

На правах рукописи



ГЕНЕРАЛОВ ВЛАДИМИР МИХАЙЛОВИЧ

**АППАРАТНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОК
НЕОДНОРОДНЫМ ПЕРЕМЕННЫМ
ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ПОЛЕМ**

Специальность 05.11.17 – Приборы, системы и изделия
медицинского назначения

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора технических наук

Новосибирск - 2012

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор».

Научный консультант: САФАТОВ Александр Сергеевич
доктор технических наук

Официальные оппоненты: БЕЛИК Дмитрий Васильевич, доктор технических наук, доцент, Новосибирский Государственный Технический Университет, заведующий кафедрой “Систем сбора и обработки данных”;

СЕДАЛИЩЕВ Виктор Николаевич,
доктор технических наук, профессор, Алтайский Государственный Технический Университет им. И.И. Ползунова, профессор кафедры "Информационные технологии";

НОВИКОВ Алексей Алексеевич,
доктор технических наук, Омский Государственный Технический Университет, профессор кафедры "Материаловедение и технология конструкционных материалов.

Ведущая организация: Национальный исследовательский Томский политехнический университет

Защита состоится «26» марта 2013 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.173.08 при Новосибирском государственном техническом университете по адресу: 630092, Новосибирск, пр. Карла Маркса, 20.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке Новосибирского Государственного Технического Университета

Автореферат разослан «__»_____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.т.н., доцент

Полубинский Владимир Львович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В медицинской практике всестороннее исследование клеток является *актуальным* для диагностики многих заболеваний человека. В настоящее время широко используются приборы, принцип работы которых состоит в воздействии постоянного электрического поля на клетки крови. В указанном поле на отдельную клетку действует сила пропорционально величине ее заряда, а также напряженности внешнего электрического поля. Эта сила является основой метода электрофореза, на базе которого созданы технологии: разделения белков по массе, фильтрации, сепарации, изучения свойств отдельных клеточных структур (например, мембраны), а также клетки в целом. Электрофорез широко применяется в клинической практике и часто используется в медицинских исследованиях. Однако исследовать быстрые процессы, происходящие внутри или вокруг клетки, с помощью электрофореза не удастся, в силу самой сути метода - использования постоянного электрического поля.

Теория диэлектрофореза, созданная в середине прошлого века, накопленные экспериментальные данные за последние пятьдесят лет убедительно свидетельствуют о новых уникальных возможностях исследования клеток с помощью неоднородного переменного электрического поля (НПЭП). Многочисленные компоненты клетки и она, как единое целое, во внешнем электрическом поле поляризуются. Количественное описание поляризации достигается введением феноменологического коэффициента пропорциональности объемной поляризуемости - a . В НПЭП наблюдаются следующие основные эффекты:

- разнонаправленное поступательное движение клеток относительно электродов в зависимости от частоты внешнего электрического поля;
- ориентация клеток относительно силовых линий электрического поля;
- образование кооперативных цепочек между клетками;
- деформация клеток;
- вращение клеток вокруг собственной оси;
- кооперативное вращение клеток друг относительно друга.

Перечисленные эффекты открывают широкие возможности в разработке новых приборов, методов в области медицины, вирусологии, микробиологии, биотехнологии и др.

Цель работы: создание аппаратно-методического комплекса исследования характеристик клеток неоднородным переменным электрическим полем.

Для достижения поставленной цели формулировались следующие **основные задачи исследования:**

- создание электрооптической системы исследования клетки (ЭОСИК);
- разработка метода измерения вязкоупругих характеристик клетки неоднородным переменным электрическим полем для нужд медицины;
- разработка метода измерения коэффициента объемной поляризуемости клеток неоднородным переменным электрическим полем;
- разработка метода измерения концентрации вирусов в клеточной суспензии с помощью неоднородного переменного электрического поля;
- разработка подхода специфической экспресс индикации вирусов электрооптической системой исследования клеток.

Объекты исследования: электрооптическая система исследования клеток, клетки, вирусы, микрочастицы.

Научная новизна работы заключается в следующем:

- разработан аппаратно-методический комплекс исследования свойств клеток, бактерий, вирусов, вирус-клеточного взаимодействия, измерения коэффициента поляризуемости, обобщенной вязкости и обобщенной жесткости клетки. Свидетельство на полезную модель № 71439. “Система для измерения вязкоупругих и электрических характеристик клеток биологических объектов”. Положительное решение от 22.11.2007 г.;
- разработан способ комплексного анализа параметров живых клеток, устройство для его осуществления и его параметров. Патент РФ № 2357251 зарегистрирован 27 мая 2009 г.;
- разработан методический подход специфической экспресс индикации вирусов гриппа с помощью электрооптической системы исследования клеток. Заявка на патент. Уведомление о регистрации заявки № 2011133270 от 08.08 2011 г.;
- предложено уравнение для расчета величины электрической емкости клетки в НПЭП;
- установлено изменение знака поляризуемости эритроцитов человека в области частот (60÷100) Гц, как результат пробоя мембраны клетки неоднородным переменным электрическим полем;

- латексные микрочастицы производства Dow Chemical (Индианаполис, США) $\Phi = 5,7 \cdot 10^{-6}$ м. предложены в качестве референс образец поляризуемости;

- разработан способ концентрирования клеток в суспензии. Патент на изобретение РФ 1712856, опубл. 10.05.1997. Бюл. № 13.;

- разработан способ определения концентрации вирусов в клеточной суспензии с помощью неоднородного переменного электрического поля. Способ определения концентрации вирусов в жидком биологическом материале и устройство для его осуществления. Патент 2225446 зарегистрирован в ГРИПФ 10 марта 2004 г. Заявка на изобретение 2001132198, опубл. 2003.07.10.;

- разработано устройство для селективной деструкции биологических объектов. Свидетельство на полезную модель № 29932 зарегистрировано в ГРИПФ 18.11.2002, опубл. 10.03.2003 г. Бюл. № 16.

Использование электрооптической системы исследования клетки в медицине позволило:

- на основе анализа поляризуемости и вязкоупругих характеристик эритроцитов осуществлять неинвазивную диагностику фиброза печени. Способ дифференциальной диагностики заболеваний печени. Патент РФ № 2296327. Заявка № 2004126112 от 30.08.2004; опубл. 27.03.2007. Бюл. № 9.;

- выявить повышенные показатели вязкости, жесткости эритроцитов у лиц, злоупотребляющих алкоголем.

На защиту выносятся:

- электрооптическая система исследования клеток для изучения вирус-клеточного взаимодействия, измерения коэффициента объемной поляризуемости, обобщенной вязкости и обобщенной жесткости клетки;

- метод измерения обобщенной вязкости и обобщенной жесткости эритроцита, как единого целого;

- метод измерения коэффициента объемной поляризуемости биологических частиц и клеток крови;

- методический подход специфической экспресс индикации вирусов электрооптической системой исследования клеток;

- метод измерения концентрации вирусов в клеточной суспензии с помощью неоднородного переменного электрического поля.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается:

- законами и положениями физики, вирусологии, медицины, справедливость которых общепризнанна;
- публикациями в рецензируемых изданиях и представлением полученных результатов на Российских и международных конференциях;
- положительными результатами апробации и внедрения ЭОСИК в условиях медицинского учреждения;
- строгостью используемого математического аппарата;
- экспериментальными результатами и теоретическими оценками, которые совпадают между собой.

Практическая значимость работы:

Создана электрооптическая система исследования клеток для неинвазивной диагностики фиброза печени и алкогольного поражения сердца.

Внедрение аппаратно-методического комплекса исследования клеток неоднородным переменным электрическим полем в практику позволит:

- осуществлять измерения обобщенной вязкости и обобщенной жесткости эритроцитов человека с визуальной наглядностью, с высокой производительностью, минимальными временными и материальными затратами;
- осуществлять неинвазивную диагностики заболеваний печени и сердца;
- обеспечить возможность проведения массового скрининга населения страны с целью выявления заболеваемости печени и сердца на ранних стадиях;
- исследовать механизмы взаимодействия вирусов с клетками животных;
- изучать влияния, биологических, физических и химических воздействий на клетки;
- исследовать причины и механизмы клеточного разрушения.

Связь работы с научными программами, планами, темами.

Диссертационная работа выполнялась в ФБУН ГНЦ ВБ Вектор в рамках научно-исследовательских работ организации 1986÷2012 гг.:

- разработка электрооптических систем детекции клеток микроорганизмов, экспрессного мониторинга их морфометрических характеристик и физиологических параметров. Госконтракт № 02.434.11.3011. инв. номер 02.2.00700318;
- разработка электрооптической системы детекции клеток. Госконтракт № 02.512.11.2132. инв. номер 0220.0 803326;

- разработка аппаратно-программного комплекса и алгоритма проведения неспецифической и специфической индикации возбудителей особо опасных инфекционных болезней в объектах окружающей среды на основе биосенсорных технологий. Контракт № 72-Д/1. инв. номер 02201162444;

- разработка электрооптических систем детекции микроорганизмов. Тема 05-2-06. инв. номер 02.2.00 950283;

- разработка персональных пробоотборных устройств нового поколения для обнаружения и идентификации вирусов и других микроорганизмов. Тема 027-5-06. инв. номер 02.2.00 950286.

В диссертационную работу вошли также результаты научных исследований, выполненных в рамках сотрудничества с международным научно-техническим центром (МНТЦ) и другими зарубежными организациями:

- МНТЦ № 1802 - Экспресс метод идентификации клеток, инфицированных вирусом;

- МНТЦ № 3275 - Разнообразие жизнеспособных микроорганизмов в атмосферном аэрозоле юга Западной Сибири;

- МНТЦ № 2490 - Разработка микробиологических средств защиты растений;

- Национальная Северотихоокеанская лаборатория США. Контракт № 325717-A-F1 - Улучшенный автоматизированный счетный сортер для биологической клеточной суспензии;

- Национальное агентство космической авиации США - Сепарация и идентификации биологических частиц;

- Европейский научный офис Армии США. Контракт 68171-96-C-9021 - Развитие метода экспресс индикации вирус-клеточного взаимодействия неоднородным переменным электрическим полем.

