

- реология в сердечно-сосудистой хирургии». – М., 2009. С. 258-259.
6. Mallett V., Cox D.J. Thrombelastography // *British Journal of Anaesthesia*. 1992. Vol. 69 (3). P. 307.
 7. www.haemonetics.com.
 8. Trapani L. Thromboelastography: Current Applications, Future Directions // *Open Journal of Anesthesiology*. 2013. Vol. 3. № 1. PP. 23-27.
 9. Hett D.A., Walker D., Pilkington S.N., Smith D.C. Sonoclot analysis // *British Journal of Anaesthesia*. 1995. Vol. 75. PP. 771-776.
 10. Gum P.A., Kottke-Marchant K., Welsh P.A., Topol E.J. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003. Vol. 41. P. 961.
 11. Born G.V. The aggregation of black platelets // *Physiol.* 1963. PP. 178-195.
 12. Сисла Б. Руководство по лабораторной гематологии. – М.: Практическая медицина, 2011. 352 с.
 13. Luddington R.J. Thrombelastography/thromboelastometry // *Clin. Lab. Haematol.* 2005. Vol. 27. PP. 81-90.
 14. Berney H., O'Riordan J.J. Impedance Measurement Monitors Blood Coagulation // *Analog Dialogue*. 2008. Vol. 42-08.
 15. Столяр М.А., Ольховский И.А. Диагностическое значение определения агрегационной активности тромбоцитов методом импедансометрии. – М.: Тверь, 2005. 227 с.
16. Sibbing D., Stegherr J., Braun S. et al. A double-blind, randomized study on prevention and existence of a rebound phenomenon of platelets after cessation of clopidogrel treatment // *JACC*. 2010. PP. 558-565.

Илья Александрович Базаев,
инженер,

Ангелина Владиславовна Пржиялговская,
инженер,

Павел Алексеевич Руденко,
инженер,

Национальный исследовательский университет «МИЭТ»,
г. Зеленоград,

Андрей Владимирович Тронин,
директор,

ЗАО «БМС-Технология»,

Галина Израилевна Лифшиц,
д-р мед. наук, профессор,

зав. лабораторией персонализированной медицины,
Институт химической биологии

и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН,
г. Новосибирск,

e-mail: ia-bazaev@mail.ru

И.В. Кузнецова, А.Л. Дроздов

Лабораторная установка для изучения клеточных реакций при воздействии импульсного электрического поля высокой напряженности

Аннотация

Статья посвящена описанию модели прибора, предназначенного для исследований влияния электрического поля высокого напряжения на биологические объекты в водном растворе. Приведены диапазоны выходных параметров. Разработана схема реализации устройства, по которой была собрана действующая экспериментальная модель, прошедшая апробацию в реальных лабораторных условиях.

Анализ проблемы и постановка задачи

Электромагнитные поля (ЭМП) – это важный экологический фактор, наряду с другими природными факторами оказывающий существенное влияние на процессы жизнедеятельности организмов. Реакции клеток зависят от их физиологического состояния и способности к адаптации, а также от характера воздействия ЭМП. Установлено, что наибольшую биологическую активность имеют импульсные электромагнитные поля (ИЭМП) [1]. Поскольку разные клетки по-разному реагируют на электрические импульсы, предполагается, что эту особенность можно использовать в терапевтических целях для удаления патологических клеток, не причиняя вреда здоровым тканям. Разрабатываются методики использования ИЭМП для удаления малигнизированных клеток [2]-[4]. В работах, связанных с изучением методик воздействия импульсных электрических полей на малигнизированные клетки, чаще применяются электрические токи высокой напряженности от 1 до 20 кВ/см [5], [6]. Для импульсного ЭМП требуется энергии намного меньше, чем при нагревании; изменения температуры при таком воздействии минимальны, и поэтому ИЭМП относится к нетермическим технологиям [7]. Поскольку электричество легче проходит через жидкости, чем через твердый материал, то обычно ИЭМП используются в жидкой или вязкой среде. Считается, что при воздействии серии электрических импульсов разрушается плазматическая мембрана клеток. При этом происходит электропорация – формирование пор: увеличиваются в размерах имеющиеся поры и возникают новые. Данный процесс может быть как обратимым, так и необратимым. Это зависит от того, является проницаемость мембраны временной

и может ли мембрана восстановиться, или же ее проницаемость постоянна, что может быть причиной разрушения мембраны [8], [9]. Однако механизм повышения проницаемости клеточной мембраны электрическими импульсами в том, что касается их частоты или повторов, понятен не до конца; признается, что эффект зависит от амплитуды, продолжительности и числа импульсов.

