

Д.А. Мальченко, В.М. Генералов, А.Г. Дурьманов, Т.С. Бакиров,
О.В. Фефелов, А.Н. Ситников

Измерение электрической емкости клеточной мембраны методом диэлектрофореза

НИИ аэробиологии ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово Новосибирской обл.

Поступила в редакцию 28.11.2002 г.

На основе эквивалентной электрической схемы клетки обосновано выражение для определения величины электрической емкости мембраны клетки и разработан бесконтактный метод ее измерения с помощью неоднородного переменного электрического поля. Суть метода заключается в нахождении равновесной частоты, являющейся граничной частотой между областью положительного и отрицательного диэлектрофореза клетки. В качестве исследуемых клеток использовали эритроциты человека. Проведенные измерения показали, что для интактных эритроцитов величина емкости мембраны C_m во всех используемых в эксперименте электролитов постоянна, равна $(2,4 \pm 0,5) \cdot 10^{-13}$ Ф и совпадает с данными, полученными другими методами. Проведенные измерения емкости мембраны эритроцитов человека в зависимости от концентрации парвовируса показывают, что величину электрической емкости мембраны можно использовать как количественную характеристику биологической активности клетки.

Введение

Известно что, в приземном слое атмосферы присутствует большое разнообразие жизнеспособных микроорганизмов [1]. Изучение состава и активности этих микроорганизмов биологическими методами требует больших материальных и временных затрат из-за их малой концентрации в атмосфере. Поэтому разработка физического метода, позволяющего по нескольким легко измеряемым параметрам идентифицировать клетку и определять ее биологическую активность, является актуальной задачей. В данной статье предложен один из таких параметров и разработан метод его измерения.

Литературные данные свидетельствуют о высокой чувствительности клеток к воздействию со стороны различных пассивных (кислот, щелочей) и активных (бактерий, вирусов) агентов внешней среды. Даже незначительная концентрация отдельных из них (вирусов, белков, токсинов) в состоянии вызвать быстрое и специфическое влияние на биологическую активность клетки и, как следствие, на широкий спектр ее электрофизических характеристик [2]. Одной из важных электрофизических характеристик клетки является мембранный потенциал, участвующий в регуляции внутриклеточных процессов и отражающий взаимодействие клетки с внешней средой. Величина мембранного потенциала связана с величиной электрической емкости мембраны. Таким образом, емкость мембраны является одним из параметров, который может быть использован в качестве количественной оценки биологической активности клетки. В связи с изложенным становится очевидной акту-

альность разработки бесконтактных методов измерения емкости мембраны.

Цель данной работы заключалась в разработке бесконтактного метода измерения электрической емкости мембраны отдельной клетки с помощью неоднородного переменного электрического поля.

В неоднородных переменных электрических полях (НПЭП) наблюдается движение биочастиц — клеток, бактерий, вирусов. Характер движения определяется типом электрического поля, свойствами биочастиц и среды, в которой находятся биочастицы. Поступательное движение биочастиц в НПЭП называется диэлектрофорезом (ДЭФ). Различают положительный и отрицательный диэлектрофорез. Положительный характеризуется поступательным движением клеток в сторону повышения градиента электрического поля, отрицательный — в сторону понижения.

Диэлектрофорез позволяет отделить биочастицы от частиц другой природы или интактные клетки от поврежденных [3]. В [4] описано применение ДЭФ для выделения различных типов раковых клеток из крови. Более того, чувствительность метода позволяет исследовать первые стадии вирус-клеточного взаимодействия [5].

В НПЭП клетку удобно представить как сложный электрофизический объект, составные элементы которой можно характеризовать электрическими параметрами. Поэтому явление ДЭФ можно описать с помощью эквивалентной электрической схемы клетки [6] (рис. 1).

Из анализа этой схемы получают следующие формулы для комплексного сопротивления клетки и среды:

$$Z_K(\omega) = Z_M(\omega) + Z_C(\omega) = \frac{R_M}{1 + i\omega R_M C_M} + \frac{R_C}{1 + i\omega R_C C_C}; \quad (1)$$

$$Z_3(\omega) = \frac{R_3}{1 + i\omega R_3 C_3},$$

где Z_K — комплексное сопротивление клетки; Z_M , R_M , C_M — комплексное сопротивление, активное сопротивление и емкость мембраны, Z_C , R_C , C_C — цитоплазмы, Z_3 , R_3 , C_3 — электролита; ω — циклическая частота НПЭП.