Внедрение результатов и рекомендации по их использованию. Разработанные в диссертационной работе аппаратно-методический комплекс исследования клеток используется в:

- Федеральном Бюджетном Учреждении Науки «Государственном Научном Центре Вирусологии и Биотехнологии «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирской области для исследования вирус-клеточного взаимодействия;

- Федеральном Бюджетном Учреждении Науки Научно - Исследовательском Институте Терапии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук для исследования вязкоупругих свойств эритроцитов, неинвазивной диагностики, лечения заболеваний печени и сердца;

- Сибирском Научно-Исследовательском Институте Метрологии для разработки подходов создания референс образца и эталона поляризуемости;

- Государственном Бюджетном Образовательном Учреждении высшего профессионального образования, Российском Национальном Исследовательском Медицинском Университете имени Н.И. Пирогова для исследования клеток при различных патологиях и под воздействием наночастиц.

Результаты работы могут использоваться учреждениями - занимающиеся диагностикой заболевания человека, индикацией вирусов, производством вакцин, клеточными технологиями и др.

Основные результаты диссертационной работы докладывались на международных и отечественных конференциях:

Первой школе-семинаре. (пос. Кольцово, 1990); Научной конференции химической и биологической защиты. (США, Абердин, 1995); Втором химическом и биологическом медицинском симпозиуме. (Швейцария, Шпиц, 1996); НАСА/РКА. Техническом консультативном исследовательском совете. (Королев, Московская область, 1996); IX Рабочей группе «Аэрозоли Сибири». (Томск, 2002); Международной конференции вновь возникающих инфекционных заболеваний. (США, Атланта, 2002); Международной конференции “Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний”. (Новосибирск, 2004); XI Российском национальном конгрессе кардиологов. (Томск, 2004); Второй международной конференции "Наука – Бизнес – Образование". (Пущино, 2005); Российской конференции “Гастроэнтерологическая неделя”. (Москва, 2005); 10-ой Российской конференции “Гепатология сегодня” (Москва, 2005); Итоговой конференции по результатам выполнения мероприятий за 2007 г. в рамках приоритетного направления “Живые системы” ФЦП. (Москва, 2007); Конгрессе кардиологов стран СНГ. (Москва, 2008); Пятнадцатой российской гастроэнтерологической неделе. (Москва, 2009); II Московской региональной научно-практической конференции. (Москва, 2009); 4-ой школе метрологии и стандартизации в нанотехнологии и nanoиндустрии. (Новосибирск, 2011).

Публикации. По теме диссертации опубликованы: монография, 38 статей в научных журналах, из них 32 статьи в изданиях из списка ВАК, 4 патента на изобретение РФ, 2 свидетельства на полезные модели РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 273 страницах. В ее состав входит 64 рисунка и 31 таблица. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Список использованной литературы включает 350 источников.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Введение содержит обоснование актуальности диссертационной работы, общую характеристику работы, формулировку цели и основных задач. Во введении излагаются научная новизна, практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен обзор литературы по изучению клеток, биочастиц с помощью постоянного, переменного и НПЭП. Проанализированы литературные данные о множестве вариантов реакции клетки в широком частотном диапазоне НПЭП и причинах их вызывающие.

В разделе 1.2. приводится теория диэлектрофореза клетки. Внешнее электрическое поле \vec{E}_{cp} , приложенное к клетке, вызывает поляризацию ее положительных и отрицательных электрических зарядов. Коэффициент объемной поляризуемости¹ $\alpha_{кл}$ клетки в форме шара по одному выделенному направлению (например, оси x) с диэлектрической проницаемостью клетки $\epsilon_{кл}$ и среды ϵ_{cp} находится из уравнения,

$$\alpha_{кл} = 4 \cdot \pi \cdot r_{кл}^3 \cdot \epsilon_{cp} \cdot \frac{\epsilon_{кл} - \epsilon_{cp}}{\epsilon_{кл} + 2 \cdot \epsilon_{cp}} \quad (1)$$

где $\frac{\epsilon_{кл} - \epsilon_{cp}}{\epsilon_{кл} + 2 \cdot \epsilon_{cp}} = K(f)$ – фактор Клаузиуса-Мосотти.

В НПЭП на клетку действует усредненный по времени вектор силы, который приводит ее в поступательное движение

$$\langle \vec{F}_{кл} \rangle = \langle 2 \cdot \pi \cdot \epsilon_{cp} \cdot \epsilon_0 \cdot r_{к}^3 \cdot \left[\frac{\epsilon_{кл} - \epsilon_{cp}}{\epsilon_{кл} + 2 \cdot \epsilon_{cp}} \right] \cdot \nabla E_{cp}^2 \rangle \quad (2)$$

¹ Далее по тексту поляризуемость.

где ∇E_{cp}^2 – градиент квадрата напряженности электрического поля среды.

Фактор $K(f)$ может принимать как положительные значения, если

$\varepsilon_{кл} > \varepsilon_{cp}$, так и отрицательные, если $\varepsilon_{кл} < \varepsilon_{cp}$, рисунок 1.

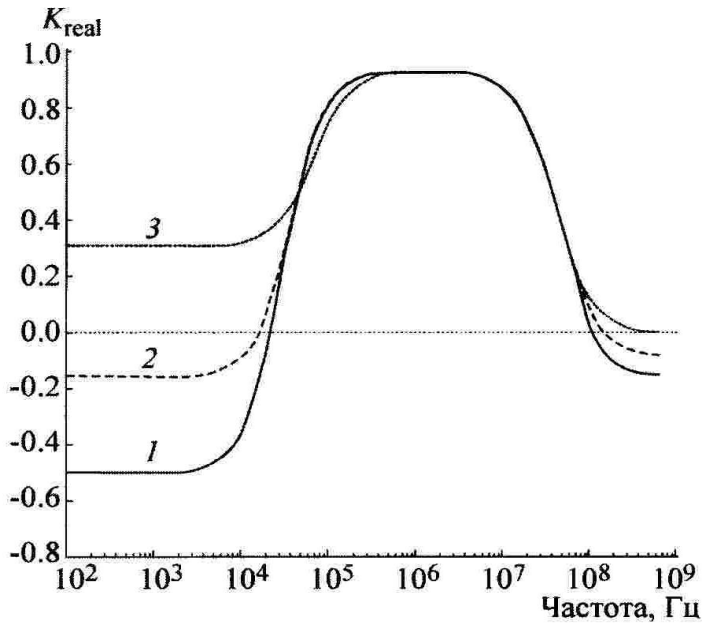


Рисунок 1. Типичные частотные зависимости реальной части $Re(K)$ фактора $K(f)$ клетки

Значения реальной части фактора $K(f)$ меньше нуля соответствуют отрицательному диэлектрфорезу (-ДЭФ), клетки

выталкиваются в области с наименьшим ∇E_{cp}^2 . Значения реальной части фактора $K(f)$ больше нуля соответствуют положительному диэлектрфорезу (+ДЭФ), клетки стремятся в область с максимальным ∇E_{cp}^2 . Частотные области отрицательного и положительного диэлектрфореза разделяет равновесная частота f_p , на которой клетки неподвижны.

В разделах 1.3., 1.4. рассмотрено строение клетки, биологических тканей, их электрические свойства.

В разделе 1.5. сформулирована актуальность настоящего исследования. В области медицины разработка неинвазивных методов диагностики, которые не травмируют пациентов или методов, приносящих пациентам минимальные неудобства является **актуальной** задачей. **Актуальными** являются методы, которые позволяют предоставлять в распоряжение врачей объективные данные. Среди них следует выделить исследования вязкоупругих характеристик (ВУХ) эритроцитов (обобщенных вязкости и жесткости). Жесткие и вязкие эритроциты могут стать причиной нарушения микроциркуляции крови в органах и тканях и кислородного обмена в ор-

ганизме. В итоге возникают условия для таких грозных заболеваний как инфаркт миокарда, ишемия, некроз, инсульт, тромбоз и др. ЭОСИК открывает новые возможности в инструментальной диагностике заболеваний человека на основе исследовании поляризуемости, ВУХ клеток.

В области вирусологии, микробиологии экспресс индикация патогенных биологических агентов (ПБА) является **актуальной** задачей, как в диагностике заболеваний человека, так и в защите населения от возможных последствий экологических и техногенных катастроф. В настоящее время, нет единого метода, который бы удовлетворял, условиям высокой чувствительности, специфичности, скорости, низкой стоимости, абсолютной достоверности в получении результатов индикации ПБА. По-прежнему существует необходимость в поиске и разработке новых более совершенных методов индикации ПБА.

Множество инфекционных и неинфекционных заболеваний человека связано со сбоем в работе клеток, поэтому анализ процессов, происходящих в них, является также неотъемлемой и **актуальной** частью исследования. Необходимо выяснить какое потенциальное влияние на свойства клетки, как единого целого, могут оказывать точечные или структурные изменения мембраны, цитоплазмы; где допустимы границы этих изменений и др.

В области биотехнологии, разработка методов концентрирования, разделение клеток, бактерий, вирусов является **актуальной** задачей. Концентрирование позволяет улучшить условия, точность, воспроизводимость, повторяемость исследования клеток и вирусов, поэтому оно широко используются.

До настоящего момента, создание приборов на основе диэлектрофореза и их внедрения в широкую практику, сдерживалось сложностью автоматизации измерений и как следствие высокой трудоемкостью. Кроме того, требует внимания задача выявления и анализа источников ошибок инструментального измерения. Стремительный прогресс в области цифровой записи изображения, микроскопии и развития компьютерной техники в значительной части способен решить перечисленные проблемы создания аппаратно-методического комплекса исследования клеток неоднородным переменным электрическим полем.

Во второй главе приводятся материалы и методы исследования.

В разделе 2.1-2.3. представлен перечень основных материалов, средств измерений и вспомогательных устройств. Базовым изотоническим раствором с низкой ионной силой в работе выбран 0,3 М сахарозы с добавкой 5 мМ $NaCl$. В исследованиях также использовалась кровь многочисленных пациентов. Клиническое обследование пациентов, забор их крови выполнены с одобрения комитета биомедицинской этики Федерального бюджетного учреждения науки научно-исследовательского института терапии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (протокол № 4 заседания Этического комитета Государственного учреждения научно-исследовательского института терапии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук от 14 сентября 2002 г.).

В разделе 2.4. описан метод измерения равновесной частоты клетки в неоднородном переменном электрическом поле. Суть метода состоит в поиске частоты НПЭП, на которой клетки неподвижны.

В разделе 2.5. приводятся характеристики гармонического сигнала и радиоимпульса, которые заложены в работу ЭОСИК.

