



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
ELEKTROS IR ELEKTRONIKOS FAKULTETAS**

Mindaugas Visockis

Elektrosnoporacijos galimybių tyrimas

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Prof.habil dr. Audris Kopustinkas

KAUNAS, 2015



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
ELEKTROS IR ELEKTRONIKOS FAKULTETAS
ELEKTRONIKOS INŽINERIJOS KATEDRA

ELEKTROSONOPORACIJOS GALIMYBIŲ TYRIMAS

Baigiamasis magistro projektas

Biomedicininė inžinerija, 621H16001

Vadovas

Prof. habil. dr. Audris Kopustinskas
2015 – 06 – 01

Konsultantas

Lekt. Vladas Juška
2015 – 06 – 01

Recenzentas

Doc. dr. Rytis Jurkonis
2015 – 06 – 01

Projektą atliko

Stud. Mindaugas Visockis
2015 – 06 – 01

KAUNAS, 2015



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
ELEKTROS IR ELEKTRONIKOS

(Fakultetas)

Mindaugas Visockis

(Studento vardas, pavardė)

Biomedicininė inžinerija, 621H16001

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

Baigiamojo projekto „Elektrosnoporacijos galimybių tyrimas“
AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 15 m. birželio 1 d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano **Mindaugo Visockio** baigiamasis projektas tema „Elektrosnoporacijos galimybių tyrimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Visockis, M. Elektrosonoporacijos galimybių tyrimas. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas prof. habil. dr. Audris Kopustinskas; Kauno technologijos universitetas, Elektros ir elektronikos fakultetas, Elektronikos inžinerijos katedra.

Kaunas, 2015. 62 psl.

SANTRAUKA

Biotechnologijose ir medicinoje jau keletą dešimtmečių intensyviai vykdomi molekulių, baltymų, DNR plasmidžių pernašos tyrimai į ląsteles ir audinius. Daugeliu atveju siekiama pagerinti onkologinių susirgimų gydymą. Vienas iš galimų būdų pagerinti piktybinių navikų gydymą yra elektrosonoporacija. Tai jungtinis procesas, kurio poveikis piktybinėms ląstelėms šiuo metu nėra iki galo ištirtas. Tačiau laboratoriniais tyrimais nustatyta, kad šis naujas būdas yra efektyvesnis molekulių ar genų įvedimui į ląstelę nei elektroporacijos ar sonoporacijos metodai taikomi atskirai [23, 66, 67].

Tyrimo metu atlikti modeliavimo eksperimentai kurių metu išaiškinta transmembraninio potencialo priklausomybė nuo elektrinio stačiakampio impulso trukmės, sukurto elektrinio lauko stiprumo ir ląstelių geometrinių matmenų. Taip pat po ultragarso poveikio atlikti ląstelės membranoje prasivėrusių porų spindulio priklausomybės nuo terpės temperatūros simuliaciniai skaičiavimai. Taip pat buvo atliktas ląstelės ir jos organelių dažninių ir fazinių charakteristikų tyrimas.

Eksperimentinių tyrimų metu buvo išmatuoti ląstelių suspensijos impedansai ir talpumas prieš ir po elektroporaciją, sonoporaciją ir elektrosonoporaciją. Įvertinta terpės talpumų įtaka terpės impedanso pokyčiui. Po eksperimento atlikta citometrinė analizė parodė didesnę ląstelių gyvybingumą ir didesnę kalceino išnašą po elektrosonoporacijos, nei po elektroporacijos ar sonoporacijos taikomų atskirai.

Reikšminiai žodžiai

Elektroporacija, sonoporacija, elektrosonoporacija, transmembraninis potencialas

Visockis, M. Investigation of electrosonoporation efficiency: Master's work in Biomedical Engineering / supervisor dr. prof. A. Kopustinskas; Kaunas University of Technology, Faculty of Electric and Electronics, Department of Electronics Engineering.

Kaunas, 2015. 62 p.

SUMMARY

It is already several decades, since the scientists of biotechnology and medicine have been performing various examinations on molecules, protein, DNA plasmid delivery to the tissues and cells. Most of the times, these efforts are put in order to improve the treatment of oncological diseases. One of the possible ways to improve the treatment of malignant tumors is electrosonoporation. It is a joint process, however, there is still a lack of information, that would fully explain its effects on malignant cells. However, several studies have shown that this innovative method is more effective while entering molecules or genes into the cell than doing it by electroporation and sonoporation methods separately [23, 66, 67].

