

О.В. Фефелов, Т.С. Бакиров, В.М. Генералов, А.С. Сафатов

Двухчастотный метод измерения коэффициента поляризуемости клеток

НИИ аэриобиологии ГНЦ ВБ «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирская область

Поступила в редакцию 28.11.2001 г.

Частотная зависимость коэффициента поляризуемости клеток является характеристикой физиологического состояния клеток и может быть использована для их идентификации. В настоящее время для получения этой зависимости используется метод, которым измеряется скорость движения клеток в неоднородном переменном электрическом поле и затем рассчитывается коэффициент поляризуемости клетки. Погрешность измерения коэффициента поляризуемости клетки складывается из ошибок измерения ее скорости, величины электрического поля, коэффициента пропорциональности между скоростью и силой вязкого трения. Предлагаемый двухчастотный метод измерения коэффициента поляризуемости клетки свободен от этих погрешностей и обеспечивает более высокую точность измерений.

Введение

В последние годы для идентификации клеток широко используется метод диэлектрофореза [1]. Возможность измерения диэлектрических свойств клетки на основе изучения движения клеток в неоднородном переменном электрическом поле была показана в [2]. В настоящей статье описаны одно- и двухчастотный метод измерения коэффициента поляризуемости клеток, аппаратура и программное обеспечение для расчета электрических характеристик биологических частиц. Приведены результаты измерений поляризуемости эритроцитов двухчастотным методом.

Теория одночастотного и двухчастотного методов диэлектрофореза

Если поместить клетку в переменное электрическое поле, меняющееся по гармоническому закону, то у нее появится наведенный дипольный момент \mathbf{d} , который пропорционален напряженности электрического поля \mathbf{E} : $\mathbf{d} = \alpha \epsilon_0 \mathbf{E}$, где α – комплексный коэффициент поляризуемости клетки; ϵ_0 – диэлектрическая проницаемость вакуума. Если при этом электрическое поле неоднородно, то на клетку будет действовать сила [3]:

$$\mathbf{F} = \frac{1}{2} \text{grad} (\alpha \epsilon_0 E, E) \quad (1)$$

или, после усреднения по времени:

$$\langle \mathbf{F} \rangle = \frac{1}{4} \epsilon_0 \text{Re} [\alpha(\omega)] \text{grad} (E_0^2), \quad (2)$$

где E_0 – амплитуда электрического поля в точке нахождения клетки; ω – частота электрического поля; $\text{Re}[\alpha(\omega)]$ – реальная часть коэффициента поляризуемости

клетки. Под действием этой силы клетка начинает ускоряться, пока сила вязкого трения не уравновесит эту диэлектрофоретическую силу. Таким образом, если измерить скорость движения клетки, а также рассчитать электрическое поле в точке ее нахождения, то можно найти коэффициент поляризуемости клетки. Типичная зависимость коэффициента поляризуемости живой клетки изображена на рис. 1.

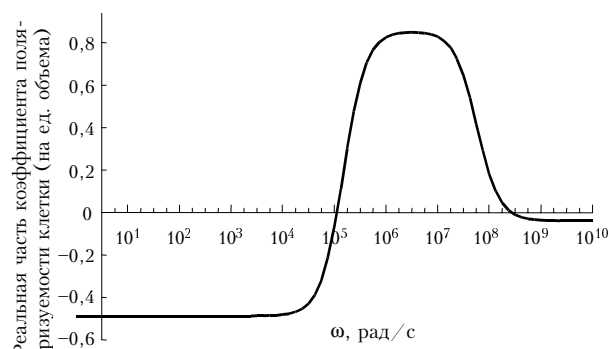


Рис. 1. Типичная для клеток зависимость реальной части коэффициента поляризуемости от частоты переменного электрического поля

На погрешность коэффициента поляризуемости клетки влияют как ошибка измерения ее скорости, так и неточность параметров, которые используются при расчете этой величины. К этим параметрам относятся: величина электрического поля, коэффициент пропорциональности между скоростью и силой вязкого трения. Если около клетки на расстоянии нескольких радиусов находятся другие клетки, то электрическое поле искажается, причем градиент, создаваемый такими клетками, может быть сравним или даже больше градиента электрического поля, создаваемого электродами. Клетки находятся вблизи поверхности стекла, потому что именно около электродов находятся

области с наибольшей напряженностью электрического поля. Это приводит к изменению силы вязкого трения. Необходимо также учитывать и форму клеток, так как некоторые клетки не являются сферическими.

