

ВІЗУАЛІЗАЦІЯ СИЛОВИХ ЛІНІЙ ЕЛЕКТРИЧНОГО ПОЛЯ ЗА ДОПОМОГОЮ ДІЕЛЕКТРОФОРЕЗУ ЕРИТРОЦИТІВ

В.О. Шигімага , І.Г.Ізотова, І.О.Сухоставська *
Харківський біотехнологічний центр

У роботі використане явище діелектрофорезу еритроцитів для візуалізації силових ліній електричного поля з метою прямого дослідження його структури між мікроелектродами, що необхідно для удосконалення їх геометрії при визначенні оптимальних режимів у методиці клітинної електроманіпуляції.

діелектрофорез, візуалізація, еритроцит

Відомо, що в перемінному неоднорідному електричному полі в розчині діелектрика клітини переміщуються по градієнту напруженості поля (явище діелектрофорезу) [1]. Напрямок переміщення клітин і їхній кінцевий розподіл у просторі визначається тільки геометрією електродів, що формують силові лінії поля і не залежить від знаку прикладеної в даний момент напруги, тому що сила, яка діє на клітини, пропорційна квадрату напруженості [2]. Діелектрофорез зближує клітини, оскільки їхні найближчі сторони утворюють різні полюси наведених диполів. Далі клітини приходять у тісний контакт і при достатній концентрації в розчині формують ланцюжки уздовж силових ліній електричного поля [2]. Діелектрофорез і утворення ланцюжків клітин можна проводити лише в розчинах із достатньо високим опором. У присутності електролітів виділення тепла при протіканні струму призводить до інтенсивного перемішування розчину і перешкоджає утворенню клітинних ланцюжків [2,3].

У даній роботі використано явище діелектрофорезу еритроцитів для візуалізації силових ліній електричного поля з метою прямого дослідження його структури між мікроелектродами. Це необхідно для удосконалення геометрії мікроелектродів при визначенні оптимальних режимів у методиці клітинної електроманіпуляції, зокрема, при реконструкції транс'ядерних ембріонів.

Матеріали і методи досліджень. Як маркер, що візуалізує поле, використовували еритроцити крові білої миші. Ці об'єкти зручні тим, що їхній розмір, з одного боку, достатньо малий, щоб відобразити силові лінії з добрим розділенням, а з іншого, достатньо великий для спостереження під мікроскопом. Кров одержували із серця препарованої тварини голкою відповідного розміру. За антикоагулянт використовували 1%-ний водяний розчин гепарину. Його поміщали в пробірку з розрахунку 1 крапля на 5мл крові. Потім розчин випарували в сушильній шафі при температурі 80–100⁰С [4] і надалі використовували пробірки в міру необхідності.

Для проведення експериментів по візуалізації зібрали установку, що являє собою комплекс електронних і оптичних приладів наступного складу: генератор високочастотного меандру (ГВЧМ) власної конструкції, мікроскоп

* Науковий керівник - кандидат с. - г. наук Медведовський О.В.

"AXIOVERT-35" (фірми "OPTON", Німеччина), умонтована в мікроскоп відео-камера ACE-320E, відеомагнітофон, телевізор. Мікроелектроди виготовлені декількох типів: циліндричні з золотого мікродроту діаметром 45 мкм скляного пірексом; плоскі паралельні з платинованих бритвених лез, приклеєних до предметного скла полімерним клеєм на відстані 0,25мм; а також пари електродів: один циліндричний, другий із леза і непаралельні з нержавіючого дроту. Візуалізацію поля проводили в розчині 0,3М маніту, що містив еритроцити в невеликій концентрації, щоб уникнути взаємодії клітин власними електричними полями [1,3]. Концентрацію контролювали візуально методом послідовних розведень. Далі встановлювали на столик мікроскопа предметне скло і на нього мікропіпеткою наносили краплю розчину еритроцитів між мікроелектродами. Амплітуду і частоту ГВЧМ підбирали так, щоб, з одного боку, уникнути небажаної ротації еритроцитів [3], а з іншого – їхнього перегріву [5]. Процес діелектрофорезу спостерігали в окуляр мікроскопа і з екрана телевізора, одночасно записуючи відеозображення, яке потім відцифровували за допомогою комп'ютера.

