 1998.– № 75.– С. 201-204.
30. Шигимага В.О. Електрозлиття двоклітинних ембріонів миші у провідному розчині PBS / В.О. Шигимага // Біологія тварин.– Львів.– 2005.– Т. 7.– № 1-2.– С. 264-267.
31. Колеснікова А.О. Імпульсна стимуляція розвитку ооцитів ссавців *in vitro* / А.О. Колеснікова, В.О. Шигимага // Наук.-техн. бюл. ІБТ УААН.– Львів.– 2006.– Т. 7.– № 3-4.– С. 228-232.
32. Шигимага В.О. Оцінка ефективності розробленої апаратури для електрозлиття клітин тварин / В.О. Шигимага, І.В. Пінігін // Наук.-техн. бюл. ІТ УААН.– Харків.– 2006.– № 94.– С. 451-453.
33. Колесникова А.А. Оценка стимулирующего влияния импульсного поля и фетальной сыворотки теленка на развитие ооцит-кумулюсных комплексов / А.А. Колесникова, В.А. Шигимага // Наук.-техн. бюл. ІТ УААН.– Харків.– 2008.– № 96.– С. 199-205.
34. Смольянінова Є.І. Вплив гормональної стимуляції на морфологічні та електричні параметри ооцитів миші / Є.І. Смольянінова, А.О. Колеснікова, В.О. Шигимага // Біологія тварин.– Львів.– 2009.– Т. 11.– № 1-2.– С. 328-337.
35. Шигимага В.А. Измерение удельной электропроводности натурального мёда / В.А. Шигимага, Л.М. Колбина // Наук.-техн. бюл. ІТ УААН.– Харьков.– 2009.– № 100.– С. 509-514.
36. Шигимага В.А. Динамика электрослияния бластомеров двухклеточного эмбриона мыши / В.А. Шигимага // Вісник ХНУ. Сер.: Біологія.– Харків.– 2005.– № 709.– Вип. 1-2.– С. 13-17.
37. Смольянінова Є.І. Вплив гормональної стимуляції яєчників та стадії розвитку на електричну провідність ранніх ембріонів миші/ Є.І. Смольянінова, О.А.Стріха, В.О. Шигимага, А.О. Колеснікова, Є.О. Гордієнко // *Biotechnologia Acta*.– Київ.– 2013.– Т. 6.-N 1.– С. 105-112.
38. Пат. № 24210 Україна, МПК G01N 33/483, G01R 27/22. Спосіб визначення параметрів електропробою клітинної мембрани / Шигимага В.О.; заявник та патентовласник Інститут тваринництва.– № u200700597; заявл.22.01.07; опубл. 25.06.07. Бюл. № 9.
39. Пат. № 30272 Україна, МПК G01N 33/483, G01R 27/22. Спосіб визначення параметрів електропробою мембрани клітини за кривизною провідності / Шигимага В.О.; заявник та патентовласник Інститут тваринництва.– № u200709254; заявл. 13.08.07; опубл. 25.02.08. Бюл. № 4.
40. Пат. № 19077 Україна, МПК C12N 5/00, C12N 13/00. Спосіб активації розвитку *in vitro* ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК) ссавців / Колеснікова А.О., Шигимага В.О.; заявник та патентовласник Інститут тваринництва.– № a200602084; заявл. 27.02.06; опубл. 15.12.06. Бюл. № 12.
41. Пат. № 34333 Україна, МПК G01N 33/483. Спосіб визначення стійкості мембрани поодинокі клітини у розчині кріопротектора / Шигимага В.О., Смольянінова Є.І.; заявник та патентовласник Інститут кріобіології та кріомедицини.– №