The investigation and simulation which were carried out, showed the dependence of transmembrane potential on electric rectangular pulse duration, strength of electric field and the geometric dimensions of the cells. Frequency response and phasal dependencies of cell and cell organel were examined.

Experimental studies were conducted to measure suspension and capacitive impedance of the cell before and after electroporation, sonoporation and electrosonoporation. The influence of capacitance of suspension on impedance change of suspension was evaluated. After the experiment had been carried out, cytometric analysis indicated greater viability of cells and bigger calcein fluorescence after electrosonoporation than after electroporation or sonoporation separately.

Keywords

Electroporation, sonoporation, electrosonoporation, transmembrane potential

Santrumpų sąrašas

| | |
|--------------|---|
| HV | Aukštos amplitudinės įtampos stačiakampis impulsas |
| LV | Žemos amplitudinės įtampos stačiakampis impulsas |
| TRMBP | Transmembraninis potencialas |
| MB | Mikroburbulas |
| CHO | Kinijos žiurkėno kiaušidžių ląstelė |
| UG | Ultragarsas |
| FBS | Fetalino jaučio serumas (angl. Fetal bovine serum) |
| PNP | Neigiamas akustinis slėgis |
| BNC | Kabelio jungtis (angl. Bayonet Neill–Concelman) |
| USB | Išorinė sąsaja (angl. Universal Serial Bus) |
| IRE | Negrižtama elektroporacija (angl. irreversible electroporation) |
| EP | Elektroporacija (angl. electroporation) |
| DNR | Deoksiribonukleo rūgštis (angl. DNA – Deoxyribonucleic acid) |
| ECT | Elektrochemoterapija (angl. electrochemotherapy) |

TURINYS

| | |
|--|----------------|
| ĮVADAS..... | 9 ¹ |
| 1. MEDŽIAGŲ TRANSPORTAS PER BIOLOGINĘ MEMBRANĄ | 11 |
| 1.1. Medžiagų pernašos būdai ląstelėje..... | 11 |
| 1.1.1. Pasyvioji pernaša..... | 11 |
| 1.1.2. Aktyvioji pernaša | 11 |
| 1.1.3. Pernaša keičianti ląstelių struktūrą | 12 |
| 1.2. Bioelektriniai ląstelės potencialai | 12 |
| 1.2.1. Ramybės potencialas..... | 12 |
| 1.2.2. Veikimo potencialas | 13 |
| 1.2.3. Elektrocheminių potencialų skirtumas..... | 14 |
| 1.3. Elektroporacijos proceso analizė..... | 16 |
| 1.3.1. Elektrinių impulsų įtaka ląstelės membranai..... | 16 |
| 1.3.2. Ląstelės membranos laidžiųjų porų susidarymas | 16 |
| 1.3.3. Grįžtama ir negrįžtama elektroporacija | 18 |
| 1.3.4. Transmembraninis potencialų skirtumas..... | 19 |
| 1.3.5. Elektrinio potencialo gradientas..... | 20 |
| 1.4. Sonoporacijos proceso analizė | 21 |
| 1.4.1. Kavitacija..... | 21 |
| 1.4.2. Sonoporacijos efektyvumo įžvalgos | 22 |
| 1.4.3. Mikroburbulo sąveika su ląstele | 23 |
| 1.4.4. Sonoporos atsiradimo tikimybės skirstinys..... | 25 |
| 2. LAŠTELĖS TRANSMEMBRANINIO POTENCIALO TYRIMAS | 27 |
| 2.1. Ląstelės ekvivalentinės grandinės modelis | 27 |
| 2.2. Transmembraninio potencialo laikinė analizė..... | 29 |
| 2.3. Ekvivalentinio grandinės modelio simuliaciniai tyrimai..... | 30 |
| 2.4. Transmembraninio potencialo dažninės ir fazinės priklausomybės | 32 |
| 2.5. Transmembraninio potencialo priklausomybė nuo impulso trukmės | 35 |
| 2.6. Transmembraninio potencialo priklausomybės nuo ląstelės skersmens | 39 |
| 2.7. Transmembraninio potencialo priklausomybė nuo elektrinio lauko stiprumo | 41 |
| 2.8. Sonoporų dydis plazminėje ląstelės membranoje | 43 |
| 3. MEDŽIAGOS IR METODAI | 46 |
| 3.1. Ląstelės | 46 |
| 3.2. Mikroburbulai | 46 |
| 3.3. Ultragarso poveikio aparatūra..... | 47 |
| 3.4. Ultragarso generavimo sistema | 47 |
| 3.5. Elektroporatorius..... | 48 |
| 3.6. Tyrimo atlikimo eiga..... | 49 |
| 3.7. Kalceino išnašos nustatymas..... | 50 |
| 4. ELEKTROSONOPORACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI..... | 52 |
| 4.1. Kalceino išnašos rezultatai..... | 52 |
| 4.2. Impedanso matavimo rezultatai | 53 |