Третья глава посвящена разработке аппаратно-методического комплекса.

В разделе 3.1. рассматривается метод измерения поляризуемости клетки в НПЭП. В основу метода положено уравнение

$$Re|a_{кл}| = \frac{12\pi\eta_{ср}\vec{v}_{кл}r_{кл}\cdot\nabla E_{ср}^2}{\varepsilon_o\nabla E_{ср}^2\cdot\nabla E_{ср}^2} \quad (3)$$

где: ε_o - диэлектрическая постоянная; $\eta_{ср}$, - вязкость изотонического раствора в котором находится клетка; $r_{кл}$, $\vec{v}_{кл}$ - радиус и вектор скорости поступательного движения клетки в электрическом поле, определяются экспериментально.

В разделе 3.2. представлена электрооптическая система исследования клеток (ЭОСИК), рисунок 2.

С помощью ЭОСИК производились измерения и расчет следующих основных и вспомогательных характеристик, $r_{кл}$ - радиус клетки; $v_{кл}$ - скорость поступательного движения клетки относительно электродов; x_m - амплитуда деформации клетки; $\alpha_{кл}$ - поляризуемость клетки; $c_{кл}$ - обобщенная жесткость клетки; $\eta_{кл}$ -

обобщенная вязкость клетки; f_{pl} – равновесная частота клетки; $C_{кл}$ – электрической емкости клетки.

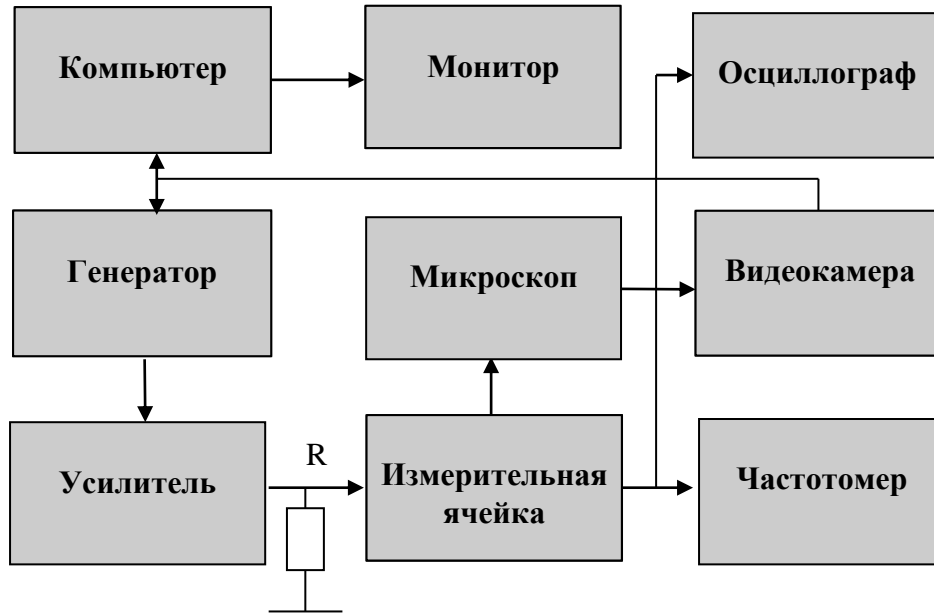
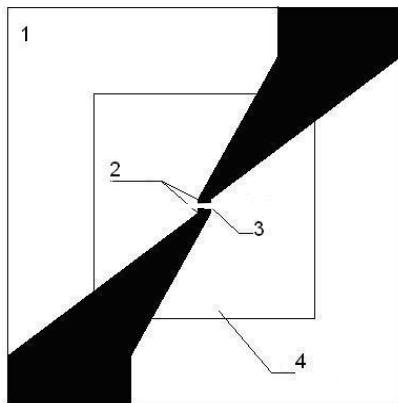


Рисунок 2. Функциональная схема электрооптической системы исследования клеток

В разделе 2.4. приводятся характеристики гармонического сигнала и радиоимпульса, которые использовались в работе для исследования клеток.



В разделе 3.2.2. описана разработка конструкции измерительной ячейки для работы с патогенными биологическими агентами, рисунок 3.

Рисунок 3. Конструкция измерительной ячейки. 1 – стеклянная пластина, 2 – электроды, 3 – измерительная камера (щель) между электродами ($10^{-3} \times 54 \cdot 10^{-6}$) м., 4 – покровное стекло

В разделе 3.2.3. описан расчет характеристик электрического поля в измерительной камере. Используется метод суперпозиции для определения потенциал $\varphi_{x,y}$ электрического поля в каждой точке измерительной камеры путем суммирования всех расчетных потенциалов от каждого заряда q_i элементарного участка

поверхности электродов. Определяются значения напряженности электрического поля по координатам x , y , и величина ∇E_{cp}^2 в каждой точке измерительной камеры.

В разделе 3.2.4. представлены сведения о программном обеспечении ЭОСИК. В компьютере ЭОСИК устанавливается оригинальный программный пакет, который осуществляет управление работой генератора; распознавание образа клеток; расчет силовых характеристик НПЭП; измерение амплитуды деформации; расчет поляризуемости, вязкости, жесткости для каждой отдельно наблюдаемой клетки.

В разделе 3.2.5 приведен математический анализ контроля точности измерения поляризуемости клеток ЭОСИК. Относительная погрешность измерения величины поляризуемости $\delta(\alpha_{кл})$ находится из уравнения

$$\delta(\alpha_{кл}) \leq \left| \frac{\partial \eta_{cp}}{\eta_{cp}} \right| + \left| \frac{\partial r_{кл}}{r_{кл}} \right| + \left| \frac{\partial v_{кл}}{v_{кл}} \right| + \left| \frac{\partial(\nabla E_{cp}^2)}{\nabla E_{cp}^2} \right|$$

где погрешности измерения: $\left| \frac{\partial \eta_{cp}}{\eta_{cp}} \right|$ - вязкости суспензии клеток;

$\left| \frac{\partial r_{кл}}{r_{кл}} \right|$ - радиуса клетки; $\left| \frac{\partial v_{кл}}{v_{кл}} \right|$ - скорости ее поступательного движения;

$\left| \frac{\partial(\nabla E_{cp}^2)}{\nabla E_{cp}^2} \right|$ - градиента квадрата напряженности электрического поля в

месте нахождения клетки.

Относительная погрешность измерения поляризуемости клетки ЭОСИК не превышает $\delta(\alpha_{кл}) \leq 19,5\%$.

В разделе 3.2.6. сопоставлены величины поляризуемости латексных микрочастиц и эритроцитов, полученных теоретически (1) и экспериментально с помощью ЭОСИК (3). Величины совпали с ожидаемой погрешностью $\delta(\alpha_{кл}) \leq 19,5\%$.

В разделе 3.2.7. дана теоретическая оценка времени релаксации τ_p клетки в вязкой среде 0,3 М сахарозы. Она характеризует, за какое время клетка поляризуется и способна достигать скорости равновесия в изотоническом растворе 0,3 М сахарозы. Теоретические оценки показали $\tau_p \sim 1,8 \cdot 10^{-11}$ с. Это позволяет считать процесс поля-

ризации клетки, в рамках представленной работы, практически “мгновенным”.

Четвертая глава посвящена результатам, полученным в работе и их обсуждению.

В разделе 4.1. показаны результаты исследования взаимодействия клетки с НПЭП.

В разделе 4.1.1. представлен анализ эквивалентной электрической схема клетки и ее характеристик в широком диапазоне частот. Обоснована эквивалентная электрическая схема клетки в виде, изображенном на рисунке 4.

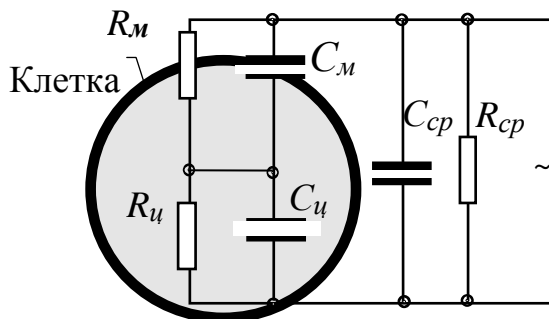
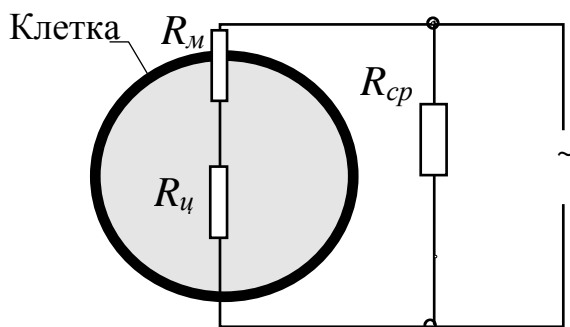


Рисунок 4. Эквивалентная электрическая схема клетки. C_m , C_u и C_{cp} – емкость мембраны, цитоплазмы и среды (клеточной суспензии); R_m , R_u , R_{cp} , – сопротивление мембраны, цитоплазмы, среды

Электрические сопротивления, емкости $C_{m,u,cp}$ мембраны, цитоплазмы клетки, а также окружающей среды являются частотно зависимыми $X_{m,u,cp} = -\frac{1}{i\omega C_{m,u,cp}}$, что позволяет рассматривать

эквивалентные схемы клетки в области низких и высоких частот. В



низкочастотном диапазоне частот ($10 \div 10^3$) Гц эквивалентная схема представлена на рисунке 5.

Рисунок 5. Эквивалентная схема клетки в низкочастотном диапазоне частот ($10 \div 10^3$) Гц

В области высоких частот эквивалентная схема преобразуется к виду, представленному на рисунке 6.

