

ТЕОРИЯ И КОНСТРУИРОВАНИЕ

В.Л. Доманский, С.М. Кошелев, И.А. Собакин

Генератор слабых электрических полей для воздействий на культуры стволовых и нейрональных клеток *in vitro*

Аннотация

Создан прибор для воздействий слабыми электрическими полями на культуры *in vitro* стволовых клеток и нейробластов с целью управления процессом дифференциации клеток, а также ростом и ориентацией нейритов. Описаны структура прибора, электрическая схема выходного каскада и его работа. Приведены основные технические характеристики. Дано описание функционирования прибора.

Введение

Изучение процессов дифференциации стволовых клеток и их превращения в специализированные клетки относится к наиболее перспективным направлениям биоинженерии. Установлено, что одним из факторов, способных оказывать управляющие воздействия на эти процессы является электрическое поле (ЭП) в различных модификациях [1]-[3]. Значительные

результаты получены в исследовании воздействий ЭП на течение формирования нейронов и пространственную ориентацию их отростков – нейритов [4]-[6]. Однако прогресс в этих исследованиях тормозится дефицитом стандартизованных инструментов, генерирующих внешние ЭП с требуемыми параметрами и обладающих возможностью управления этими параметрами в ходе исследований [7], хотя попытки создания такой аппаратуры имеются [8].

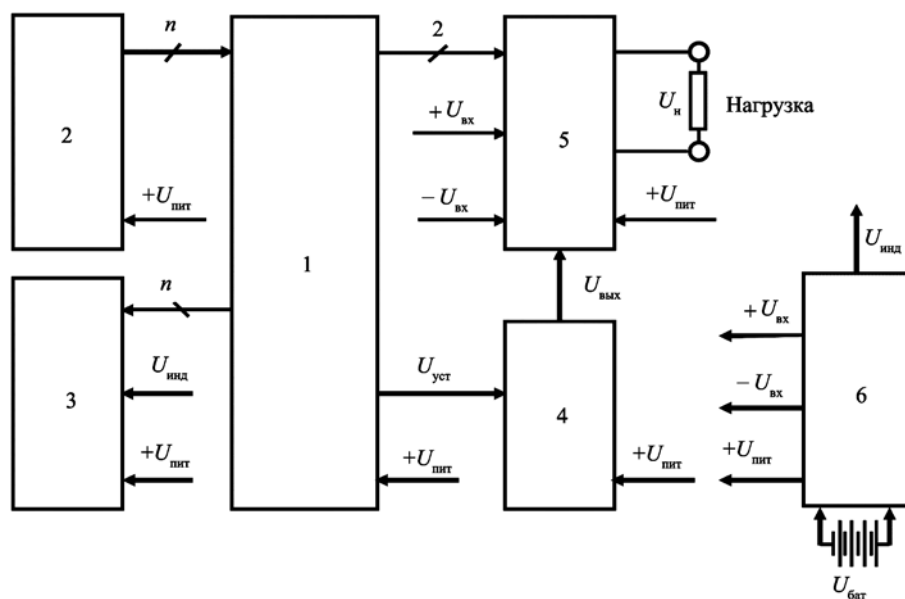


Рис. 1. Блок-схема генератора: 1 – блок управления; 2 – блок ввода; 3 – блок индикации; 4 – формирователь напряжения выходного сигнала; 5 – выходной усилитель; 6 – блок питания; $U_{\text{бат}}$ – напряжение питающей батареи; $+U_{\text{пит}}$, $-U_{\text{пит}}$ – напряжения питания блоков 1-5; $+U_{\text{вх}}$, $-U_{\text{вх}}$ – входные напряжения; $U_{\text{вых}}$ – выходное напряжение; $U_{\text{инд}}$ – напряжение питания индикатора; $U_{\text{уст}}$ – устанавливаемое значение выходного напряжения; $U_{\text{н}}$ – напряжение на внешней нагрузке

Целью данной работы явилось создание специализированного генератора электрических полей – как постоянного, так и импульсного, обладающего возможностью гибкого изменения временных параметров поля, прецизионной установкой напряжения выходных импульсов, их полярности, наличием программируемого таймера для реализации заданного протокола исследований.

Техническая реализация

Для достижения данной цели спроектирован специализированный генератор. Его блок-схема представлена на рис. 1. Ядром прибора является блок управления 1. Он реализован на базе микропроцессора «АТхmega32А4» и связан своими линиями с остальными блоками. Блок ввода 2 представляет собой матрицу тактовых кнопок, периодически опрашиваемую блоком управления 1.

Блок 2 обеспечивает навигацию по меню, выбор программ стимуляции, установку значений выходных параметров, включение и выключение звуковой сигнализации и контроля выходной цепи, ввод команд СТАРТ и СТОП, установку на таймере продолжительности воздействий, пауз между ними и длительности сеанса в целом. Блок индикации 3 представляет собой графический дисплей типа RET012864, связанный с процессором последовательной шины управления по протоколу SPI. На дисплей выводится информация о режиме работы, выбранных программах и параметрах стимулов, отображается состояние источника питания, индицируются показания таймера. Процессор управляет также звуковым генератором (на рис. 1 не показан), сигналы которого сопровождают нажатия кнопок клавиатуры, появления импульсов на выходе стимулятора и извещают о завершении сеанса.