| | |
|---|----|
| 4.3. Įtampos ir srovės matavimas..... | 55 |
| 5. IŠVADOS..... | 56 |
| 5.1. Tyrimą apibendrinančios išvados..... | 56 |
| 5.2. Galimos tolimesnių tyrimų kryptys..... | 57 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS..... | 58 |
| MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DARBO TEMA SĄRAŠAS..... | 63 |
| PRIEDAI..... | 64 |
| Priedas 1. Sonoporos spindulio modeliavimo programos tekstas..... | 64 |

¹ Į lapų skaičių taip pat įeina titulinis ir antraštinis lapas, autoriaus akademinio sąžiningumo deklaracija, santraukų ir santrumpų lapai, bei turinys. Bet puslapius numeruoti pradedama „IVADO“ lapu.

IVADAS

Darbo aktualumas

Žmogaus kūną sudaro trilijonai ląstelių, susijungdamos tarpusavyje jos sudaro audinius, o šie savo atžvilgiu organus. Kiekvieną ląstelę gaubia apsauginis apvalkalas vadinamas plazmine membrana, kuri saugo ląstelę nuo žalingų išorinės aplinkos pokyčių. Tuo pačiu membranos suteikia ląstelėms formą, bei padeda apsirūpinti reikalingomis maisto medžiagomis ir pašalinti susidariuses cheminių reakcijų atliekas. Todėl galime teigti, kad viskas žmogaus organizme prasideda nuo ląstelės, o ląstelę sauganti membrana labai svarbi jos gyvybinių funkcijų palaikymui.

Elektriniu požiūriu plazminės membranos tarsi plonas izoliatorius gaubiantis ląstelę, o tuo pačiu iš visų pusių apsuptas elektrolito (citoplazmos). Pastebėta, kad paveikus ląstelės membraną išoriniu elektriniu lauku, membranos paviršiuje įvyksta elektrinių krūvių persiskirtymas, kurio dėka padidėja membranos laidumas molekulėms, kurios natūralių pernašų metu pro membraną nepraeina.

Šis elektrinio lauko poveikis pavadintas elektroporacija, o metodo taikymas suskirstytas pagal elektrinio lauko pobūdį į grįžtamą elektroporaciją ir negrįžtamą. Šiuo metu geri grįžtamos elektroporacijos naudojami rezultatai pasiekti chemoterapinių vaistų įvedime į naviko ląsteles (elektrochemoterapija), didesnis pernašos efektyvumas pasiekiamas genų terapijoje (DNR elektropernaša), taip pat siekiama šio metodo dėka sukurti neinvazinius vaistų įvedimo būdus [74]. Negrįžtamos elektroporacijos rezultatai dar daugiau žadantys. Šiuo metu labai puikūs rezultatai pasiekti naudojant „Nanoknife“ sisteminių piktybinių navikų gydymą. Šiuo metodu prostatos navikai gydomi su 95 % pasveikimo tikimybe.