- u200802374; заявл.25.02.08; опубл. 11.08.08. Бюл. № 15.
42. Пат. № 38223 Україна, МПК G01N 33/48. Спосіб визначення ефективності стимуляції розвитку ооцит-кумулюсних комплексів / Колесникова А.О., Шигимага В.О., Погорелов О.С., Смольянинова Є.І.; заявник та патентовласник Інститут тваринництва.– № u200810141; заявл.6.08.08; опубл. 25.12.08. Бюл. № 24.
43. Пат. № 31923 Україна, МПК G01N 27/00, G01N 27/22. Диференціальний імпульсний кондуктометр для клітин тварин / Шигимага В.О.; заявник та патентовласник Інститут тваринництва.– № u200714451; заявл.21.12.07; опубл.25.04.08. Бюл. № 8.
44. Шигимага В.А. Технологические параметры электрослияния и жизнеспособность реконструированных эмбрионов коровы / В.А. Шигимага // Зб.мат. II Міжнар. конф. "Викор. сучасн. мол.-ген. і біотехнол. розробок у ген.-селекц. досл.".– Київ.– 1998.– С. 133-135.
45. Шигимага В.А. Энергетический аспект электрослияния в технологии реконструкции клеток / В.А. Шигимага // Мат. VI-й междунар. науч конф. "Соврем. достиж. и проблемы биотехнологии с-х животных" ВИЖ.– Дубровицы.– 2006.– С. 206-207.
46. Смольянинова Е.И. Влияние криопротекторов на электрическую проводимость ооцитов мыши. Биофизика живой клетки / Е.И. Смольянинова, В.А. Шигимага, Е.А. Гордиенко // Мат. конф. "Криоконсервация, как способ сохр. генет. ресурсов".– Пушино.– 2008.– Т. 9.– С. 124.
47. Смольянинова Е.И. Влияние проникающих криопротекторов на осмотическую устойчивость и электрические параметры ооцитов мыши / Е.И. Смольянинова, Е.В. Давыдова Е.Г. Лисина, А.А. Колесникова, В.А. Шигимага, Е.А. Гордиенко // Проблемы криобиологии и криомедицины.– Харьков.– 2008.– Т. 18.– № 2.– С. 175.
48. Смольянинова Е.И. Влияние гормональной стимуляции яичников на удельную электропроводность ооцитов лабораторных мышей / Е.И. Смольянинова, А.А. Колесникова, О.А. Стриха, В.А. Шигимага // Актуальн. вопр. биофизики и химии: мат.VII междунар. науч.-техн. конф., СевНТУ.– Севастополь, 2011.– С. 37-38.
49. Smolyaninova E.I. Effect of Cryopreservation Stages by Vitrification in Ethylene Glycol and Sucrose Medium on 2-Cell Murine Embryos Electric Conductivity / E.I. Smolyaninova, V.A. Shigimaga, O.A. Strikha, L.I. Popivnenko, E.G. Lisina // Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – V. 23.– N. 3.– P. 228–239.

Аннотация

Шигимага В.А. Биотехнический комплекс импульсной кондуктометрии и электроманипуляции с клетками животных.- Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности 05.11.17 – биологические и медицинские приборы и системы. – Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенко, Харьков, 2014 г.

В работе решена проблема создания общей концепции, теоретических основ, моделей, методов для биотехнического комплекса кондуктометрии клеток в импульсном электрическом поле (ИЭП) изменяемой напряженности, с помощью которых

обоснованы и определены режимы электроманипуляции с клетками животных для применения в различных биотехнологических процессах.

Представлен научно-исторический аспект мирового развития методов электроманипуляции, выполнен аналитический обзор литературы по основным направлениям, которые касаются темы диссертации: теоретическое моделирование, экспериментальные данные и современные представления о биофизических механизмах электропорации искусственных липидных бислоев и мембран биологических клеток, поскольку это явление лежит в основе разработанного метода импульсной кондуктометрии; методы и аппаратура современной кондуктометрии и ее значение для отраслей промышленности и научных исследований в биологии; биомедицинские и технические приложения электропорации; состояние парков серийной специализированной для электроманипуляций с клетками животных и измерительной аппаратуры; возможность применения диэлектрофореза для визуализации проводящего объема микроэлектродной кондуктометрической ячейки с изменяемой геометрией.