Одно из основных требований, вытекающих из условий применения такого генератора, – это обеспечение стабильности амплитуды напряжения выходных импульсов при изменении импеданса нагрузки – системы «электроды – биологический объект» в весьма широких пределах: от нескольких десятков ом до сотен килоом. Для выполнения этого требования спроектирован выходной усилитель (рис. 2), работающий в режиме источника напряжения. Он обеспечивает стабильность амплитуды напряжения выходных импульсов в интервале 50...2500 мВ при изменении сопротивления нагрузки в интервале 0,2...2000 кОм.

Исходное устанавливаемое значение напряжения выходных импульсов $U_{уст}$ пользователь вводит с блока 2 в цифровой форме в блок управления 1. На его выходе значение $U_{уст}$ представ-

лено уже в аналоговой форме в интервале 0...1,0 В. Далее $U_{уст}$ поступает на вход блока 4 – формирователя уровня выходного напряжения, где оно масштабируется до $U_{вых}$. Это напряжение $U_{вых}$ подается на выходной усилитель (блок 5), а именно на входы 1 и 4 его аналоговых ключей D8.1 и D8.2 (см. рис. 2). Выходы 2 и 3 этих ключей соединены с неинвертирующими входами операционных усилителей D4.2 и D4.3. При запертых ключах D8.1 и D8.2 напряжение на их выходах и соответственно на неинвертирующих входах операционных усилителей D4.2 и D4.3 равно нулю, поскольку эти входы через резисторы R1 и R2 соединены с общей шиной. Операционные усилители D4.2 и D4.3 включены по схеме повторителей, поэтому на их выходах 7 и 8 устанавливаются нулевые напряжения. В результате на нагрузку, подключенной к выходным клеммам K1 и K2, также устанавливается напряжение $U_n = 0$.

Блок управления 1 управляет аналоговыми ключами D8.1 и D8.2 таким образом, что ситуация, при которой оба ключа могут быть одновременно открыты, исключается. Когда на вход 5 ключа D8.2 поступает сигнал «Полярность+», а на вход 4 – напряжение $U_{вых}$, то это напряжение устанавливается и на клемме K1. В это же время нижний по схеме ключ D8.1 заперт. Поэтому на входе 10 операционного усилителя D4.3 и соответственно на клемме K2 устанавливается нулевое напряжение. Таким образом, ток через нагрузку идет от клеммы K1 к клемме K2. Наоборот, когда на вход 13 ключа D8.1 поступает сигнал «Полярность-», этот ключ открывается (при этом ключ D8.2 закрыт), на клемме K2 устанавливается напряжение $U_{вых}$. Поскольку на клемме K1 в это время нулевое напряжение, то направление тока в нагрузке изменяется на противоположное. Величина тока в нагрузке, подключенной к клеммам K1 и K2, определяется напряжением $U_{вых}$ и импедансом объекта.

Напряжение первичного источника питания $U_{бат} = 6$ В. Оно задается установленной в специальном отсеке батареей из четырех щелочных элементов типа АА с суммарным напряжением 6 В либо внешним сетевым адаптером ~ 220 В/6 В. Из напряжения $U_{бат}$ блок питания 6 формирует выходное напряжение трех уровней:

- $U_{пит} = +3$ В – напряжение питания функциональных блоков 1-5;
- $+U_{вх} = +6$ В и $-U_{вх} = -6$ В – напряжение питания выходного каскада;
- $U_{пнд} = +12$ В – напряжение питания LED-подсветки дисплея.

Прибор генерирует однофазные или двухфазные импульсы. Значения всех параметров выходных импульсов: полярно-