Sonoporacijos metodas pagrįstas mikroburbulų kavitacija akustiniame lauke. Taikant sonoporacijos metodą pastebimai padidėja ląstelės membranos laidumas, todėl į ląstelę galima įnešti tokias molekulas kaip prieš vėžinį vaistą bleomiciną. Yra pastebėta, kad taikant sonoporaciją chemoterapijos metu, reikia tūkstančius kartų mažesnių bleomicino dozių norint nužudyti vėžinę ląstelę. Taip pat yra sumažinamas ir nepageidautinas citoksinis poveikis nesonoporuotoms sveikoms ląstelėms [73]. Kaip ir elektroporacija, sonoporacija taip pat yra taikoma DNA plasmidžių pernašai.

Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis (PSO), prognozuojama, kad iki 2025 m. kasmet pasaulyje onkologinėmis ligomis susirgs 20 mln. žmonių, o tai yra 40 % daugiau nei 2014 m. Užregistruota, kad 2012 m. buvo 14 mln. naujų vėžio atvejų, o apytikslis neišgyvenusių žmonių skaičius buvo 8,2 mln. Jeigu tendencija išliks panaši per ateinančius du dešimtmečius kasmet mirstančių skaičius gali išaugti iki 13 mln [75]. Norint padidinti onkologinių susirgimų gydymo

efektyvumą, būtina tęsti pradėtus tyrimus, bei ieškoti naujų metodų, galinčių sumažinti nuo šios ligos mirštančiųjų skaičių.

Vienas iš galimų būdų pagerinti piktybinių navikų gydymą yra elektrosonoporacija. Tai jungtinis procesas, kurio poveikis piktybinėms ląstelėms šiuo metu nėra iki galo iširtas. Tačiau laboratoriniais tyrimais nustatyta, kad šis naujas būdas yra efektyvesnis molekulių ar genų įvedimui į ląstelę nei elektroporacijos ar sonoporacijos metodai taikomi atskirai [23, 66, 67].

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas – atlikti elektrosonoporacijos metodo tyrimą. Tikslui pasiekti išskelti uždaviniai:

1. Atlikti literatūros šaltinių analizę;
2. Sumodeliuoti ląstelės membranos indukuotąjį transmembraninį potencialą;
3. Sumodeliuoti ląstelės organelių membranų indukuotąjį transmembraninį potencialą;
4. Atlikti sonoporų dydžio priklausomybės nuo terpės temperatūros skaičiavimus;
5. Sumodeliuoti dažnines ir fazines ląstelės ir jos organelių membranų priklausomybes;
6. Atlikti eksperimentinius elektroporacijos, sonoporacijos ir elektrosonoporacijos tyrimus;
7. Atlikti matavimus reikalingus pagal eksperimentų pobūdį;

Uždaviniams spręsti panaudotos priemonės

Modeliavimui realizuoti ir tirti buvo naudojamas inžinerinių ir mokslinių skaičiavimų paketas Matlab (Mathworks Inc. Natickas, Masačusetsas, JAV). Eksperimentiniai elektroporacijos, sonoporacijos ir elektrosonoporacijos tyrimai buvo atlikti VDU gamtos mokslų fakulteto biofizikinių tyrimų laboratorijoje, bendradarbiaujant su laboratorijos tyrėjais.

1. MEDŽIAGŲ TRANSPORTAS PER BIOLOGINĘ MEMBRANĄ

1.1. Medžiagų pernašos būdai ląstelėje

Ląstelė yra atvira ir funkciškai suderinta sistema [1]. Kiekvieną ląstelę gaubia plona apie 10 nm plėvelė, kuri vadinama membrana [2] *Išorinė* arba *citoplazminė* membrana skiria ląstelę nuo aplinkos [2]. *Vidinė* arba *endoplazminė* membrana dalina ląstelės vidinę ertmę į atskiras, mažesnes ertmes, sudarydama viena nuo kitos atskirtas sritis, kuriose yra atskiri ląstelės *organoidai*, turintys tam tikrą struktūrą ir atliekantys jiems būdingas funkcijas [2]. Ląstelė naudoja daug medžiagų pernašos priemonių, kurias galima skirstyti į tris pagrindines rūšis: pasyviąsias, aktyviąsias ir pernašas susijusias su ląstelės struktūrų kitimu [1].