Анализ измеренных зависимостей живых клеток показал, что существует диапазон частот (см. рис. 1), когда реальная часть коэффициента поляризуемости клетки $\text{Re}[\alpha(\omega)]$ больше нуля, т. е. клетка вытягивается в область с максимальной напряженностью электрического поля – так называемый положительный диэлектрофорез, и диапазон частот, когда реальная часть коэффициента поляризуемости меньше нуля, т.е. клетка выталкивается из области с высокой напряженностью электрического поля – отрицательный диэлектрофорез. Этот факт позволяет упростить процедуру измерения частотной зависимости коэффициента поляризуемости клетки.

Если на электроды подать напряжение, которое является суммой двух гармонических сигналов с амплитудами U_1 и U_2 и частотами ω_1 и ω_2 соответственно, то на клетку будет действовать сила

$$F_{2d} = K \{ \text{Re}[\alpha(\omega_1)] U_1^2 + \text{Re}[\alpha(\omega_2)] U_2^2 \}, \quad (3)$$

где K – коэффициент, зависящий только от геометрии электродов и положения клетки. Пусть частота ω_1 такая, что $\text{Re}[\alpha(\omega_1)] < 0$, а ω_2 такая, что $\text{Re}[\alpha(\omega_2)] > 0$. Подобрать амплитуды U_1 и U_2 , можно добиться того, что сила, действующая на клетку со стороны электрического поля, равна нулю. Это возможно, если выполняется условие

$$\frac{\text{Re}[\alpha(\omega_1)]}{\text{Re}[\alpha(\omega_2)]} = \frac{-U_2^2}{U_1^2}. \quad (4)$$

Измерив амплитуды напряжений, можно найти отношение реальных частей коэффициентов поляризуемости. Зафиксировав частоту ω_1 и изменив частоту ω_2 , можно получить зависимость коэффициента поляризуемости клетки в области частот положительного диэлектрофореза. Аналогично измеряется и зависимость коэффициента поляризуемости клетки в области частот отрицательного диэлектрофореза. Полученная зависимость будет безразмерной величиной. Для того чтобы получить размерную величину, необходимо измерить коэффициент поляризуемости клетки на одной из частот одночастотным методом.

Устройство лабораторной установки для измерения поляризуемости клеток

Разработана и изготовлена лабораторная установка для наблюдения за отдельными клетками и измерения их коэффициентов поляризуемости (рис. 2) в разных условиях [4–6]. Она состоит из микроскопа, видеокамеры, измерительной ячейки с электродами, на которые подается сумма напряжений от двух генераторов Г4-158, управляемых с помощью компьютера.

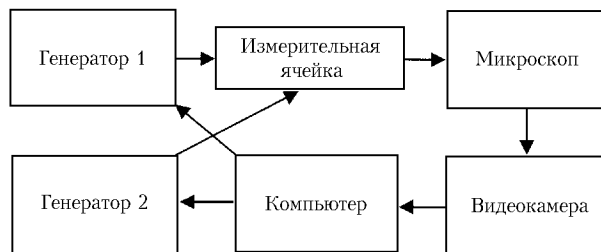


Рис. 2. Схема лабораторной установки для измерения коэффициентов поляризуемости клеток

Указанные генераторы обеспечивают подачу на электроды измерительной ячейки переменного напряжения с амплитудой в интервале $U = 0-4$ В и в частотном диапазоне $F = 10^4-10^8$ Гц. Измерительная ячейка предназначена для создания неоднородного переменного электрического поля с заданными пространственными силовыми характеристиками. Она состоит из предметного стекла, на одной из поверхностей которого расположены металлические электроды толщиной $0,2 \cdot 10^{-6}$ м. Расстояние между электродами $60 \cdot 10^{-6}$ м. Микроскоп, видеокамера и компьютер позволяют наблюдать за отдельными клетками и измерять их радиус, а также скорость поступательного движения в измерительной камере.

Указанные характеристики необходимы для расчета коэффициента поляризуемости клетки одночастотным методом. Для этого разработана программа расчета параметров электрического поля в измерительной камере. На ее базе были произведены оценки возмущений градиента напряженности электрического поля в измерительной камере, которые вызывают сами клетки, а также теоретически исследованы траектории движения поляризованных клеток. Данная установка может использоваться как для двухчастотного, так и для одночастотного методов.