Рассмотрены общие физические принципы поляризации микрообъектов в электрическом поле; обоснована необходимость визуализации силовых линий поля для расчета аппаратного параметра новой кондуктометрической ячейки с изменяемой геометрией; рассчитаны параметры диэлектрофореза - частота ВЧ поля и концентрация эритроцитов для оптимальной визуализации силовых линий; разработана установка для диэлектрофореза и получены визуализированные картины силовых линий поля между различными микроэлектродами.

Построены электрические модели клетки и ее структурных элементов в связи с действием ИЭП: электролитической проводимости цитоплазмы, как проводника второго рода; проводимости ооцита и 2-16-клеточных эмбрионов в виде эквивалентных линейной и нелинейной электрических RC -цепей; геометрическая модель микровилли мембраны клетки в связи с проводимостью в различных растворах; физико-математическая модель проводимости клетки, построенная на основе вероятности образования электропор в мембране.

В работе приведены: результаты разработки измерительной схемы с обоснованием и расчетом электрических характеристик импульсного кондуктометра; теоретическое обоснование функции аппаратного параметра безкорпусной микроэлектродной кондуктометрической ячейки с изменяемой геометрией; методика измерений проводимости клеток и жидких сред; исследование метрологических характеристик и аттестация импульсного кондуктометра, а также рекомендации по применению методики и результаты измерения удельной проводимости клеток и жидких сред.

Разработан автоматизированный биотехнический комплекс аппаратуры импульсной кондуктометрии на базе микроконтроллера, управляемого ПЭВМ. На модельных биообъектах (ооциты и 2-клеточные эмбрионы мыши) получены и проанализированы закономерности изменения параметров проводимости под воздействием основных внешних факторов жидкой среды (температура, осмотическая концентрация) и ИЭП (напряженность поля). Главный параметр ИЭП - напряженность – использован одновременно, как средство инициации проводимости и как критерий

влияния поля на клетку при электропорации и электропробое мембраны. С помощью разработанной автоматизированной аппаратуры импульсной кондуктометрии выполнено электрослияние различных клеток и получены реконструированные эмбрионы коровы, химерные и модельные эмбрионы мыши.

Ключевые слова: импульс, кондуктометрия, электроманипуляция, электропорация, проводимость, аппаратура, клетка, напряженность поля, жидкая среда.

Анотація

Шигимага В.О. Біотехнічний комплекс імпульсної кондуктометрії і електроманіпуляції з клітинами тварин. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора технічних наук за фахом 05.11.17 – біологічні та медичні прилади і системи. – Харківський національний технічний університет сільського господарства ім. П. Василенка. Харків, 2014 р.

В роботі розв'язана проблема створення загальної концепції, теоретичних основ, моделей, методів для біотехнічного комплексу кондуктометрії клітин тварин в імпульсному електричному полі (ІЕП) змінної напруженості, за допомогою яких обґрунтовані і визначені режими електроманіпуляції з клітинами тварин для застосовування в різних біотехнологічних процесах.

Розглянуті загальні фізичні принципи поляризації мікрооб'єктів в різних електричних полях, обґрунтована необхідність візуалізації силових ліній поля для розрахунку параметру нової кондуктометричної комірки із змінною геометрією, розраховані параметри діелектрофорезу - частота ВЧ поля і оптимальна концентрація еритроцитів для візуалізації силових ліній, розроблена установка для діелектрофорезу і одержані картини силових ліній поля між різними мікроелектродами.