1.1.1. Pasyvioji pernaša

Tai pernašos metodai, kai medžiagų pernešimas vyksta dėka energijos, sukonzentruotos kokiame nors gradiente [2]. Organizme būdingi trys pagrindiniai gradientai, nusakantys atitinkamą pasyvaus medžiagų pernešimo pro membraną būdą [2]:

- ❖ koncentracijos gradientas lemia *difuziją*;
- ❖ osmosinis gradientas – *osmosą* ;
- ❖ hidrostatinio skysčių slėgio gradientas – *filtraciją*.

Šie reiškiniai natūraliai lemiami antrojo termodinamikos dėsnio – medžiagos juda gradientų išnykimo kryptimi [1,2].

1.1.2. Aktyvioji pernaša

Pernašos būdai, kurių metu naudojama laisvoji energija [1]. Aktyvaus transporto metu vyksta medžiagų pernešimas pro membraną prieš koncentracijos gradientą – iš srities su maža medžiagos koncentracija į sritį su didele koncentracija [2]. Aktyvus transportas organizmo ląstelėse sukuria ir palaiko gyvybiniai veiklai būtinus Na^+ , K^+ , Ca^{2+} bei kitų jonų koncentracijų gradientus. Aktyvų transportą sąlygoje membranos integraliniai baltymai, kurie dažnai vadinami *jonų siurbliais*, pvz.: Na^+/K^+ , Ca^{2+} ir kiti siurbliai. Šie pernašos būdai yra labai svarbūs aiškinant gyvybę, nes ląstelės yra ryškiai nepusiausviros termodinaminės sistemos, ir jų organizuotumui, gradientams palaikyti būtina laisvoji energija. Šie gyvybei būdingi egzocitozės ir endocitozės procesai, susiję su

membranų virsmams, dideliais pokyčiais, kai į ląstelę įnešama, ląstelės viduje pernešama arba iš ląstelės išmetama stambūs objektai ar medžiagų kiekiai [1].

1.1.3. Pernaša keičianti ląstelių struktūrą

Taip pat pernaša gali įvykti naudojant išorinį poveikį. Biotechnologijose ir medicinoje dažniausiai naudojami būdai, tai **elektroporacija** ir **sonoporacija**. Šiuo metu tiriamas jungtinis metodas – **elektrosonoporacija**. Šių procesų metu pernašai įvykti padeda elektrinis ir akustinis išoriniai laukai arba šių laukų poveikio kombinacija. Elektrinis ir akustinis laukai padeda pernešti į ląstelę tokias struktūras kurios negali būti pernešamos per membraną įprastų pernašų metu.

1.2. Bioelektriniai ląstelės potencialai

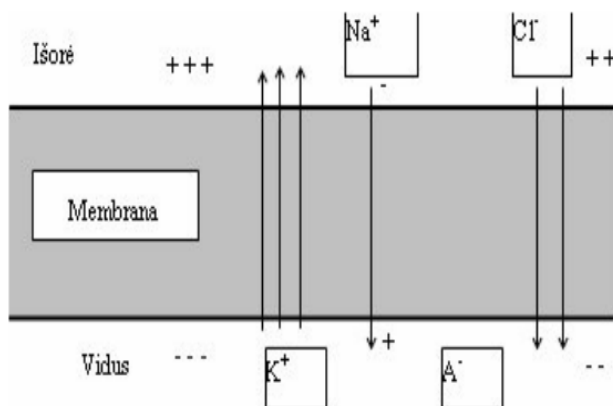
1.2.1. Ramybės potencialas

Ląstelė gali būti ramybės ir sujaudinimo būsenos. Pastebėta, kad gyvos ląstelės, esančios ramybės būsenos, tarp vidaus ir išorės yra gana stabilus elektrinių potencialų skirtumas – **ramybės potencialas** E_R [1].

Ramybės potencialo susidarymą lemia šie pagrindiniai veiksniai [2]:

- ❖ netolygus jonų pasiskirstymas membraną supančiuose tirpaluose, tiek ląstelės viduje tiek išorėje;
- ❖ skirtingas membranos pralaidumas įvairiems jonams.