Необходимость создания приборов для наглядного изучения и выявления алгоритмов этого и других явлений, связанных с воздействием ИЭМП на клеточном уровне, очевидна. Как правило, клетки находятся в жидкой среде, поэтому актуальна разработка генераторов ИЭМП, приспособленных для экспериментов в водной среде.

Целью рассматриваемой работы было разработать генератор импульсного электромагнитного поля высокого напряжения и апробировать его на живых клетках. Были поставлены следующие задачи: спроектировать и собрать модель генератора импульсного электромагнитного поля; провести испытания работы модели в лабораторных условиях на биологических объектах (гаметы, эмбрионы морского ежа, жабры моллюсков); проанализировать полученные результаты с помощью микроскопических методов.

Реализация модели установки

Описание установки для исследования влияния ИЭМП на клетки, находящиеся в жидкости

Установка для исследования влияния ИЭМП на клетки, находящиеся в жидкости, включает в себя следующие части: генератор ИЭМП высокого напряжения; камеру с проводящей

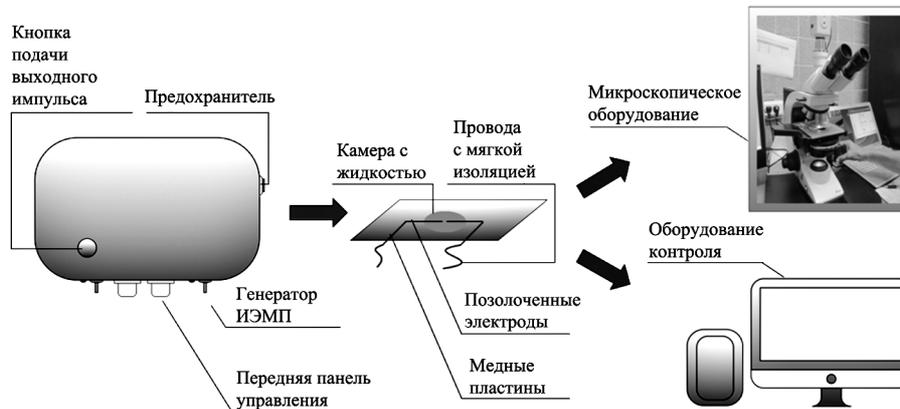


Рис. 1. Блок-схема установки для изучения клеточных реакций при воздействии импульсного электрического поля высокой напряженности на биологические объекты в жидкости

жидкостью, в которой содержатся объекты исследования, с подведенными к ней выводами от генератора; оборудование контроля температуры жидкости в камере.

Описание генератора ИЭМП

Модель установки генератора ИЭМП была сконструирована по принципу катушки Румкорфа, соединенной с умножителем. Данное устройство позволяет получать импульсы малых токов (0,1...0,6 А), но большие по напряжению (0,1...1,2 кВ). Генератор имеет два режима работы: режим ручной подачи импульса и автоматический режим, позволяющий изменять частоту следования импульсов (0,2...20 Гц). На передней части генератора находится панель управления, состоящая из: тумблера включения, индикатора заряда, регулировки величины выходного напряжения, регулировки частоты импульсов, тумблера переключения режимов, индикатора частоты импульсов. На верхней части модели расположена кнопка ручной подачи одиночного импульса. Слева генератор имеет кабель подключения к сети (220 В). С правой стороны расположены выводы, подсоединяющиеся к камере с жидкостью. Генератор оснащен встроенным предохранителем, предотвращающим возможность электрического пробоя и возникновения больших токов на выходе.