Побудовані моделі клітини і її структурних елементів у зв'язку з дією ІЕП: електrolітичної провідності цитоплазми, як провідника другого роду; провідності ооцита і 2-16-клітинних ембріонів у вигляді еквівалентних лінійної і нелінійної електричних ланцюгів; геометрична модель мембрани клітини у зв'язку з провідністю в різних розчинах; фізико-математична модель провідності клітини, побудована на основі вірогідності утворення електропір в мембрані.

Приведені результати розробки вимірювальної схеми з розрахунком електричних характеристик імпульсного кондуктометра, методика вимірювань провідності з розрахунком апаратного параметру мікроелектродної комірки із змінною геометрією, метрологічна атестація розробленого вимірювального засобу.

На модельних біооб'єктах одержані і проаналізовані закономірності зміни параметрів провідності під впливом основних зовнішніх факторів рідкого середовища (температура, осмотична концентрація) і ІЕП (напруженість поля). Головний параметр ІЕП - напруженість - використаний одночасно, як засіб ініціації провідності і як критерій впливу поля на клітину при електропоратії і електропробі мембрани.

За допомогою розробленої автоматизованої апаратури імпульсної кондуктометрії виконано електрозлиття різних клітин та отримані реконструйовані ембріони корови, химерні і модельні ембріони миші.

Ключові слова: імпульс, кондуктометрія, електроманіпуляція, електропорація, провідність, апаратура, клітина, напруженість поля, рідке середовище.

Summary

Shigimaga V.A. Biotechnical complex for pulse conductometry and animal cells electromanipulations.- Manuscript.

Thesis for Doctor of Technical Science degree by specialty 05.11.17 - Biological and Medical Devices and Systems. Kharkiv National Technical University of Agriculture named Vasylenko P., Kharkiv, 2014.

The creation problem of general conception, theoretical bases, models, methods and biotechnical complex for animal cells conductometry in the pulse electric field (PEF) with varying strength is decided in dissertation, by which grounded and the modes of electro-manipulation with the animal cells for application in different biotechnological processes are certain.

The models of cell and its structural elements in connection with the PEF action are built: electrolytic conductivity of cytoplasm, as explorer of the second family; oocyte and 2-16-cellular embryos conductivity as equivalent linear and nonlinear electric schemes, which calculation is executed by the methods of radio engineering chains theory; geometrical model of cell membrane in connection with conductivity in different solutions; physics-mathematical model of cell conductivity, built on the basis of electro-pores formation probability in a membrane.

General physical principles of micro objects polarization in different electric fields are considered; the necessity of field force lines visualization the for the calculation device parameter of a new conduct metric cage with changeable geometry is grounded; the parameters of dielectrophoresis are expected is frequency of the HF field and erythrocytes concentration for optimum visualization of force lines; setting is developed for dielectrophoresis and the visualized pictures of force lines in the field between different microelectrodes are got.

The results of measuring scheme development with the calculation of electric descriptions of conductometer are resulted; method of conductivity measuring with the calculation of microelectrode cage new parameter with changeable geometry; research of metrological characteristics and attestation of pulse conductometer.

On bioobject model conformities to the law of change of conductivity parameters under act of basic external factors of liquid environment (temperature, osmotic concentration) and PEF are got and analyzed (field strength). The main parameter PEF is strength – used simultaneously, as mean of initiation of conductivity and as criterion of influencing of the field on a cell during electroporation and breakdown of membrane.

Keywords: pulse, conductometry, electromanipulations, electroporation, conductivity, device, cell, field strength, liquid media.

Відповідальний за випуск Левкін А. В.

Підп. до друку 23.05.2014 р. Комп'ютерний набір та
верстка Полянова Н. В. Формат паперу 60x84 1/16.

Папір офсетний. Умов. арк. 1,2. Тираж 100 пр.

Замовлення № 7

Різограф TR 1510 №80654645

Навчально-методичний відділ
Харківського національного технічного університету
сільського господарства імені Петра Василенка

Адреса редакції та поліграфпідприємства:
61002, м. Харків, вул. Артема, 44, кімн. 101.