Daugumai ląstelių būdinga didelė K^+ jonų koncentracija ląstelių viduje ir maža ląstelių išorinėje terpėje, o Na^+ jonų koncentracija maža ląstelių viduje ir didelė jų išorėje. Tokių jonų pasiskirstymą abipus membranos sąlygoje Na^+/K^+ siurblys. Na^+ ir K^+ jonų nevienodas pasiskirstymas įtakoja ir kitų jonų koncentracijos gradientus. Cl^- jonų koncentracija maža ląstelės viduje ir didelė išorėje.



1.1 pav. Membranos laidumas K^+ , Na^+ , Cl^- jonams ir šių jonų įtaka ramybės potencialui [1]

Vykstant jonų difuzijai pagal koncentracijos gradientą, membranos išoriniame paviršiuje susidaro teigiamą krūvį turinčių jonų persvara, o membranos vidinis paviršius tampa elektriškai neigiamas išorinio paviršiaus atžvilgiu. Tuomet abipus membranos susidaro potencialų skirtumas. Jeigu jonų difuzija vyktų negyvoje sistemoje, išorės ir vidaus koncentracijos galiausiai susilygintų ir susidaręs potencialų skirtumas išnyktų. Citoplazma ir ląstelę supanti aplinka yra elektriškai neutralios, nes teigiamų jonų koncentracija ląstelės viduje ir jos išorėje yra lygi neigiamų jonų, esančių šiose srityse, koncentracijai.

Ramybės būsenoje membrana pralaidi tik K^+ , abipus membranos susiradęs potencialų skirtumas randamas iš *Nernsto lygties* [2]:

$$\varphi_K = \frac{RT}{z_K \cdot F} \cdot \ln \frac{C_{K,o}}{C_{K,i}}, \quad (1.1)$$

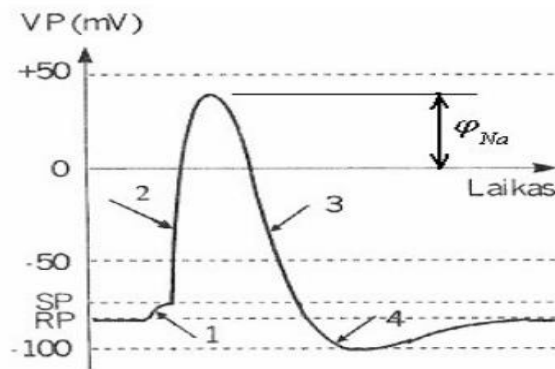
čia R – universalioji dujų konstanta, T – absoliutinė temperatūra, F – Faradėjaus skaičius. Aplinkos temperatūra $37\text{ }^\circ\text{C}$ ($310\text{ }^\circ\text{K}$), kalio jonų valentingumą z_K vienetui, kalio jonų koncentraciją aplinkoje $C_{K,o} = 5,5 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$, o citoplazmoje $C_{K,i} = 150 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$, gauname, kad kalio pusiausvyros potencialas lygus $-88,3\text{ mV}$.

Visų ląstelių K^+ pusiausvyrinis potencialas yra neigiamas, nes intraląstelinė K^+ koncentracija žymiai viršija ekstraląstelinę koncentraciją (apie 30 kartų). Įvairių ląstelių ramybės potencialas yra neigimas ir svyruoja nuo -40 mV iki -100 mV [2].

1.2.2. Veikimo potencialas

Staigus impulsinis membraninio potencialo kitimas esant sudirginimui vadinamas *veikimo potencialu* - E_v [1,2]. Sujaudintoje ląstelėje pirmiausiai vyksta membranos *depolarizacija*, vėliau membranos *depolarizacijai* pasiekus slenkstinį lygį, membranos laidumas Na^+ jonams pradeda staigiai didėti – prasideda membranos *regeneracinė depolarizacija*. Jaudinimo metu membranos laidumas Na^+ jonams padidėja apie 500 kartų [2]. Teigiamas membraninis potencialas sujaudinimo metu vadinamas Na^+ pusiausvyruoju potencialu (φ_{Na}). Kai membranos vidus įgauna teigiamą krūvį, o susidaręs elektrinis laukas pradeda priešintis Na^+ jonų difuzijai į ląstelės vidų. Todėl Na^+ jonų srautas į ląstelės vidų staigiai sumažėja [2].