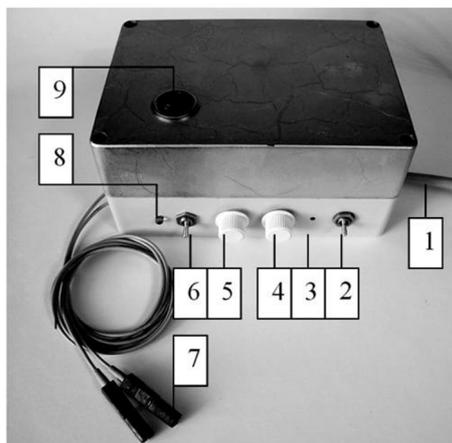


Рис. 2. Внешний вид генератора ИЭМП: 1 – кабель подключения к сети; 2 – тумблер включения; 3 – индикатор заряда; 4 – регулировка выходного напряжения; 5 – регулировка частоты импульсов; 6 – тумблер переключения режимов; 7 – изолированные разъемы; 8 – индикатор частоты импульсов; 9 – кнопка подачи выходного импульса

Описание работы принципиальной электрической схемы генератора ИЭМП

Сетевое напряжение 220 В (рис. 4) поступает на трансформатор Т1 через сетевой тумблер В1. Выходное напряжение с Т1 составляет 23 В. С трансформатора оно попадает на выпрямительный мост VD1-VD4 и поступает на трансформатор,

соединенный по схеме катушки Румкорфа. Для регулировки входного напряжения служит резистор R5, для запуска катушки в ручном режиме используется выключатель В2, который позволяет получить одиночный импульс по нажатию кнопки. Для автоматического режима запуска используется генератор, собранный на транзисторах VT1, VT2. Частота импульсов определяется сопротивлением R3 (0,2...20 Гц). VT3 служит усилителем сигнала генератора. Высоковольтный импульс попадает на умножитель, собранный на элементах VD5-VD9, C1-C5. Выходное напряжение с умножителя подается на электроды через изолированный разъем, соединяющий выводы генератора с выводами камеры с проводящей жидкостью.

Описание устройства стеклянной камеры с проводящей жидкостью

Камера, на которой во время эксперимента находятся клеточные культуры, представляет собой предметное стекло для микроскопа с лункой посередине. По периметру камера изолирована резиновой окантовкой. К краям лунки подведены два позолоченных электрода так, чтобы расстояние между электродами, расположенными друг напротив друга, было равно 1 мм. В нашем прототипе камеры мы применили позолоченные электроды, наименее подверженные разрушительному воздействию морской воды, которая использовалась в качестве проводящей жидкости. К каждому электроду подведена медная пластина длиной 1 см и шириной 2 мм, соединенная с проводом, имеющим разъем подключения к выводам генератора ИЭМП. В ходе экспериментальной работы было выявлено, что данные провода должны обладать следующими свойствами: выдерживать высокое напряжение и иметь тонкую мягкую изоляцию, чтобы не мешать работе экспериментатора с микроскопом. При проектировании установки важно учитывать эти качества.

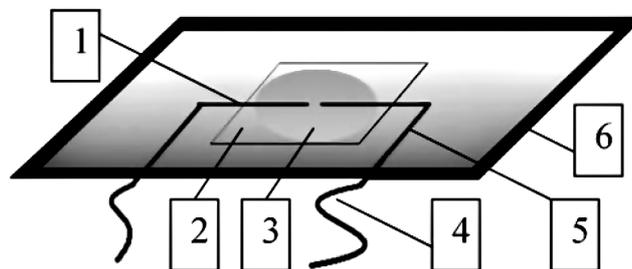


Рис. 3. Камера с проводящей жидкостью: 1 – позолоченные электроды; 2 – покровное стекло; 3 – лунка для жидкости; 4 – провода с мягкой изоляцией; 5 – медные пластины; 6 – резиновая изоляционная окантовка

Микроскопическое оборудование

Устройство камеры, в которой находятся клеточные культуры, позволяет использовать ее для мониторинга изменения состояния клеток непосредственно в момент воздействия элек-

ромагнитными импульсами. Экспериментатор может в реальном времени контролировать ход процесса через световой микроскоп и при необходимости изменять выходные параметры импульсов. Также, если микроскоп оборудован записывающей камерой, есть возможность записывать видео с изменением внешнего вида и поведения клеток до воздействия, в момент воздействия и после воздействия ИЭМП.