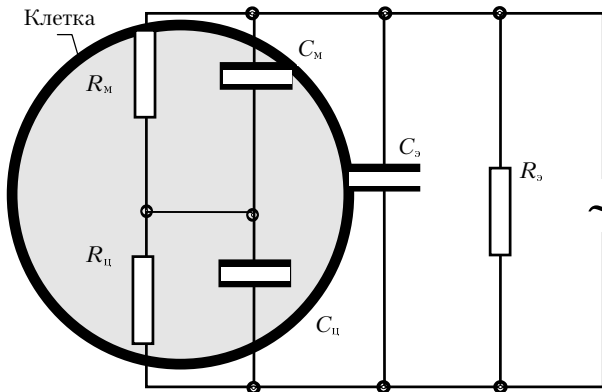


Рис. 1. Эквивалентная электрическая схема клетки

Очевидно, что при некоторой частоте ω_p реализуется следующая ситуация:

$$Z_K(\omega_p) = Z_3(\omega_p). \quad (2)$$

Частота ω_p называется равновесной. На этой частоте токи, протекающие через клетку и электролит, равны (рис. 2).

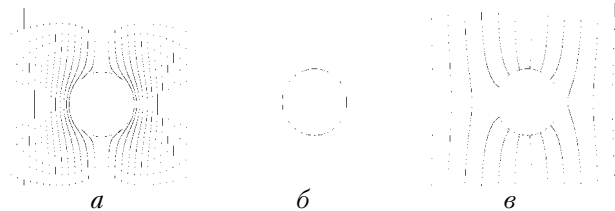


Рис. 2. Линии тока, протекающие через клетку и электролит на разных частотах (а — на низких частотах; б — на равновесной частоте; в — на высоких частотах)

Таким образом, клетка эквивалентна окружающему ее электролиту и потому диэлектрофорез на этой частоте отсутствует. Другими словами, равновесная частота является границей между областью частот, где наблюдается отрицательный ДЭФ, и областью частот, где он положительный.

Рабочая область частот ω для проведения ДЭФ лежит в пределах $\sim 10^5 \div 10^8$ Гц. В этой области для большинства клеток и электролитов верны неравенства:

$$\begin{aligned} Z_M &\gg Z_C; \\ \frac{1}{\omega C_M} &\gg R_M; \\ R_3 &\gg \frac{1}{\omega C_3}. \end{aligned} \quad (3)$$

С учетом этих неравенств выражение (2) переходит в следующее выражение:

$$\frac{1}{\omega_p C_M} = R_3. \quad (4)$$

Так как на равновесной частоте ток, протекающий через клетку, равен току, протекающему через электролит (см. рис. 2), то логично в качестве величины сопротивления электролита R_3 взять величину сопротивления, которое бы он имел в объеме, занятом клеткой. Другими словами:

$$R_3 = \rho_3 \frac{l_k}{S_k}, \quad (5)$$

где l_k — длина клетки вдоль оси, по которой ориентируется клетка в НПЭП; S_k — площадь сечения клетки поперек этой оси; ρ_3 — удельное сопротивление электролита. Из (4) и (5) получаем выражение для определения емкости мембраны

$$C_M = \frac{1}{\omega_p \rho_3} \frac{S_k}{l_k}. \quad (6)$$

Условия эксперимента

В целом условия проведения ДЭФ для измерения емкости мембраны повторяют уже известные аналогичные схемы проведения диэлектрофореза [3]. Однако при проведении измерений с электролитами с низким удельным сопротивлением необходимо учитывать два принципиальных момента.

Во-первых, на низких частотах наблюдается электролиз воды и минимальная частота, на которой электролиз еще отсутствует, тем выше, чем ниже удельное сопротивление. Поэтому поиск равновесной частоты лучше всего проводить, начиная с высоких частот (порядка $1 \div 5$ МГц) и спускаясь в сторону низких.

Во-вторых, с понижением удельной проводимости электролита, с одной стороны, увеличивается нагрев электродов, приводящий к возникновению конвективных вихрей, а с другой — уменьшается ДЭФ-сила. Поэтому необходимо регулировать подаваемое на электроды напряжение, добиваясь максимальной ДЭФ-силы, не допуская возникновения конвективных вихрей.

В качестве исследуемых клеток использовали эритроциты человека, полученные от донора. Эритроциты дважды отмывали от проводящих ингредиентов низкоскоростным центрифугированием в десятикратном объеме 5,5%-го раствора глюкозы. Удельное сопротивление раствора устанавливали добавлением необходимого количества NaCl. Измерения удельного сопротивления проводили с помощью измерителя LCR E7-11. Удельное сопротивление электролитов ρ менялось в пределах $1 \div 100$ Ом·м.

Для изучения влияния биологической активности клетки на емкость мембраны нами были выполнены эксперименты с эритроцитами, инфицированными

парвовирусом (CPV «Лайка» Л1040Х). Инфицирование клеток проводили по следующему алгоритму. В первой лунке планшета смешивали 100 мкл клеточной суспензии со 100 мкл вирусного раствора. Затем 100 мкл полученной смеси помещали во вторую лунку и снова смешивали со 100 мкл клеточной суспензии и т.д. Таким образом, концентрация вирусов в каждой последующей лунке отличалась от предыдущей лунки в 2 раза. Концентрацию вируса в первой лунке оценивали методом физического титра, она составила 1 вирус на клетку. Всего для эксперимента по этому алгоритму использовали 9 лунок.