Программа обработки видеоизображений

Для измерения положения клеток и их скоростей движения написана программа на языке Visual C++ 6.0. Видеоизображение вводится в компьютер с помощью специализированных плат для аналогового и цифрового ввода DC-10 и DV-10. В компьютере видеоизображение записано в виде файлов с расширением «avi». Разработанная нами программа разбивает видеоизображение на отдельные кадры. На каждом кадре программа находит координаты центров клеток путем определения максимальной корреляции в интенсивности окраски образца клетки с окраской заданной области экрана при последовательном сдвиге контролируемой области экрана. После определения координат клеток на одном кадре определяются координаты ближайшей клетки на следующем кадре. Таким образом строятся траектории частиц.

Движение клеток определяется скоростью потока и влиянием неоднородного переменного электриче-

ского поля. Для определения скорости потока вычисляется средняя скорость всех частиц до момента включения электрического поля на электродах. Вычисление силы, действующей на клетку со стороны неоднородного переменного электрического поля, проводится по скорости движения частиц относительно потока. Для этого из общей скорости движения частиц при воздействии электрического поля вычитается скорость потока. Для двухчастотного метода вводится обратная связь для подбора в реальном времени такого отношения амплитуд генераторов, при котором центр масс всех клеток движется со скоростью потока.

Вычисление электрических полей

Вычисление электрических полей производится с помощью определения распределения зарядов на пластинах электродов. Для этого решается система алгебраических уравнений, определяющих потенциал ϕ_i на пластинах через значение зарядов q_j в узлах вычислительной сетки, на которую разбивается каждый электрод:

$$\phi_i = \sum_{j=1}^n \frac{q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{i,j}}, \quad (5)$$

где $r_{i,j}$ – расстояние между зарядами q_i и q_j .

По значениям зарядов в узлах сетки на электродах вычисляется распределение потенциалов в промежутке между электродами. По значениям потенциалов в узлах сетки в межэлектродном пространстве вычисляются напряженности электрического поля:

$$E_x = \frac{d\phi}{dx}, \quad E_y = \frac{d\phi}{dy}. \quad (6)$$

Значения квадратов напряженности электрического поля в узлах вычислительной сетки представляют собой поле скалярной величины

$$E^2 = E_x^2 + E_y^2. \quad (7)$$

Расчет коэффициента поляризуемости клеток

Приравняв силу (2), действующую на частицу со стороны электрического поля, к силе вязкого трения со стороны жидкости

$$F = 6\pi\eta vr, \quad (8)$$

где η – коэффициент динамической вязкости жидкости, определим коэффициент поляризуемости частицы

$$\alpha = \frac{24\pi\eta vr}{\epsilon_0 \text{grad}(E^2)}. \quad (9)$$

Далее строится гистограмма распределения частиц от их коэффициента поляризуемости. Для построения частотной зависимости коэффициента поляризуемости клетки используется формула (4). Дискретность установки напряжения генератора состав-

ляет 1 дБ, что соответствует ошибке коэффициента поляризуемости клетки, равной 12%.

Результаты экспериментов

На разработанной установке была исследована зависимость коэффициента поляризуемости эритроцитов человека от частоты. Были проведены измерения поляризуемости на частоте 100 кГц одночастотным методом. Результаты измерений приведены на рис. 3 в виде распределения числа клеток по коэффициенту поляризуемости. Также измерена зависимость коэффициента поляризуемости эритроцитов в диапазоне частот от 100 кГц до 100 МГц двухчастотным методом.

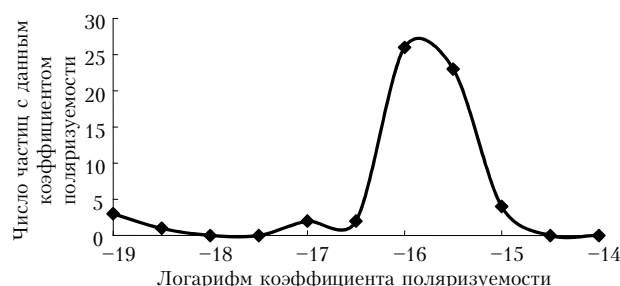


Рис. 3. Распределение эритроцитов в зависимости от коэффициента поляризуемости при измерении одночастотным методом

На рис. 4 приведены экспериментальные данные этих измерений (погрешность 12%) вместе с наилучшей теоретически рассчитанной зависимостью по модели, в которой форма клетки считается сферической. Для этой модели существует аналитическое решение [4]. Кроме того, на рис. 4 показана зависимость, рассчитанная для модели, в которой форма эритроцита описывается двояковогнутым диском. Расчет проведен численным методом, описанным в работе [2].