Оборудование контроля

Для уточнения данных во время эксперимента можно использовать дополнительное оборудование контроля. В процессе апробации модели мы использовали оборудование контроля температуры в камере с жидкостью и в колбе, где содержалась культура клеток. Такой анализ температуры позволил получить данные о незначительных термических изменениях при воздействии ИЭМП высокого напряжения.

Материалы и методы апробации

После разработки генератора ИЭМП и стеклянной камеры нами была проведена апробация модели в лабораторных условиях. Эксперименты проводились на базе Института биологии моря им. А.В. Жирмунского (ИБМ ДВО РАН). В качестве исследуемых объектов были взяты клетки морских животных (гаметы, эмбрионы морского ежа, жабры моллюсков). Полученные результаты анализировались на световом микроскопе фирмы «Leica DM2500» с предустановленной записывающей камерой «Digital Camera with C-Mount MDCC320» (3,2 pixels, CCD chip). Также был проведен дополнительный анализ результатов на электронном микроскопе «LEO 430». Контроль температуры и выходных параметров импульсов осуществлялся с помощью мультиметра CNY DT-9818.

Схема проведения эксперимента

Генератор ИЭМП высокого напряжения устанавливали на изоляционное покрытие. На микроскопе размещали стеклянную камеру. Микроскопическое оборудование настраивали для работы. Подключали разъемы, соединяющие выводы со стеклянной камеры с выводами генератора ИЭМП, соблюдая полярность. Подключали датчики оборудования контроля к стеклянной камере. С помощью дозаторной пипетки камера наполнялась проводящей жидкостью, в которую помещали исследуемую культуру клеток, располагая ее между торцами электродов. Лунку камеры закрывали предметным стеклом. Затем настраивали режимы и параметры работы генератора. Генератор подключали к сети, включали тумблер подключения. После, в зависимости от установленного режима, проводили воздействие одним или серией импульсов. Часть культуры клеток сразу после воздействия фиксировали для анализа на электронном микроскопе. В течение 10 мин после воздей-

ствия проводили анализ внешних признаков и поведения подвижных клеток на световом микроскопе.

Результаты

Реализация модели показала, что генератор, спроектированный на основе схемы Румпкорфа, соответствует заявленным параметрам и может быть использован для получения кратковременных импульсов высокого напряжения, применяемых в биомедицинских технологиях. Лабораторные испытания подтвердили эффективность установки и возможность ее применения для дальнейшего изучения клеточных реакций при воздействии импульсного электрического поля. Анализ результатов с применением световой и электронной микроскопии демонстрирует наличие изменений в поведении и строении клеток, подвергающихся воздействию ИЭМП. Термический анализ жидкости в стеклянной камере показал незначительные изменения температуры, что подтверждает отсутствие зависимости полученных результатов от перегрева. Наблюдается прямая зависимость изменений в клетках от амплитуды и числа импульсов, воздействующих на них.

Список литературы:

1. Баньков В.И., Макарова Н.П., Николаев Э.К. Низкочастотные импульсные сложнодулированные электромагнитные поля в медицине и биологии. – Екатеринбург: Изд-во Уральского университета, 1992. 100 с.
2. Mi Y., Yao C.G., Li C.X., Sun C.X., Tang L.L., Liu H. In vitro apoptosis effects of Steep Pulsed Electric Fields (SPEF) on human liver cancer cell SMMC-7721 // Chin. J. Biomed. Eng. 2009. Vol. 28. PP. 743-748.
3. Donthula V., Camps-Raga B., Islam N.E., S'lusarz A., Lubahn D.B., Ganjam V. Effects of nanosecond pulsed electric fields on the human prostate cancer cell line Incap // IEEE Trans. Dielec. Elec. Insul. 2009. Vol. 16. PP. 1311-1316.
4. Zygulska A.L., Pawlega J. Assessment of the value of PEF (cisplatin, epirubicin, 5 fluorouracil) in advanced extrahepatic biliary tract and pancreatic cancer [Ocena wartos'ci chemioterapii paliatywnej PEF (cisplatyna, epirubicyna, 5-fluorouracyl) w zaawansowanych rakach zewnatrzwatrobowych dro'gzo'lciovych i trzustki] // Przegl Lek. 2008. Vol. 65. PP. 825-828.
5. Mi Y., Yao C., Li C., Sun C., Tang L., Liu H. Apoptosis induction effects of steep pulsed electric fields (spef) on human liver cancer cell smmc-7721 in vitro // IEEE Trans. Dielec. Elec. Insul. 2009. Vol. 16. PP. 1302-1310.