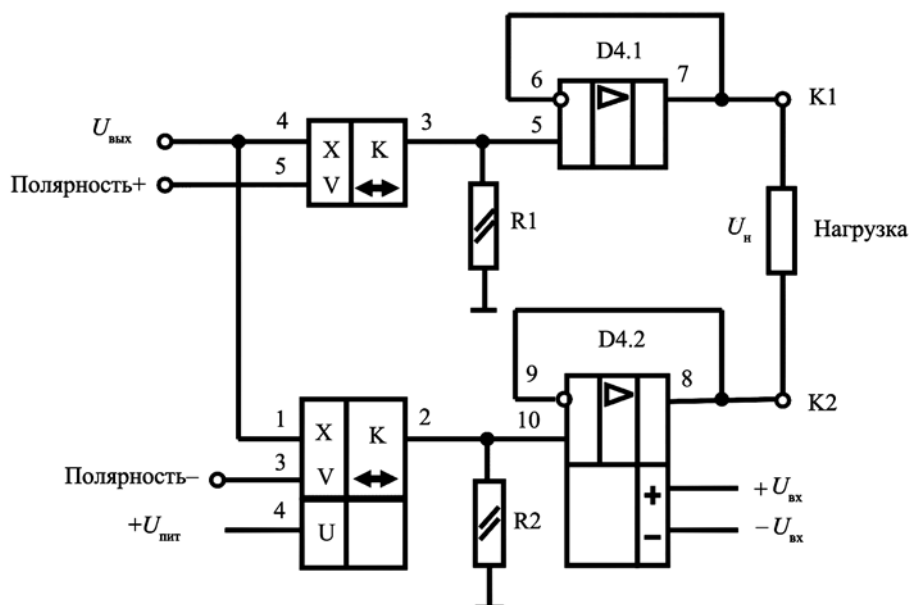


Рис. 2. Электрическая схема блока выходного усилителя

сти, длительности (миллисекунды), частоты следования (герцы), длительности импульсных посылок и пауз (секунды), а также длительности сеанса (в часах и минутах) оператор устанавливает произвольно в пределах, указанных в *табл. 1*. Если установлен режим однофазных импульсов положительной либо отрицательной полярности, а значение частоты следования установлено равным нулю: $F_{\text{имп}} = 0$, то на выходе генератора формируется постоянное напряжение соответствующей полярности.

Основные функциональные характеристики генератора приведены в *табл. 1*.

В генераторе реализованы следующие сервисные функции:

- формирование предупредительного сигнала при попытке установить взаимно несовместимые значения длительности импульсов и частоты их следования;
- включение и отключение звуковых сигналов;
- индикация уровня напряжения блока батарей;
- контроль импеданса системы «электроды – объект» и замкнутости выходной цепи.

Заключение

Создан генератор для воздействий слабыми электрическими полями на культуры *in vitro* стволовых клеток – преддукторов нейронов с целью управления процессом дифференциации клеток, а также ростом и ориентацией нейритов. Разработаны структура прибора, электрические схемы функциональных блоков, в том числе выходного каскада. Приведены основные технические характеристики.

Список литературы:

1. Song B., Gu Y., Pu J., Reid B., Zhao Z., Zhao M. Application of direct current electric fields to cells and tissues in vitro and modulation of wound electric field in vivo // *Nat. Protoc.* 2007. Vol. 2. PP. 1479-1489.
2. Li L., El-Hayek Y.H., Liu B., Chen Y. et al. Direct-current electrical field guides neuronal stem/progenitor cell migration // *Stem Cells.* 2008. Vol. 6. PP. 2193-2200.
3. Yao L., McCaig C.D., Zhao M. Electrical signals polarize neuronal organelles, direct neuron migration, and orient cell division // *Hippocampus.* 2009. Vol. 19. PP. 855-868.

4. Thompson B.C., Richardson R.T., Moulton S.E. et al. Conducting polymers, dual neurotrophins and pulsed electrical stimulation – Dramatic effects on neurite outgrowth // *Journal of Controlled Release.* 2010. Vol. 141. PP. 161-167.
5. Pires F., Ferreira Q., Rodrigues C.A., Morgado J., Ferreira F.C. Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: Expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. Vol. 1850. № 6. PP. 1158-1168.
6. Graves M.S., Hassell T., Beier B.L., Albors G.O., Irazoqui P.P. Electrically mediated neuronal guidance with applied alternating current electric fields // *Ann. Biomed. Eng.* 2011. Vol. 39. PP. 1759-1767.
7. Tang-Schomer M.D. 3D axon growth by exogenous electrical stimulus and soluble factors // *Brain Research.* 2018. Vol. 1678. № 1. PP. 288-296.
8. Xiong G.M., Do A.T., Wang J.K., Yeoh C.L., Yeo K.S., Choong C. Development of a miniaturized stimulation device for electrical stimulation of cells // *J. Biol. Eng.* 2015. Vol. 9. № 14. PP. 1-10.

Валерий Львович Доманский,
канд. биол. наук, ведущ. научный сотрудник,
Сергей Максимович Кошелев,
ведущий инженер,
Игорь Александрович Собакин,
ведущий инженер,
лаборатория биомедицинских приборов,
ФГБУН «Научно-технологический центр
уникального приборостроения РАН»,
г. Москва,
e-mail: domanski@mail.ru

Таблица 1

Технические характеристики

Амплитуда напряжения, мВ	0...2500
Шаг установки напряжения, мВ	50
Длительность импульсов, мс	0,1...5,0
Шаг установки длительности, мс:	
• в диапазоне 0,1...0,5	0,05
• в диапазоне 0,5...1,0	0,1
• в диапазоне 1,0...2,0	0,2
• в диапазоне 2,0...5,0	0,5
Частота импульсов, Гц	10...2000
Шаг установки частоты, Гц:	
• в диапазоне 1...10	1
• в диапазоне 10...100	10
• в диапазоне 100...2000	25
Длительность фронта и спада импульсов, мкс, не более	5,0
Длительность посылки, паузы, сеанса, ч, мин	00 ч : 00 мин – 99 ч : 59 мин