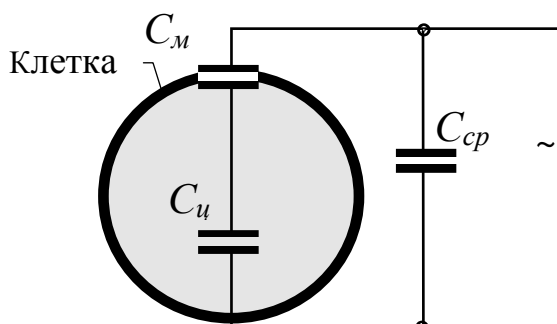


Рисунок 6. Эквивалентная схема клетки в высокочастотном диапазоне частот ($10^7 \div 10^8$) Гц

Анализ отношения сопротивлений клетки и среды в диапазоне ($10^2 \div 10^8$) Гц показал, что на равновесной частоте ω_{p1} выполняется условие равенство сопротивлений $R_{кл} = R_{ср}$, $C_{кл} = C_{ср}$. Коэффициент отношений комплексного сопротивления среды $Z_{ср}$ и клетки $Z_{кл}$ на равновесной частоте ω_{p1} равен единице. Указанное равенство позволяет находить характеристики клетки $R_{кл}$, $C_{кл}$ через измерения $R_{ср}$, а емкость клетки, среды из уравнения $C_{кл, ср} = 1/R_{ср}$. Сопротивление среды находится с помощью измерительного прибора, кондуктометра.

В частотной области (-ДЭФ) выполняется неравенство $Z_{кл} > Z_{ср}$. В результате переменный ток от внешнего генератора замыкается, в основном, по наружной поверхности и прилегающему объему клеточной суспензии (среды). В этом частотном диапазоне осуществляется селективное исследование свойств мембраны.

В частотной области (+ДЭФ) выполняется неравенство $Z_{кл} < Z_{ср}$. Переменный ток от внешнего генератора фокусируется в клеточной цитоплазме. Внутриклеточные органеллы находятся под действием внешнего генератора. В этом частотном диапазоне осуществляется селективное исследование свойств цитоплазмы, рисунок 7.

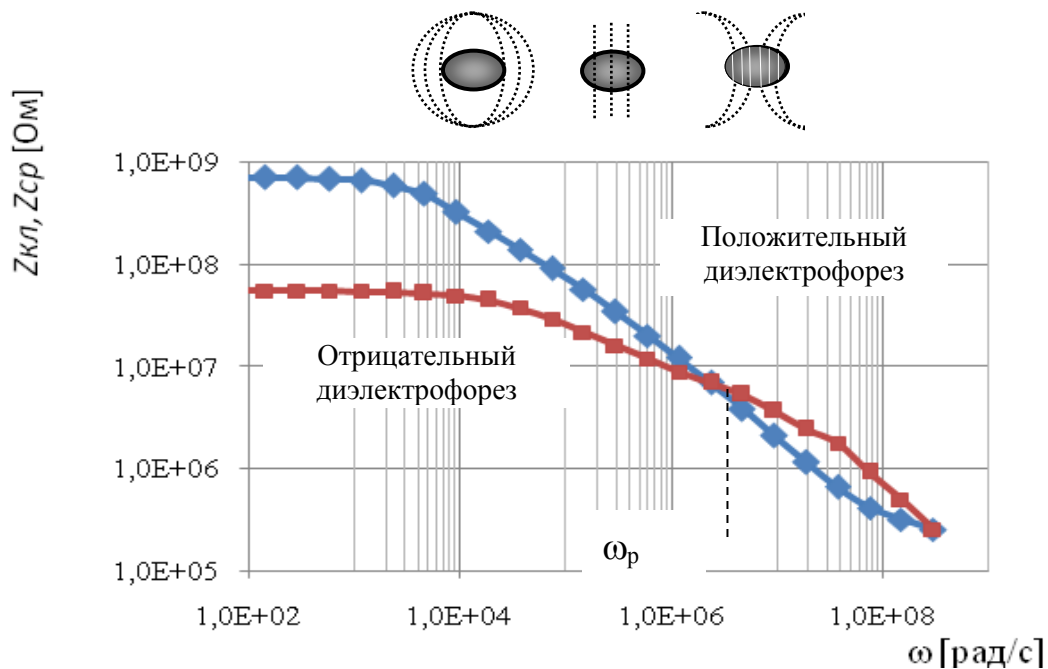


Рисунок 7. Типичная амплитудно-частотная зависимость $Z_{кль}$ - \blacklozenge $Z_{ср}$ - \blacksquare от частоты переменного электрического поля, ω_p – равновесная частота

В разделе 4.1.2. проведены теоретическое и экспериментальное исследования влияния сквозных пор мембраны на амплитудно-частотную зависимость поляризуемости эритроцитов человека. В экспериментах использовались эритроциты человека, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, штамм Y-55, клетки *VHK21*, а также латексные частицы как контроль. Последние не имеют мембраны, поэтому и образование пор на их поверхности невозможно. Измерения проводились в диапазоне частот $f = (1 \div 10^6)$ Гц. В частотном диапазоне $(60 \div 100)$ Гц выявлен положительный диэлектрофорез клеток (эритроцитов и дрожжей), а не ожидаемый отрицательный, который приводится в литературе, рисунок 1. Появление сквозных пор на мембране приводит к резкому увеличению объема клеток, который после выключения электрического поля к исходному состоянию не возвращаются, рисунок 8.

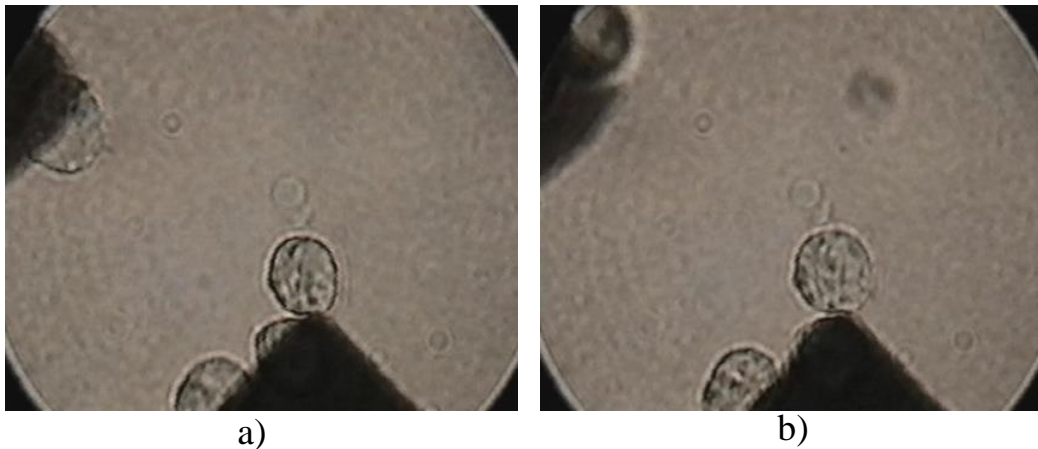


Рисунок 8. Динамик резкого увеличения объема клетки *VHK21*. а) – клетка в отсутствии НПЭП. $E=0$ В/м, $t = 0$; б) - клетка, но уже с увеличенным объемом в НПЭП. $E=10^5$ В/м, $t = 5$ с, $f = 100$ кГц

В разделе 4.2. рассмотрено применение электрооптической системы исследования клеток в вирусологии.

В разделе 4.2.1. дана оценка силовым характеристикам электрического поля, необходимым для манипуляции вирусами, обосновываются причины поляризации вирусов в НПЭП, приводится фотография кооперативных цепочек вируса ядерного полиэдроза в НПЭП.

В разделе 4.2.3. описаны индикации вируса краснухи (*P-1965*) с помощью ЭОСИК. Индикация построена на измерении равновесной частоты интактных и инфицированных вирусом клеток. Значения равновесной частоты для суспензии вируса краснухи + клетки *BHK 21* представлены в таблице 1.

Таблица 1. Значения равновесной частоты для суспензии клетки *BHK 21* + вирус краснухи

Наименование суспензии	Вирус краснухи + клетки <i>BHK 21</i>			Клетки <i>BHK 21</i> [Контроль]		
	10	60	120	10	60	120
Равновесная частота f_p [МГц]	0,25	0,30	0,35	0,55	0,50	0,50

Примечание. Относительная погрешность измерения частоты не более $\pm 4\%$

В экспериментах также использовались эритроциты человека. Значения равновесной частоты для суспензии вирус краснухи + эритроциты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Значения равновесной частоты для эритроцитов человека + вирус краснухи

Наименование суспензии	Эритроциты + вирус краснухи							Эритроциты [Контроль]
	2	4	8	16	32	64	128	
Величина разведения исходной вирусной суспензии [раз]								Вирус отсутствует
Равновесная частота f_p [МГц]	10	3,5	1,5	0,8	0,8	1,0	0,5	0,5

Примечание. Относительная погрешность измерения частоты не более $\pm 4\%$

Эксперименты показали. Равновесная частота эритроцитов человека в присутствии вируса, относительно контрольных (без вируса) изменяется в 20 раз. Аналогичные изменения равновесной частоты для клеток *BHK 21* незначительные. Равновесная частота эритроцитов животных являются более перспективными клетками для индикации чем клетки *BHK 21*.

В разделе 4.2.3. описана индикация вируса гриппа *A/Aichi/2/68(H3N2)* с помощью ЭОСИК. В экспериментах использовались эритроциты цыпленка, а также клетки *MDCK*. С помощью

ЭОСИК находилась их равновесная частота, таблицы 3. Анализ данных, представленных в таблице 3, показал - равновесная частота эритроцитов f_{p1} увеличивается с повышением концентрации вируса гриппа в клеточной суспензии. Клетки MDCK для индикации вируса с помощью ЭОСИК непригодны, так как изменения их равновесная частота незначительны.

Таблица 3. Значения равновесной частоты для эритроцитов цыпленка + вирус гриппа

Наименование	Вирус гриппа + эритроциты						Эритроциты [Контроль]
Величина разведения исходной вирусной суспензии [раз]	2	4	8	16	32	64	-
Равновесная частота f_p [МГц]	1,2	-	0,7	-	0,7	0,6	0,6

Примечание. Относительная погрешность измерения частоты не более $\pm 4\%$

В отдельном эксперименте проведены исследования морфологии мембраны эритроцитов обезьяны до и после адсорбции на них вирусов гриппа, рисунок 9.