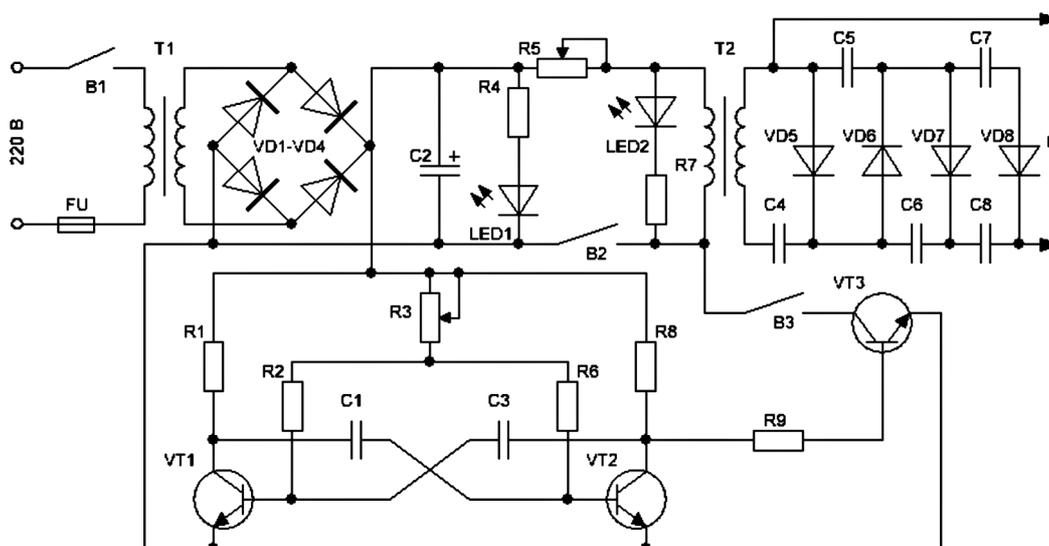


Рис. 4. Принципиальная электрическая схема генератора ИЭМП

6. Nuccitelli R., Pliquett U., Chen X., Ford W., Swanson R. J., Beebe S.J., Kolb K.J.F., Schoenbach H. Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006. Vol. 343. PP. 351-360.
7. Raso J., Barbosa-Canovas G.V. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2003. Vol. 43. P. 265.
8. Mosqueda-Melgar J., Elez-Martinez P., Raybaudi-Massilia R.M., Martin-Belloso O. Effects of pulsed electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid foods: A review // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2008. Vol. 48. PP. 747-759.
9. Ravishankar S., Zhang H., Kempkes M.L. Pulsed electric fields // *Food Sci. Technol. Int.* 2008. Vol. 14. PP. 429-432.

Ирина Вячеславовна Кузнецова,
аспирант,
кафедра эмбриологии,
мл. научный сотрудник,
институт биологии моря ДВО РАН,
Анатолий Леонидович Дроздов,
д-р биол. наук, профессор, гл. научный сотрудник,
Институт биологии моря ДВО РАН,
профессор,
кафедра биоорганической химии и биотехнологии,
Школа естественных наук
Дальневосточного федерального университета,
г. Владивосток,
e-mail: irihun@mail.ru

Ж.Е. Кондратенко, В.Т. Костава, Н.П. Бакулева, И.А. Терещенкова, М.В. Зеливянская, И.Г. Лютова

Оценка механических характеристик биоткани при модификации поверхности линейно-цепочечным углеродом

Аннотация

Перспективным подходом для повышения долговечности биологических протезов клапанов сердца является создание на поверхности биологической ткани покрытий, эффективно маскирующих лиганды, промотирующие кальциноз и деградацию биологического материала. В рассматриваемой работе изучалось влияние покрытий из двумерно-упорядоченного линейно-цепочечного углерода (ДУЛЦУ) на механические свойства перикарда телят, стабилизированного глутаровым альдегидом.