Результати й обговорення. У неоднорідному електричному полі, яке генерується електродами з гострими кінцями або циліндричними електродами малого радіуса, сила поля на одному боці клітини (із розподілом заряду індукованого диполя) найближчої до сгущення силових ліній більша, ніж сила на протилежному боці, рис.1 [2]. У результаті появи рівнодіючої сили клітина рухається по градієнту напруженості поля.

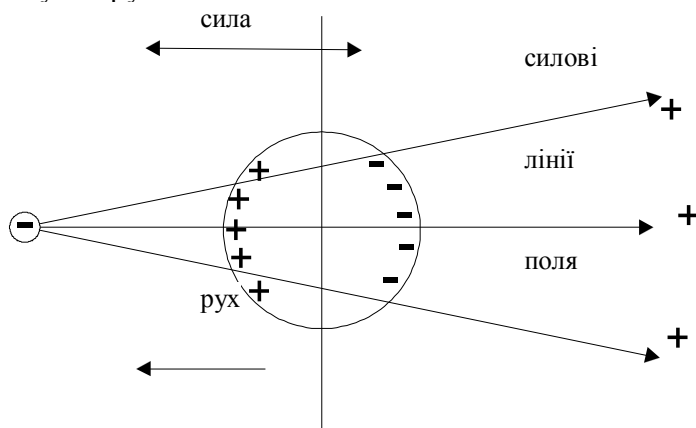


Рис.1 Дія сил на поодинокі клітини в неоднорідному електричному полі.

Сила, що діє на клітину, не залежить від полярності поля і завжди спрямована в область концентрації поля. Тому в неоднорідному перемінному електричному полі клітинний рух призводить до формування ланцюжків клітин [2].

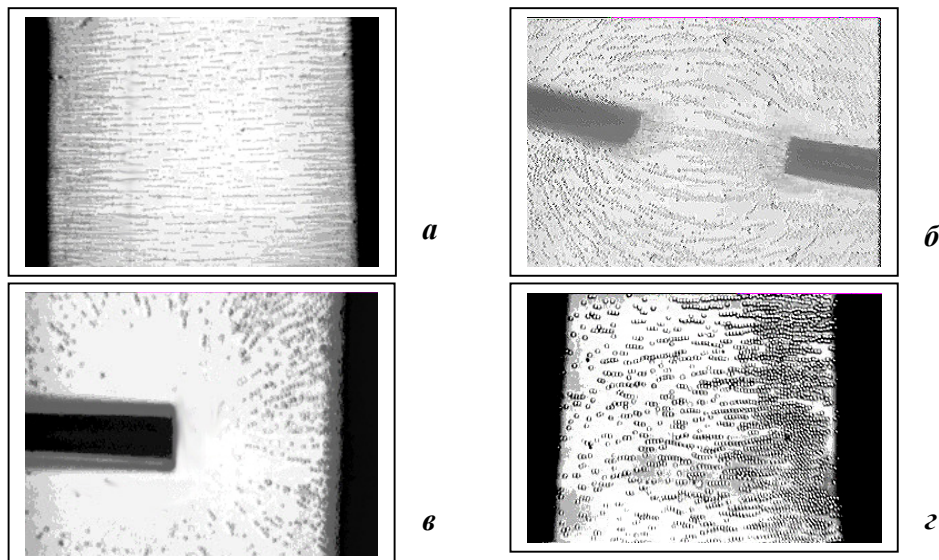


Рис. 2. Силкові лінії електричного поля (ланцюжки еритроцитів) між:

- а)*– паралельними плоскими електродами (x100);
- б)*– циліндричними електродами (x100);
- в)*– циліндричним і плоским (x200);
- г)*– циліндричними непаралельними (x200).