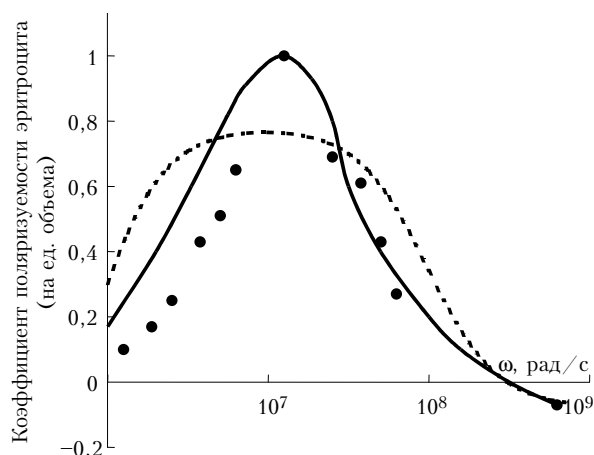


Рис. 4. Зависимость коэффициента поляризуемости эритроцитов от частоты. Точки – экспериментальные данные. Штриховая кривая – лучшая теоретически рассчитанная зависимость для сферической формы клетки; сплошная – зависимость, рассчитанная для модели, в которой форма эритроцита описывается двояковогнутым диском

Заключение

Разработана аппаратура и программное обеспечение, с помощью которых можно находить электрические характеристики биологических частиц произвольной формы в жидкости в переменных электрических полях в диапазоне частот от 10 кГц до 100 МГц как одночастотным, так и двухчастотным методами. Проведены тестовые эксперименты по измерению коэффициента поляризуемости эритроцитов двухчастотным методом. Полученная ошибка измерений для двухчастотного метода оказалась в несколько раз меньше, чем для одночастотного метода.

Авторы работы благодарны А.И. Бородулину за ценные замечания.

Работа выполнена при поддержке международного научно-технического центра (МНТЦ), проект #1802.

1. *Huang Y., Wang X.-B., Becker F.F., Gascoyne P.R.C.* Introducing dielectrophoresis as a new force field for Field-Flow Fractionation // *Biophys. J.* 1997. V. 73. P. 1118–1129.

O.V. Fefelov, T.S. Bakirov, V.M. Generalov, A.S. Safatov. **Two-frequency method for measuring the cell polarizability coefficient.**

Frequency dependence of the coefficient of cell polarizability is a characteristic of physiological state of cells and can be used in their identification. At the present time, this dependence is found by measuring the speed of movement of cells in inhomogeneous electric field and following calculation of the coefficient of cell polarizability. The measurement error includes the errors of measuring the speed, the electric field magnitude, coefficient of proportionality between the speed and viscous friction force. The proposed two-frequency method is free of these errors and provides a higher accuracy of measurements.

2. *Бакиров Т.С., Генералов В.С., Фефелов О.В.* Решение задачи взаимодействия электрических полей с частицами биогенного происхождения // *Оптика атмосф. и океана.* 2001. Т. 14. № 6–7. С. 616–619.
3. *Пастушенко В.Ф., Кузьмин П.И., Чизмаджев Ю.А.* Диэлектрофорез и электровращение клеток: единая теория для сферически симметричных клеток с произвольной структурой мембраны // *Биологические мембраны.* 1988. № 1. С. 65–78.
4. *Бакиров Т.С., Генералов В.М., Топорков В.С.* Измерение поляризации отдельной клетки в неоднородном переменном электрическом поле // *Биотехнология.* 1998. № 2. С. 73–82.
5. *Бакиров Т.С., Генералов В.М., Пугачев В.А., Ретин В.Е., Куслий А.А., Смолина М.П., Чепурнов А.А.* Исследование амплитудно-частотной поляризации биочастиц в ответ на внешние воздействия // *Докл. РАН.* 2001. Т. 377. № 3. С. 399–401.
6. *А.с. 1642353 СССР МКИ G 01 N 27/22.* Способ определения поляризационных характеристик частиц / *Бакиров Т.С., Генералов В.С., Чермащенко В.М.* Опубл. в *БИ.* 1991. № 14.
7. *Becker F.F., Wang X.-B., Huang Y., Pethig R., Vykoukal J., Gascoyne P.R.C.* The removal of human leukaemia cells from blood using inerdigtaed microelectrodes // *J. Phys. D.* 1994. V. 27. P. 2659–2662.