Введение

Кальциноз и деградация биоткани – два ведущих фактора, отрицательно влияющих на долговечность биологических протезов клапанов сердца [1]. Дополнительным негативным обстоятельством служит инфекционный эндокардит имплантированных клапанов [2].

Одним из подходов для комплексного решения проблемы долговечности биопротезов является создание на поверхности биоткани прочных биосовместимых покрытий, эффективно маскирующих/нейтрализующих лиганды, инициирующие кальциноз и деградацию имплантатов [3], и подавляющих воздействие патогенной микрофлоры.

Для решения этих задач мы использовали наноразмерные покрытия на основе двумерно-упорядоченного линейно-цепочечного углерода (ДУЛЦУ).

Технология нанесения ДУЛЦУ-покрытий методом низкотемпературной плазмы на различные подложки, включая биологические объекты, такие как перикард, успешно разрабатывается на физическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова [4].

Рассматриваемая работа посвящена изучению влияния ДУЛЦУ-покрытий на упруго-прочностные характеристики перикарда телят – биоткани, широко используемой для изготовления каркасных и бескаркасных биопротезов клапанов сердца. Публикация является первой из серии статей, посвященных доклиническому изучению свойств биопротезов клапанов сердца, изготовленных из ксеноперикарда с ДУЛЦУ-покрытием.

Исследование выполнено в рамках государственного контракта № 12411.1008799.13.056 от 15 мая 2012 года «Разработка технологии и организация производства жестких и гибких протезов клапанов сердца с открытым центральным потоком, объединенных системой миниинвазивной имплантации». Заказчик – Министерство промышленности и торговли Российской Федерации.

Материалы и методы исследования

Испытываемая биоткань. Контрольная биоткань – перикард телят, забранный при забое животных на скотобойнях

и подвергнутый химической обработке сшивающим агентом – глутаровым альдегидом и детергентом – додецилсульфатом натрия в соответствии с принятым в НЦССХ и утвержденным надлежащим образом технологическим регламентом изготовления ксеноперикардиальных биопротезов [5]. Опытная биоткань представляла собой контрольную биоткань, модифицированную ДУЛЦУ-покрытием по методике, разработанной в МГУ им. М.В. Ломоносова [4].

Изучение упруго-прочностных свойств биоткани. Образцы биоткани подвергали испытаниям на одноосевой разрывной машине модели ZWICK (Z2.5/TN1S), ФРГ, при скорости растяжения 50 мм/мин до полного разрушения образцов. Для испытаний использовали полоски перикарда размером 5 x 60...90 мм из контрольной и опытной биоткани. Учитывая анизотропию структурной архитектоники перикарда [6], [7], полоски биоткани вырезали в осевом и радиальном направлениях по отношению к осям перикардиальной сумки.

По результатам испытаний образцов контрольной и опытной биоткани для каждого образца получали деформационные диаграммы в ортогональных осях σ - ϵ (σ – напряжение растяжения испытываемого образца, МПа; ϵ – относительная деформация, выраженная в процентах от исходной длины испытываемого образца). По деформационным диаграммам определяли и рассчитывали для каждого образца: пределы прочности $\sigma_{пч}$; деформации нарушения сплошности $\epsilon_{нсп}$; деформации разрушения ϵ_{max} ; касательные модули упругости $E_{кас}$. **Контрольная группа** состояла из 28 полосок контрольной биоткани, вырезанных в осевом направлении, и 28 полосок контрольной биоткани, вырезанных в радиальном направлении. **Опытная группа** содержала по 15 полосок опытной биоткани, соответственно вырезанных в осевом и радиальном направлениях.

Статистическая обработка. Поскольку во всех испытанных группах распределение числовых значений результатов исследований было близко к нормальному, полученные данные анализировали методами параметрической статистики. Средние числовые значения соответствующих параметров для каждой из изучаемых групп выражали как $M \pm m$ (M – арифметическое среднее; m – среднеквадратичное отклонение). Ста-