Результаты и обсуждение

Проведенные измерения показали, что для интактных эритроцитов человека произведение $\omega_p r_p$ практически не изменялось во всех используемых в эксперименте электролитах и составляло $(2,5 \pm 0,1) \cdot 10^7$ Ом·м·с⁻¹. Этот факт подтверждает формулу (6) нахождения емкости мембраны клетки, так как емкость мембраны не должна зависеть от удельного сопротивления электролита. Таким образом, емкость мембраны эритроцитов человека составила $C_m = (2,4 \pm 0,5) \cdot 10^{-13}$ Ф, что совпало с данными, полученными другими методами.

Вклад в основную погрешность в определении емкости мембраны вносит измерение характерных длины l_k и площади S_k эритроцита. Поэтому погрешность измерения емкости мембраны составляет около 20%.

Проведены также измерения емкости мембраны и равновесной частоты эритроцитов человека в зависимости от концентрации парвовируса в растворе электролита с удельным сопротивлением 10 Ом·м. Результаты измерений представлены в таблице, из которой видно, что небольшая концентрация вируса (1 вирусная частица на 2⁸ клеток) приводит к изменению равновесной частоты. Однако изменение емкости мембраны не удается заметить из-за большой погрешности измерения. Но уже при концентрации одна вирусная частица на 2⁴ клеток емкость мембраны эритроцита падает в 2 раза. Таким образом, подтверждается предположение о том, что величину электрической емкости мембраны можно использо-

вать как количественную характеристику биологической активности клетки.

Электрическая емкость мембраны и равновесная частота эритроцитов человека в зависимости от концентрации вируса CPV «Лайка» Л1040Х

Концентрация вирусных частиц	Отсутствуют вирусные частицы	Одна вирусная частица		
		на 2 ⁸ клеток	на 2 ⁴ клеток	на одну клетку
Равновесная частота $\omega_p/2\pi$, МГц	0,39	0,40	0,82	1,55
Емкость мембраны, $\times 10^{-13}$ Ф	2,4	2,4	1,2	0,6

Таким образом, разработан бесконтактный метод измерения электрической емкости клеточной мембраны и обосновано использование ее величины как количественной характеристики биологической активности клетки. В дальнейшем планируется проверить разработанный метод на других клетках.

Работа частично поддержана Международным научно-техническим центром, грант № 1802.

1. Андреева И.С., Белан Б.Д., Бородулин А.И., Бурыяк Г.А., Жуков В.А., Панченко М.В., Пененко М.В., Петрищенко В.А., Сафатов А.С. Изучение изменчивости содержания живых микроорганизмов в атмосферном аэрозоле на юге Западной Сибири // Докл. РАН. 2001. Т. 381. № 2. С. 278–282.
2. Бакиров Т.С., Генералов В.М., Чепурнов А.А., Тюнников Г.И., Порываев В.Д. Анализ механизма деполаризации клеток на начальных стадиях вирус-клеточного взаимодействия // Докл. РАН. 1998. Т. 363. № 2. С. 258–259.
3. Бакиров Т.С., Генералов В.М., Топорков В.С. Изменение поляризации отдельной клетки в неоднородном переменном электрическом поле // Биотехнология. 1998. № 2. С. 73–82.
4. Cascoyne P.R.C., Wang X.-B., Huang Y., Becker F.F. Dielectrophoretic separation of cancer cells from blood // IEEE Transactions on Industry Appl. 1997. V. 33. N 3. P. 670–678.
5. Бакиров Т.С., Чепурнов А.А., Тюнников Г.И., Генералов В.М. Исследование изменений электрических характеристик эритроцитов гуся при адсорбции вируса краснухи // Биотехнология. 1997. № 4. С. 47–54.
6. Бакиров Т.С., Генералов В.М., Дурьманов А.Г., Порываев В.Д., Топорков В.С. Эквивалентная электрическая схема клетки // Биотехнология. 2000. № 2. С. 53–59.

D.A. Malchenko, V.M. Generalov, A.G. Durymanov, T.S. Bakirov, O.V. Fefelov, A.N. Sitnikov.
Measurement of cell membrane permittance by the method of dielectrophoresis.

Based on the equivalent electric circuit of a cell, the equation for determination of the cell membrane permittance has been justified and the method for noncontact permittance measurement with the use of an inhomogeneous alternating electric field has been developed. The method consists essentially in determination of the equilibrium frequency serving as a boundary between the zones of positive and negative cell dielectrophoresis. Human erythrocytes were used as cells to be examined. The measurements showed that for intact erythrocytes the membrane permittance C_m was constant in all the electrolytes used in the experiment and equal to $(2.4 \pm 0.5) \cdot 10^{-13}$ F, which was in a good agreement with the data obtained by other methods. The measurements of the membrane permittance of human erythrocytes depending on the parvovirus concentration demonstrated that the value of membrane permittance could be used as a quantitative characteristic of the biological activity of a cell.