Pasibaigus depolarizacijai K^+ jonų difuzija iš ląstelės vidaus į ląstelės išorę, labiau didina šių jonų koncentraciją, dėl to Na^+ jonų koncentracija, dėl sumažėjusio šių jonų srauto tolygiai mažėja. Ląstelės vidinėje membranos pusėje potencialas tampa vis labiau neigiamas ir savo skaitine verte artėja prie ramybės potencialo reikšmės, kol įvyksta membranos *repolarizacija*.



1.2 pav. Veikimo potencialas (VP) [2]; RP – ramybės potencialas; SP – slenkstinis potencialas; 1 – pradinė regeneracija; 2 – regeneracinė depoliarizacija; 3 – repoliarizacija; 4 – hiperpoliarizacija

Taigi galima teigti, kad veikimo potencialo susidarymą ląstelės membranoje lemia du pasyvūs jonų srautai. Na^+ jonų srautas į ląstelės vidų sukelia membranos depoliarizaciją, o K^+ jonų srautas į ląstelės išorę lemia ramybės potencialo atkūrimą [2].

Po repoliarizacijos fazės gali atsirasti potencialų skirtumo abipus membranos padidėjimas – *hiperpoliarizacija*.

Taip pat atsižvelgiant į tai, kad šie jonų srautai skiriasi laiko atžvilgiu, o jų postūmis laike sukelia veikimo potencialo susidarymą, veikimo potencialą membranoje galima aiškinti kaip elektrinio kondensatoriaus C_M įkrovimą, bei jo išsikrovimą.

1.2.3. Elektrocheminių potencialų skirtumas

Netolygus jonų koncentracijų persiskirstymas ląstelės viduje ir išorėje, kaip rodo Nernsto lygtis, sukuria elektrinių potencialų skirtumą. Tačiau Nernsto lygtis taikoma vienos rūšies jonams. Kadangi ląstelėje vienu metu veikia daug įvairių jonų, todėl dėl skirtingų jų koncentracijų ir netiesinių sąveikų, elektrinių potencialų skirtumui - ramybės potencialui įvertinti naudojama Goldmano, Hodžkino ir Katco formulė. Ši formulė vertina trijų jonų - K^+ , Na^+ , Cl^- įtaką bioelektrinių potencialų genezei [1]:

$$E = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{P_K \cdot [K^+]_o + P_{Na} \cdot [Na^+]_o + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_i}{P_K \cdot [K^+]_i + P_{Na} \cdot [Na^+]_o + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_o} \quad (1.2)$$

Ramybės ir sujaudinimo būsenos rodo jonų laidumo koeficientai P_K, P_{Na}, P_{Cl} . Empiriškai pamatuoti santykiniai laidumo koeficientų dydžiai ramybės potencialui nustatyti:

$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,45 \quad (1.3)$$

o sujaudinimo, veikimo potencialo didžiausiam dydžiui nustatyti:

$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 20 : 0,45 \quad (1.4)$$

Laikoma, kad ramybės būsenos metu ląstelės elektrinių potencialų dydį lemia $[K^+]$ jonai ir todėl [1]:

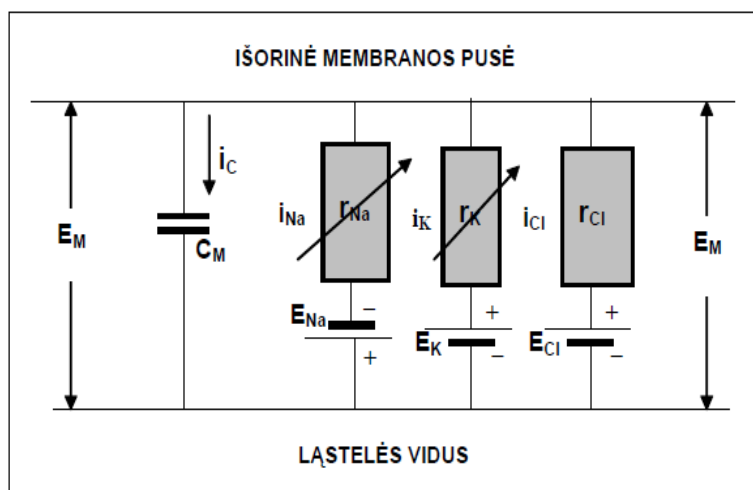
$$E_R \approx \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{P_{K^+}[K^+]_o}{P_{K^+}[K^+]_i} \quad (1.5)$$