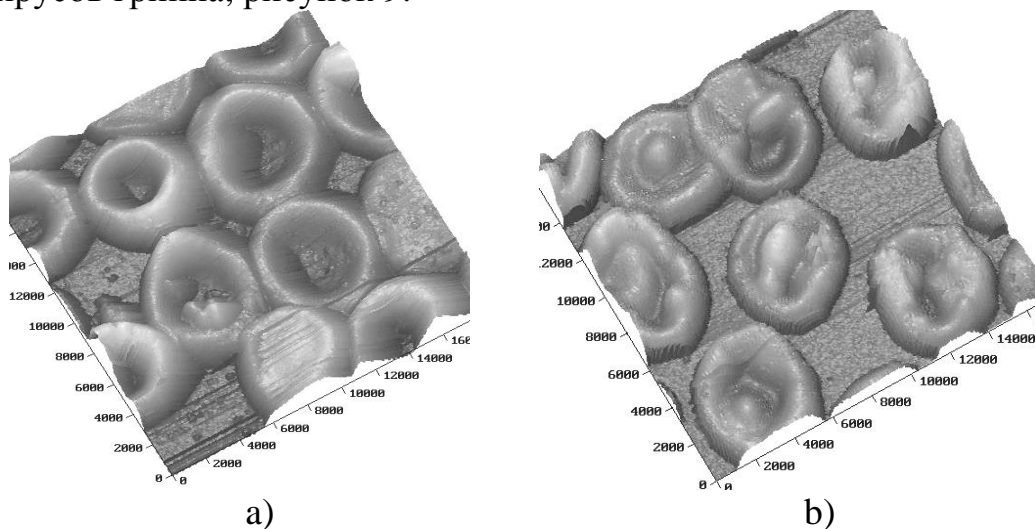


Рисунок 9. Эритроциты обезьяны в атомносиловом микроскопе. а) – контрольные, б) – после адсорбции вируса гриппа. (Фото Зайцева Б.Н.)

В разделе 4.2.4. рассмотрен методологический подход специфической экспресс индикации вирусов, с помощью ЭОСИК, на примере вируса гриппа *A/Common gull/Chany/P/2006 (H5N1)*, полу-

ченного из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ Вектор. Исследования велись с учетом следующих экспериментально установленных в работе результатов: вирус гриппа способен сдвигать равновесную частоту эритроцитов в более высокочастотную область относительно контрольных; изменения равновесной частоты эритроцитов после взаимодействия с вирусом гриппа происходит в течение короткого промежутка времени (меньше минуты); специфическая сыворотка (+) к чувствительному вирусу изменяет его свойства таким образом, что происходит его инактивация, в результате чего модификации свойств клетки не происходит; нормальная сыворотка (–) нечувствительна к вирусу свойства его не изменяет и вирус остается способным модифицировать характеристики клетки. Для индикации использовалась специализированная ячейка, в составе которой имелись шесть измерительных камер с квадрупольной структурой поля в каждой. Результаты индикации вируса гриппа *A/Common gull/Chany/P/2006 (H5N1)* в исследуемой пробе по поведению эритроцитов лошади в измерительной камере методом диэлектрофореза приведены в таблице 4. Характерная реакция эритроцитов для отрицательного и положительного диэлектрофореза представлены на рисунках 10÷13.

Таблица 4. Результаты индикации вируса *A/Common gull/Chany/P/2006 (H5N1)*

Наименование	Напряжение на электродах 5 В частота 50 кГц	Напряжение на электродах 5 В частота 2000 кГц	Вывод
Пробирка 1. Интактные эритроциты лошади	Отрицательный диэлектрофорез	Положительный диэлектрофорез	Эритроциты пригодны для использования
Пробирка 2. Эритроциты лошади + вирус в разведении 1:128. Контроль геммагглютинации	Отрицательный диэлектрофорез	Отрицательный диэлектрофорез	В указанной пробирке присутствует вирус, который агглютинирует клетки
Пробирка 3. Эритроциты лошади + вирус в разведении 1:128 + специфическая сыворотка с титром 1:2560 к вирусу <i>A/Common gull/Chany/P/2006 (H5N1)</i> в	Отрицательный диэлектрофорез	Положительный диэлектрофорез	В указанной пробирке содержится искомым штамм вируса <i>A/Common gull/Chany/P/2006 (H5N1)</i>

разведении 1:640			
Пробирка 4. Эритроциты лошади + вирус в разведении 1:128 + нормальная сы- воротка	Отрицатель- ный диэлек- трофорез	Отрицатель- ный диэлек- трофорез	В указанной пробирке отсут- ствует влияние бел- ков нормальной сыворотки на клетки

Таким образом, ЭОСИК позволяет осуществлять индикацию вирус-клеточного взаимодействия на основе регистрации изменения свойств клетки.

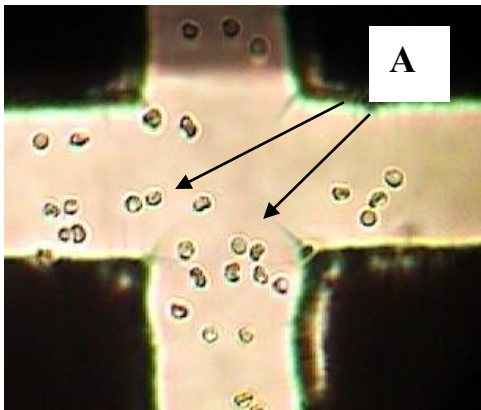


Рисунок 10. Эритроциты (А) лошади в измерительной камере $U=0$ В. Темные области – электроды



Рисунок 11. Агрегат эритроцитов (А) лошади в центре измерительной камеры. Частота 50 кГц, $U=5$ В

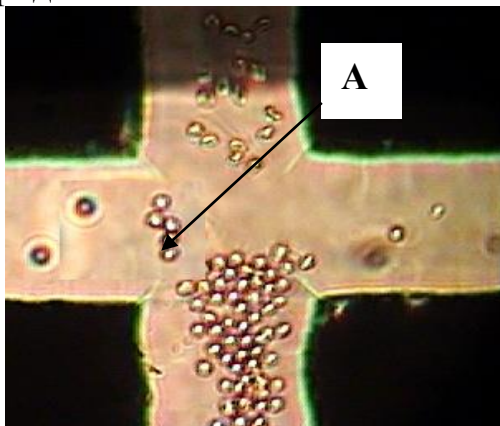


Рисунок 12. Распад агрегата эритроцитов (А) в центральной части измерительной камеры. $U=0$ В

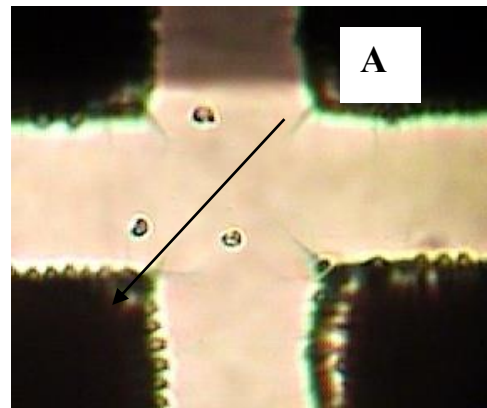


Рисунок 13. Эритроциты (А) лошади на электродах измерительной камеры. Частота 2000 кГц, $U=5$ В

В разделе 4.2.5. описан метод измерения концентрации вирусов в клеточной суспензии с помощью ЭОСИК. В основу метода определения концентрации инфицированных клеток и вирусов в клеточной

суспензии положена идея принципиальной разницы в реакции интактных и инфицированных клеток на двух фиксированных частотах НПЭП. Для реализации метода необходимо выполнить три условия. Первое – концентрация клеток в суспензии известна. Второе – направление вектора поступательного движения для интактных и инфицированных клеток диаметрально противоположно на экспериментально подобранных, двух частотах. Например, интактные клетки на первой частоте испытывают положительный диэлектрофорез, тогда как клетки в присутствии вируса демонстрируют отрицательный диэлектрофорез. Третье – в клеточной суспензии путем разведения концентрация клеток $C_{кл}$ и вируса $C_{в}$ подбирается из условия

$C_{кл} \sim 2C_{в}$. Это обеспечивает нехватку вируса примерно для 50 % клеток от общего количества. В интерпретации результатов количество клеток, движущихся в НПЭП в различных направлениях относительно электродов в измерительной камере, связывается с концентрацией вируса в клеточной суспензии, Таблица 5. На основе полученной из эксперимента величины разведения исходной вирусной суспензии 1 : 5120 и известного количества эритроцитов $2 \cdot 10^6$ шт/мл в пробирке, давалась оценка количеству вирусов гриппа *A/Aichi/2/68 (H3N1)* в пробе по формуле

$$C_{в} \sim 2 \cdot 10^6 \cdot 5120 \cdot 0,54 \sim 5,1 \cdot 10^9 \text{ шт/мл}$$

Данная оценка согласуется с величиной $10^{9,5}$ шт/мл полученной, с помощью биологического метода - эмбриональных инфекционных доз ЭИД₅₀.

Таблица 5. Количество клеток с положительным и отрицательным диэлектрофорезом в суспензии

Вирус-клеточная пара	Количество клеток с положительным диэлектрофорезом А	Количество клеток с отрицательным диэлектрофорезом В	Фон В/(А+В)	Общее количество клеток (А+В)- (А+В)*фон =D	Отношение клеток с адсорбированными вирусами к общему количеству (В/D)
Эритроциты цыпленка + вирус гриппа <i>A/Aichi/2/68 (H3N1)</i>	46	52	-	85	0,54
Контрольные	45	7	0,13	-	-

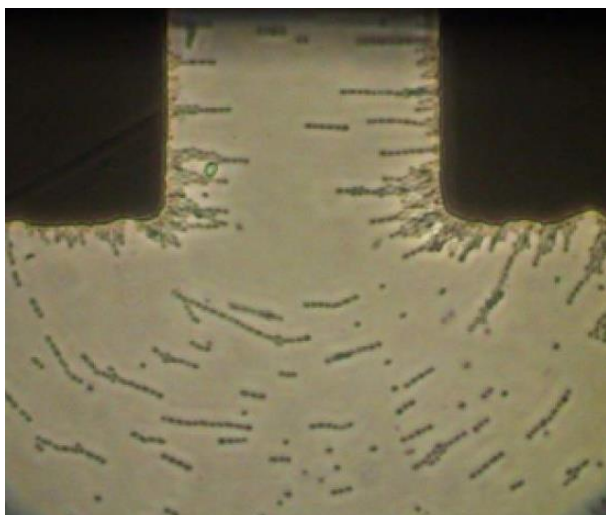
эритроциты цыпленка					
Эритроциты человека + вирус краснухи P-1965	11	15	-	23	0,65
Контрольные эритроциты человека	66	9	0,12	-	-

В разделе 4.2.6. показана инактивация вирусов краснухи и гриппа в растворах с низкой ионной силой (в дистиллированной воде, 0.3 М растворе сахарозы). Исходя из полученных результатов, в работе была сформирована общая генеральная стратегия исследования вирус-клеточного взаимодействия, состоящая из двух основных этапов. Первый этап. Вирусы следует вносить в клеточную суспензию, приготовленную на хорошо зарекомендовавших себя средах, и которые не оказывают на них какого-либо негативного влияния. Второй этап. После экспозиции вирус-клеточной суспензии клетки из нее переводятся в ИР с низкой ионной силой для дальнейшего исследования с помощью ЭОСИК.