На рис.2 показаний розподіл ланцюжків еритроцитів, що візуалізують силкові лінії поля між різноманітними типами електродів, що звичайно застосовуються в методиці реконструкції клітин шляхом електрозлиття. По ланцюжках між електродами на рис.2а легко визначити, що поле в площині спостереження майже однорідне, сгущення ліній спостерігається поблизу електродів, ймовірно, унаслідок появи крайової неоднорідності й адгезії заряджених клітин [3]. Між циліндричними електродами на мал.2б спостерігається сильно неоднорідне поле, по викривленню і сгущенню ліній якого в приелектродному просторі видно вплив кінцевих розмірів електродів та їхньої неспіввісності. На мал.2в також видно неоднорідність поля. Структура його в лівій половині подібна розподілу ліній поля навколо точкового заряду. У міжелектродному просторі і особливо поблизу плоского електрода спостерігається помітне відхилення від цього розподілу. Це, напевне, можна пояснити впливом близько розташованого протяжного плоского електрода. Нарешті, на рис.2г видно розподіл клітин у випадку їхньої підвищеної концентрації між непаралельними електродами. Така картина зумовлена впливом власного заряду еритроцитів і неоднорідністю поля.

Вивчаючи розподіл полів на рис.2, не варто забувати, що там помітна лише плоска картина силових ліній, точніше, проекція їхнього розподілу в деякій (невеликій) області простору краплі на площину поля зору. Ланцюжки й окремі еритроцити, що знаходяться в цій області і найближчі до цієї площини, входять у глибину різкості оптики мікроскопа і проєктуються на плоску картину, що

вносить деякі труднощі її інтерпретації. Для удосконалення геометрії електродів із метою підвищення ефективності клітинної електроманіпуляції було б дуже цікаво одержати об'ємну картину поля. Проте на цьому шляху можуть виникнути деякі труднощі формування ліній електричного поля, пов'язані з осіданням еритроцитів під дією гравітаційного поля Землі. Таким чином, об'ємна візуалізація перетворюється в самостійне технічно непросте завдання мікроскопування міжелектродного простору в трьох взаємно перпендикулярних площинах з урахуванням седиментації еритроцитів і забезпеченням подальшої комп'ютерної обробки відеозображення.

Автори виражають велику подяку н.с. Лісіну В.І. за виготовлення пари циліндричних золотих склованих електродів, а також директору ХБТЦ Медведовському О.В. за допомогу в організації комп'ютерної обробки відеозображення.

Висновки:

1. Геометрія мікроелектродів, частота і напруженість електричного поля, а також концентрація еритроцитів зумовлюють формування ланцюжків клітин уздовж силових ліній поля під час діелектрофорезу.

2. Візуалізація дозволяє оцінити неоднорідність поля шляхом безпосереднього спостереження ланцюжків еритроцитів між електродами.

Бібліографічний список

1. Pohl H.A.. Dielectrophoresis.: Cambridge Univer. Press.–1978. –579p.
2. Hofmann GA, Evans GA. Electronic genetic physical and biological aspects of cellular electromanipulation//IEEE eng. in med. and biol. magaz.–1986.–N12.–p.6–25.
3. Черномордик Л.В. Электростимулируемое слияние клеток //Успехи совр. биол.–1984.–Т.98.–Вып.3(6).–с.395.
4. Кудрявцев А.А., Кудрявцева Л.А. Клиническая гематология животных. М.: Колос, 1974.–с.399.
5. Тринчер К.С. Дипольная теория диэлектрической структуры клетки//Успехи совр. биол.–1958.–т.45.–вып.3.–с.261–271.

В настоящей работе использовано явление диэлектрофореза эритроцитов для визуализации силовых линий электрического поля с целью прямого исследования его структуры между микроэлектродами, что необходимо для совершенствования их геометрии при подборе оптимальных режимов в методике клеточной электроманипуляции.

Dielectrophoresis of erythrocytes for the electric field lines visualization to immediate investigation its structure between microelectrodes was used in the present paper. It is necessary for the microelectrodes geometry improvement to determination of regime optimum in technique of cellular electromanipulation.