В разделе 4.2.7. продемонстрирована возможность манипуляция вирусами методом диэлектрофореза. Представлены фотографии осаждения вируса оспавакцины на острие зонда атомносилового микроскопа *ACM SOLVER P47BIO (NT-MDT, Россия)* методом диэлектрофореза.

В разделе 4.3. исследовано применение ЭОСИК в микробиологии.

В разделе 4.3.1. рассмотрено применение ЭОСИК для экспериментальной оценки влияния антибиотиков (бензилпенициллина) на величину равновесной частоты пенициллин-чувствительного штамма *Bacillus subtilis (Pen^S) B-167*. Бензилпенициллин (*Benzylpenicillin*), оказывает бактерицидное действие за счёт ингибирования синтеза клеточной стенки микроорганизмов. Эта его способность использовалась для получения клеток *Bacillus subtilis* с нарушенной



или отсутствующей клеточной стенкой и исследования их поведения в частотном диапазоне (50÷5000) кГц и напряжением на электродах $U=10$ В, НПЭП, рисунок 14.

Рисунок 14. Бактерии в НПЭП

Наблюдения показали, что равновесная частота клеток, обработанных бензилпенициллином, уменьшалась. Значения равновесной частоты приведены в таблице 6.

Таблица 6. Зависимость значения равновесной частоты f_{p1} в неоднородном переменном электрическом поле для *Bacillus subtilis* B-167

Время экспозиции	2 часа	5 часов
Равновесная частота <i>Bacillus subtilis</i> B-167 + бензилпенициллин (эксперимент) [кГц]	100	100÷200
Равновесная частота <i>Bacillus subtilis</i> B-167 (контроль - без бензилпенициллина) [кГц]	1000	750

Примечание. Относительная погрешность измерения частоты не более $\pm 4\%$

Таким образом, ЭОСИК позволяет исследовать эффективность действия антибиотиков через анализ величины равновесной частоты бактерий.

В разделе 4.3.2. проведена экспериментальная оценка влияния хлорид золота ($AuCl^{-4}$) на величину поляризуемости бактерий *Pseudomonas species*. Численные оценки эквивалентной электрической схемы клетки показали, что трансмембранная наночастица золота шарообразной формы с радиусом $r_{кл}=10^{-8}$ м способна трансформировать электрическое сопротивление мембраны $R_m \sim 10^9$ Ом к величине $R_{Au} \sim 0,73$ Ом. Такая модификация мембраны способна оказывать существенное влияние на величину поляризуемости и равновесной частоты. Клетки, выращенные в питательной среде с добавлением хлорида золота, в НПЭП теряют способность к поступательному движению во всем частотном диапазоне. Отсутствие поступательного движения клеток в НПЭП объясняется равенством $\epsilon_{кл} \sim \epsilon_{сп}$, малыми величинами поляризуемости $a_{кл}$ (1) и силы $\langle \vec{F}_{эл} \rangle$, действующей на нее (2). Вывод: ЭОСИК позволяет исследовать модификацию клеточной стенки бактерий химическими ингредиентами внешней среды.

В разделе 4.4. рассмотрено применение электрооптической системы исследования клеток в области медицины.

В разделе 3.4.1 представлен метод исследования вязкоупругих характеристик (ВУХ) с помощью ЭОСИК.

Обобщенная жесткость $c_{кл}$ клетки находилась из выражения

$$c_{кл} = \frac{\alpha_{кл} \varepsilon_0 E^2}{2 r_{кл} x_m},$$

где; x_m – амплитуда деформации клетки в НПЭП, определяется экспериментально.

Обобщенная вязкость клетки находилась из выражения

$$\eta_{кл} = - \frac{c_{кл} \cdot t_l}{6 \cdot \pi \cdot r_{кл} \cdot \ln|x_m|},$$

где x_m – амплитуда деформации клетки, t_l - длительность радиоимпульса. Частота заполнения радиоимпульса находилась в области в области положительного диэлектрофореза.

Для исследования ВУХ эритроцитов на электроды измерительной ячейки подавались радиоимпульсы длительностью 0,5 с., напряжение $U_m=5\pm 0,2$ В и частотой заполнения 1 МГц.

В разделе 4.4.2. изложены результаты системных исследований ЭОСИК в диагностике патологии сердца. Исследования пациентов с алкогольным и неалкогольным поражением сердца (АПС и НАПС) показали наличие корреляции между тяжестью заболевания и уменьшением амплитуды деформации их эритроцитов в НПЭП, рисунок 15.

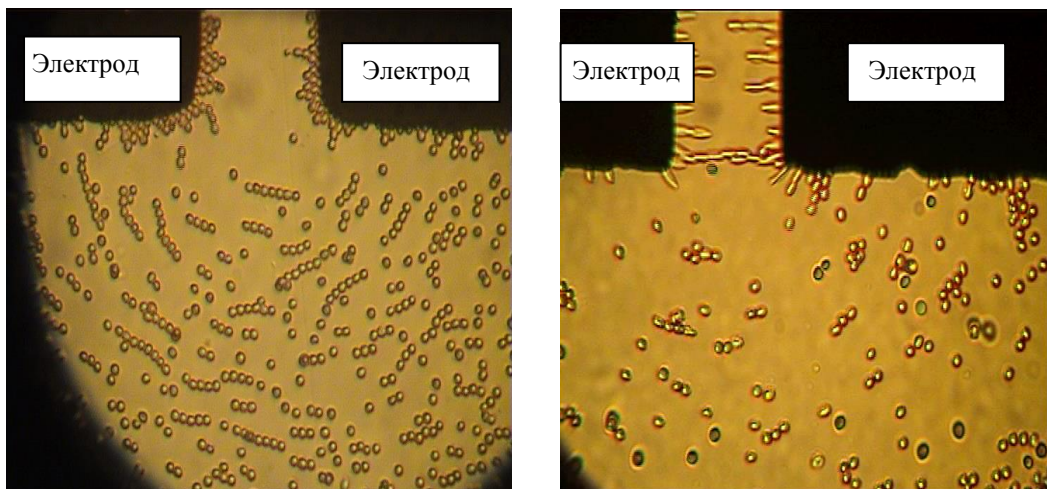


Рисунок. 15. Деформация эритроцитов в неоднородном переменном электрическом поле. а) - отсутствие деформации эритроцитов для пациентов с патологией сердца; б) - характерная деформация эритроцитов для здоровых пациентов

В группе с АПС (27 чел.) обобщенная жесткость эритроцитов составляла $c_{кл} = (1,0 \cdot 10^{-4} \pm 8,3 \cdot 10^{-5})$ Н/м, обобщенная вязкость $\eta_{кл} = (2,4 \cdot 10^{-2} \pm 1,9 \cdot 10^{-3})$ Па·с, средняя амплитуда деформации $x_m = (0,4 \cdot 10^{-6} \pm 0,5 \cdot 10^{-6})$ м, поляризуемость $a_{кл} = 1,4 \cdot 10^{-14} \pm 4,7 \cdot 10^{-15} \text{ м}^3$ на частоте $f = 10^6$ Гц.

Полученные результаты позволили сделать следующие основные выводы:

- при алкогольном поражении сердца наблюдаются увеличение величин обобщенных показателей жесткости, вязкости эритроцитов;
- показатели жесткости, вязкости эритроцитов могут использоваться как дополнительные характеристики в целях диагностики алкогольного поражения сердца.

В разделе 4.4.3. описано применение ЭОСИК в диагностике патологии печени. Обследовались три группы пациентов (мужчины) в возрасте от 35 до 60 лет. Группа сравнения (F0) состояла из 33-х условно здоровых мужчин, у которых клиническими и инструментальными методами патологии печени и не выявлено. Первая группа включала пациентов с первой или второй стадиями фиброза (легкий – невыраженный фиброз – F1, F2). Во вторую группу входили пациенты с третьей или четвертой стадиями фиброза (выраженный фиброз – F3, F4).

Измерения обобщенной жесткости и обобщенной вязкости эритроцитов от пациентов со стадией фиброза F3, F4 печени достоверно отличались от группы сравнения F0 и группы F1, F2. Амплитуда их деформации и скорость поступательного движения относительно электродов на частотах 0,5 и 1 МГц были ниже. Практически все эритроциты необратимо переходили в форму сфероцитов. На частоте 0,5 МГц наблюдалось массовая деструкция клеток. Отмечалась также повышенная способность эритроцитов к образованию агрегатов после перевода эритроцитов в раствор 0,3 М сахарозы. Для этой группы обобщенная жесткость эритроцитов составляла $c_{кл} = 4,3 \cdot 10^{-5} \pm 4,9 \cdot 10^{-6}$ Н/м, обобщенная вязкость $\eta_{кл} = 1,3 \cdot 10^{-2} \pm 1,4 \cdot 10^{-3}$ Па с, амплитуда деформации $x_m = 7,2 \cdot 10^{-7} \pm 0,5 \cdot 10^{-6}$ м, поляризуемость $a_{кл} = 9,0 \cdot 10^{-15} \pm 3,1 \cdot 10^{-15} \text{ м}^3$ на частоте $f = 10^6$ Гц.

В разделе 4.5. представлено применение ЭОСИК в биотехнологии.

В разделе 4.5.1. рассмотрено концентрирование клеток по величине поляризуемости в неоднородном переменном электрическом поле проточной камеры. Скорость поступательного движения $\vec{v}_{кл}$ каждой отдельной клетки в НПЭП находится из уравнения (3)

$$\vec{v}_{кл} = \frac{\frac{1}{2} \cdot Re |\alpha_{кл}| \cdot \epsilon_o \cdot \nabla E_{ср}^2}{6 \cdot \pi \cdot \eta_{ср} \cdot r_{кл}}.$$

Из уравнения следует, что скорость поступательного движения клетки $\vec{v}_{кл}$ прямо пропорциональна величине поляризуемости $Re|\alpha_{кл}|$. Данное выражение положено в основу метода концентрирования и разделения клеток по величине поляризуемости. На рисунке 16 представлены экспериментальные результаты концентрирование клеток в измерительной камере с двумя электродами.

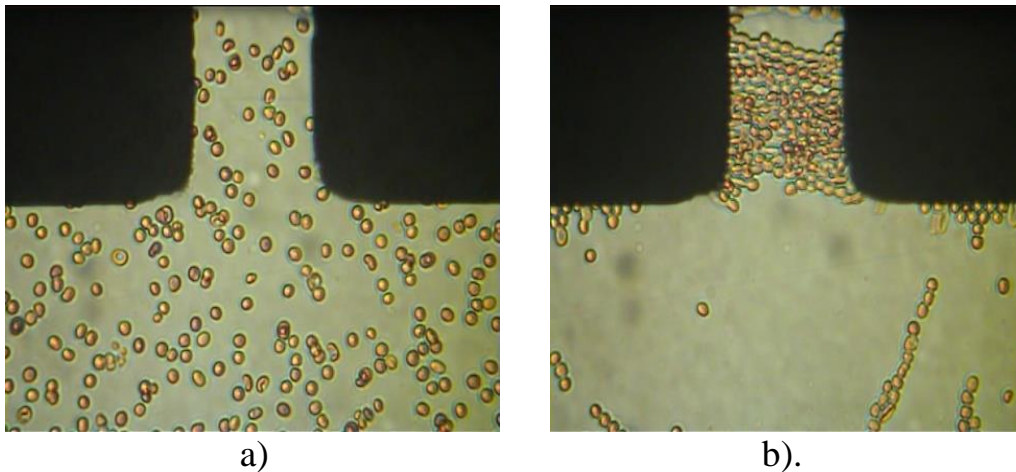


Рисунок. 16. Концентрирование клеток в измерительной камере с двумя электродами. а) - эритроциты между электродами измерительной камеры до процесса концентрирования; б) - концентрация эритроцитов между электродами измерительной камеры

Применялась также разделительная камера с множеством парных электродов, рисунок 17.

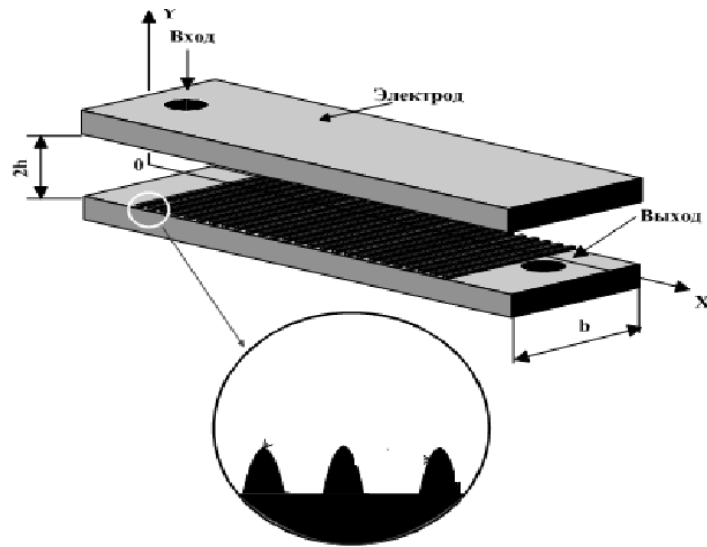


Рисунок 17. Конструкция разделительной ячейки

К каждой паре электродов прикладывается переменное напряжение в частотной области отрицательного диэлектрофореза. Система уравнений поступательного движения клетки в плоскости электродов записывается следующим образом

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dx}{dt} = \frac{\frac{1}{2} \cdot \varepsilon_0 \cdot \alpha_{кл} \cdot (\nabla E_{ср}^2)_x + \frac{4\pi}{3} \cdot r_{кл}^3 \cdot g \cdot (\mu_{кл} - \mu_{ср})}{6 \cdot \pi \cdot \eta_{кл} \cdot r_{кл}} + V_f \\ \frac{dy}{dt} = \frac{\frac{1}{2} \cdot \varepsilon_0 \cdot \alpha_{кл} \cdot (\nabla E_{ср}^2)_y}{6 \cdot \pi \cdot \eta_{кл} \cdot r_{кл}} \end{array} \right. ,$$

где $V_f = 1.5v_o \left(1 - \left(\frac{2y - H}{H}\right)^2\right)$ – скорость вязкого течения

потока клеточной суспензии; v_o – скорость потока жидкости в разделительной ячейке на расстоянии $H/2$ от стенки.

Типичные траектории клетки в частотной области отрицательного диэлектрофореза, полученные численным интегрированием уравнений представлены на рисунке 18.

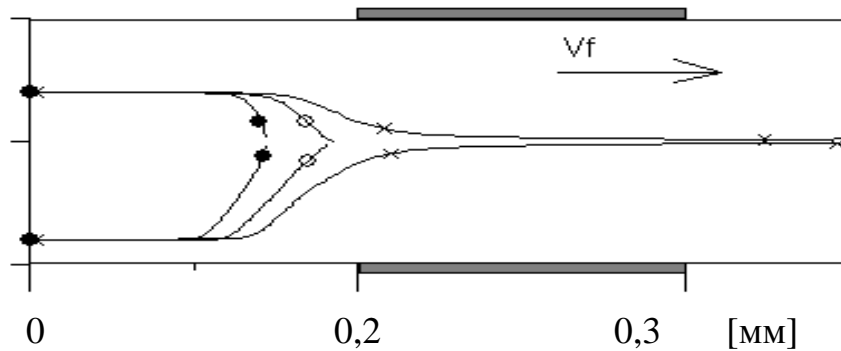


Рисунок 18. Траектории латексных частиц разными коэффициентами поляризуемости: ● - $\alpha_{кл} > 0$ - $\alpha_{кл} > \times$ - $\alpha_{кл}$. Стрелкой указано направление потока суспензии

На рисунке 19 приведена фотография результата процесса разделения эритроцитов при подаче различных напряжений на электроды разделительной ячейки. Численные исследования поведения клеток в разделительной камере и определение оптимальных параметров ее конструкции позволили сделать следующий вывод - выбор конструктивных характеристик ячейки (геометрические размеры), режимы работы (скорость потока микрочастиц, напряжение на электродах) целесообразно рассматривать в сочетании с безразмерным параметром подобия. Параметр подобия равен отношению электрической силы, действующей на клетку, к силе трения в вязкой среде.

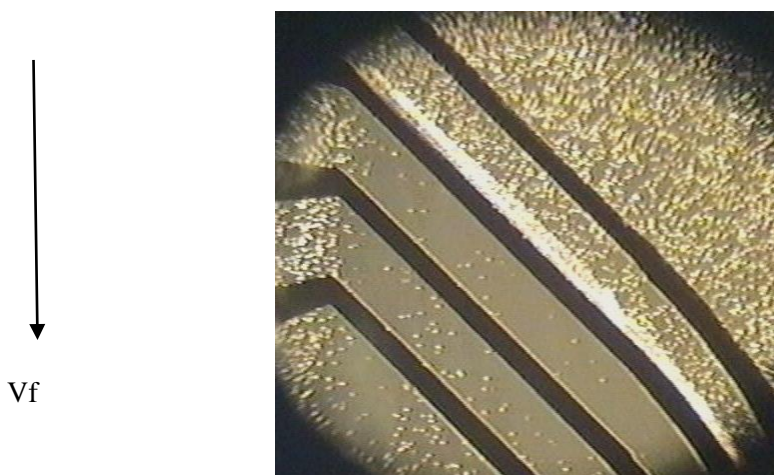


Рисунок 19. Эритроциты человека на второй паре электродов разделительной камеры, установленной вертикально. Напряжение на второй паре электроде $U=10$ В, на остальных $U=0$ В. Стрелкой Vf

указано направление потока суспензии

ВЫВОДЫ

1. Создана электрооптическая системы исследования клетки неоднородным переменным электрическим полем в целях диагностики инфекционных и не инфекционных заболеваний человека. Тестирование системы в условиях медицинского учреждения показало высокую ее эффективность неинвазивного контроля заболеваний печени и сердца. Электрооптическая система исследования клетки позволяет измерять следующие ее характеристики: радиус $r_{кл} - (2 \div 10)$ мкм; скорость поступательного движения относительно электродов $v_{кл} - (0,5 \div 25)$ мкм/с; амплитуду деформации $x_m - (0,5 \div 5)$ мкм; коэффициент объемной поляризуемости $\alpha_{кл} - (10^{-14} \div 10^{-16})$ м³; обобщенную жесткость $c_{кл} - (10^{-3} \div 10^{-6})$ Н/м; обобщенную вязкость $\eta_{кл} - (0,1 \div 0,001)$ Па·с; равновесную частоту - $f_p - (50 \div 10000)$ кГц; электрическую емкость $C_{кл} - 10^{-(12 \div 15)}$ Ф. Относительная погрешность измерения поляризуемости клетки не превышает - $\delta(\alpha_{кл}) \leq 19,5\%$.

2. Разработан метод измерения обобщенной вязкости η_i и обобщенной жесткости эритроцитов. В основе метода лежит измерение амплитуды деформации эритроцита в неоднородном переменном электрическом поле, созданного в измерительной камере электрооптической системы исследования клеток. Получены дополнительные диагностические признаки (обобщенной вязкости и обобщенной жесткости эритроцитов), использование которых позволяет осуществлять неинвазивную диагностику заболеваний печени и сердца человека.

3. Разработан метод измерения коэффициента объемной поляризуемости клетки в неоднородном переменном электрическом поле. Характеризация клетки по признаку поляризуемости отражает присущую ей биологическую уникальность через распределение электрических зарядов по всему клеточному объему.

4. Разработан метод измерения концентрации вирусов в клеточной суспензии в неоднородном переменном электрическом поле.

5. Разработан подход специфической экспресс индикации вируса гриппа с помощью электрооптической системы исследования клеток. Разница между амплитудно-частотными зависимостями

поляризуемости интактной и инфицированной вирусом клетки является основой специфической экспресс индикации вирусов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Бакулина Л.Ф., Фефелов О.В., Чепурнов А.А. Измерение электрической емкости мембраны клеток // Биотехнология. 2001. № 4. С. 64-69.
2. Бакиров Т.С., **Генералов В.М.** Пробоотборник "Ловушка" для частиц биогенного происхождения в космосе // Оптика атмосферы и океана. 2000. Т. 13, № 6-7. С. 598-602.
3. Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Дурыманов А.Г., Порываев В.Д., Топорков В.С. Эквивалентная электрическая схема клетки // Биотехнология. 2000. № 2. С. 53-59.
4. Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Пугачев В.А., Репин В.Е., Куслий А.А., Смолина М.П., Чепурнов А.А. Исследование амплитудно-частотной поляризации биочастиц в ответ на внешние воздействия // Доклады академии наук. 2001. Т. 377, Вып. 3. С. 399-401.
5. Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Топорков В.С. Измерение вязкоупругих характеристик клетки с помощью неоднородного переменного электрического поля // Биотехнология. 1998. № 5. С. 88-96.
6. Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Топорков В.С. Измерение поляризации отдельной клетки в неоднородном переменном электрическом поле // Биотехнология. 1998. № 2. С. 73-82.
7. Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Фефелов О.В. Решение задачи взаимодействия электрических полей с частицами биогенного происхождения // Оптика атмосферы и океана. 2001. Т.14, № 6-7. С. 616-619.
8. Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Чепурнов А.А., Тюнников Г.И., Порываев В.Д. Анализ механизма деполяризации клеток на начальных стадиях вирус-клеточного взаимодействия // Доклады академии наук. 1998. Т. 363, № 2. С. 258-259.
9. 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.

10. **Генералов В.М.**, Бакиров Т.С., Дурыманов А.Г., Медведев А.А., Порываев В.Д., Топорков В.С., Тюнников Г.И., Сергеев А.Н., Петрищенко В.А., Шишкина Л.Н., Фефелов О.В. Исследование вирус-клеточного взаимодействия методом диэлектрофореза // Доклады академии наук. 2002. Т. 383, № 2. С. 256-259.
11. **Генералов В.М.**, Бакиров Т.С., Дурыманов А.Г., Пак А.В., Сухенко Е.П., Кручинина М.В., Курилович С.А., Андреева И.С., Печуркина Н.И. Теоретическое и экспериментальное исследование влияния пор мембраны на амплитудно-частотную зависимость поляризуемости клетки // Биофизика. 2008. Т. 53, Вып. 5. С. 810–816.
12. **Генералов В.М.**, Бакиров Т.С., Пак А.В., Звольский И.Л., Зайцев Б.Н., Дурыманов А.Г., Кручинина М.В., Курилович С.А., Сергеев А.Н. Автоматизированная установка измерения вязкоупругих характеристик эритроцитов // Научные технологии. 2008. Т. 9, № 12. С. 28-33.
13. **Генералов В.М.**, Кручинина М.В., Курилович С.А., Громов А.А. Диэлектрофорез – этапы развития // Технология живых систем. 2012. Т. 9, № 2. С. 3-12.
14. Зайцев Б.Н., Дурыманов А.Г., Бакулина Л.Ф., **Генералов В.М.** Исследование взаимодействия эритроцитов и вирусных частиц методом атомно-силовой микроскопии // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2003. № 7. С. 34-38.
15. Кручинина М.В., Громов А.А., Рабко А.В., Курилович С.А., **Генералов В.М.**, Бакиров Т.С., Шакиров М.М. Патогенетические варианты реологических нарушений у больных, перенесших инсульт // Сибирский медицинский журнал. Томск. 2010. Т. 25, № 2. С. 177-179.
16. Кручинина М.В., Курилович С.А., Громов А.А., **Генералов В.М.**, Бакиров Т.С., Рихтер В.А., Семенов Д.В., Морозов С.В. Алкогольное поражение печени. Взаимосвязь электрических, вязкоупругих характеристик эритроцитов и структуры их мембран // Вестник НГУ. 2008. Т. 6, № 2. С. 96-103.
17. Кручинина М.В., Курилович С.А., Громов А.А., Рабко А.В., Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Пак А.В. Отличия электрических и вязкоупругих свойств эритроцитов при аритмиях алкогольного и неалкогольного генеза // Омский научный вестник. 2005. Т. 1, № 13. С.169-173.

18. Кручинина М.В., Курилович С.А., Паруликова М.В., Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Пак А.В., Звольский И.Л. Электрические и вязкоупругие свойства эритроцитов у пациентов с диффузной патологией печени // Доклады академии наук. 2005. Т. 401, № 5. С. 701-704.
19. Кручинина М.В., Курилович С.А., Паруликова М.В., Бакиров Т.С., Дурьманов А.Г., Пак А.В., Мальченко Д.А., **Генералов В.М.** Изменение электрических и вязкоупругих характеристик эритроцитов пациентов с алкогольным поражением сердца // Вестник НГУ. 2005. Т. 3, №. 1. С. 12-20.
20. Кручинина М.В., Курилович С.А., Паруликова М.В., Громов А.А., Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Пак А.В. Вязкоупругие и электрические характеристики эритроцитов при различной степени фиброза печени // Вестник НГУ. Серия Биология. Клиническая медицина. 2005. Т. 3, №. 4. С. 43-52.
21. Кручинина М.В., Курилович С.А., Светлова И.О., Громов А.А., **Генералов В.М.**, Бакиров Т.С. Диэлектрофорез эритроцитов: новые возможности в диагностике непрямых гипербилирубинемий // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2009. № 3. С. 29-35.
22. Кручинина М.В., Курилович С.А., Громов А.А., **Генералов В.М.** Особенности параметров эритроцитов у пациентов с неалкогольным стеатогепатитом // Вестник НГУ. 2011. Т.9. № 3. С.68-76.
23. Курилович С.А., Кручинина М.В., **Генералов В.М.**, Бакиров Т.С., Рихтер В.А., Семенов Д.В. Электрические параметры и структура мембран эритроцитов при диффузных заболеваниях печени // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2009. Т. XIX, № 2. С. 30-36.
24. Курилович С.А., Кручинина М.В., Громов А.А., **Генералов В.М.**, Бакиров Т.С., Рихтер В.А., Семенов Д.В. Обоснование применения эссенциальных фосфолипидов при хронических заболеваниях печени: динамика электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2010. № 11. С. 46-52.
25. Курилович С.А., Кручинина М.В., Громов А.А., Немцова Е.Г., **Генералов В.М.**, Бакиров Т.С., Шакиров М.М., Рихтер В.А., Семенов Д.В. Опыт применения новых технологий для изучения комплекса параметров эритроцитов при диффузных заболеваниях печени // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2011. Т. 31. №. 6, С. 21-30.

26. Мальченко Д.А., **Генералов В.М.**, Дурыманов А.Г., Бакиров Т.С., Фефелов О.В., Ситников А.Н. Измерение электрической емкости клеточной мембраны методом диэлектрофореза // Оптика атмосферы и океана. 2003. Т. 16, № 05-06. С. 515-518.
27. Медведев А.А. Бакиров Т.С. **Генералов В.М.**, Топорков В.С. Разделение интактных клеток по величине поляризации // Биотехнология. 2000. № 1. С. 89-94.
28. Онищенко Г.Г., Нетесов С.В., Агафонов А.П., Сафатов А.С., **Генералов В.М.**, Буряк Г.А., Сергеев А.Н., Дроздов И.Г. Высокопатогенный птичий грипп: угроза новой пандемии и возможности ей противостоять // Вестн. РАМН. 2006. № 12. С. 36-42.
29. Сергеев А.Н., Сафатов А.С., **Генералов В.М.**, Агафонов А.П., Перова О.В., Буряк Г.А., Нетесов С.В., Дроздов И.Г. Высокопатогенный грипп птиц за рубежом и в России: Стратегия борьбы и профилактики // Проблемы особо опасных инфекций. Саратов. 2006. Вып. 1, № 91. С. 5-10.
30. Ситников А.Н., Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Мальченко Д.А., Фефелов О.В. Измерение вязкоупругих характеристик частиц методом диэлектрофореза // Оптика атмосферы и океана. 2003. Т. 16, № 5-6. С. 512-515.
31. Фефелов О.В., Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Сафатов А.С. Двухчастотный метод измерения коэффициента поляризуемости клеток // Оптика атмосферы и океана. 2002. Т. 15. № 05-06. С. 537-540.
32. Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Фефелов О.В. Пробоотбор биологических частиц с помощью высокочастотных электрических и магнитных полей // Оптика атмосферы и океана. 2002. Т. 15. № 05-06. С. 515-517.

Монография

Генералов В.М., Кручинина М.В., Дурыманов А.Г., Медведев А.А., Сафатов А.С., Сергеев А.Н., Буряк Г.А., Курилович С.А., Громов А.А. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. Новосибирск: Изд-во "ЦЭРИС", 2011. 172 с.

Патенты, полезные модели

1. Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Ведерников Б.Ф., Сергеев А.Н. Система для измерения вязкоупругих и электрических характеристик клеток биологических объектов. Свидетельство на полезную модель № 71439. Опубликовано 10.03.2008. Бюл. № 24.

2. Бакиров Т.С., Бакулина Л.Ф., **Генералов В.М.**, Жуков В.А., Звольский И.Л., Фелелов О.В., Чепурнов А.А., Шишкина Л.Н. Устройство для селективной деструкции биологических объектов. Свидетельство на полезную модель №29932; опубл. 10.06.2003. Бюл. № 16.
3. Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Порываев В.Д., Топорков В.С., Тюнников Г.И., Чепурнов А.А. Способ определения концентрации вирусов в жидком биологическом материале и устройство для его осуществления. Патент на изобретение РФ №2225446, опубл. 10.03.2004. Бюл. № 7.
4. Бакиров Т.С., **Генералов В.М.**, Чермашенцев В.М. Способ концентрирования биочастиц в суспензии. Патент на изобретение РФ 1712856, опубл. 10.05.1997. Бюл. № 13.
5. **Генералов В.М.**, Бакиров Т.С., Пак А.В., Звольский И.Л., Курилович С.А., Кручинина М.В. Способ дифференциальной диагностики заболеваний печени. Патент на изобретение РФ № 2296327, опубл. 27.03.2007. Бюл. № 9.
6. Сухенко Е.П., Бакиров Т.С., Соловьев А.А., **Генералов В.М.**, Васильев Ю.В., Пак А.В. Способ комплексного анализа параметров живых клеток, устройство для его осуществления и его вариант. Патент на изобретение РФ №2357251, опубл. 20.07.2007. Бюл. № 20.