Analogiškai, sujaudinimo atveju laikoma, kad veikimo potencialo dydį lemia $[Na^+]$ jonai, todėl [1]:

$$E_V \approx \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{P_{Na^+}[Na^+]_o}{P_{Na^+}[Na^+]_i}, \quad (1.6)$$

Na^+ koncentracija ląstelės išorėje 10 – 15 kartų didesnė negu viduje, todėl Na jonai difunduoja pro membraną iš ląstelės išorės į vidų pagal koncentracijos gradientą ir membranos vidiniame paviršiuje sukuria teigiamą krūvį ir todėl mažėja ramybės potencialas [2]. Cl^- jonų ląstelės išorėje yra apie 50 kartų daugiau negu viduje, todėl jie difunduoja į ląstelės vidų ir membranos vidiniame paviršiuje sukuria neigiamą krūvį, o šis didina ramybės potencialo skaitinę vertę [2].

Hodžkinas ir *Hakslis* yra pateikę netiesinės $[Na^+]$, $[K^+]$ jonų reikšmės ląstelės elektrinį modelį [1]. Mokslininkų sukurtas modelis ląstelės elektrinių potencialų kitimą aiškina elektrinės grandinės veikimu, esant sujungtiems lygiagrečiai trimis elektrovaros šaltiniams E_{Na} , E_K , E_{Cl} , turintiems savas vidaus varžas, taip pat membranos elektrinės talpos C_M ir aktyvios elektrinės varžos R_M elementus [1].



1.3 pav. Membranos elemento ekvivalentinės grandinės schema [1]

Laikoma, kad mažėjant ląstelės elektrinių potencialų skirtumui, ramybės potencialui E_R pasiekus kritinį slenksčio dydį, Na^+ jonai iš aplinkos pradeda skverbtis į ląstelės vidų, ryškiai didėja Na^+ jonų laidumas - G_{Na} (mažėja varža $R_M = 1/G_{Na}$), ir lėčiau – laidumas K^+ jonams plūsti iš vidaus į išorę - G_K [1]. Laidumas kitiems jonams nepakinta [1].

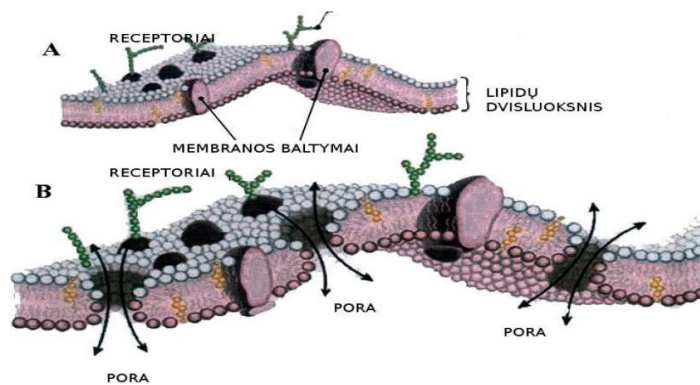
Bandymais pastebėta, kad labai didelė reikšmė elektriniams membranos potencialams, jų kaitros savybėms turi kalcio jonai Ca^{2+} [1].

1.3. Elektroporacijos proceso analizė

1.3.1. Elektrinių impulsų įtaka ląstelės membranai

Elektroporacija, tai reiškinys, kai ląstelę paveikus elektriniais impulsais, jos lipidiniame bisluoksnyje susidaro laidžiosios struktūros, kurios dar vadinamos poromis. Laidžiųjų porų susiformavimas lipidiniame matrikse nėra patvirtintas, bet galimą šių porų egzistavimą bei elektroporacijos reiškinį įrodo viduląstelių komponentų ištekėjimas pro membranos ląstelę į išorę arba mažų [5] bei didelių [6] molekulių patekimas iš ląstelę supančio skysčio į ląstelės vidų.

Ląstelės membranos elektrinė varža įprastomis sąlygomis yra $10^8 \Omega$ arba didesnė [22], todėl norint, kad membraninis laidumas būtų didesnis tiek mažom tiek didelėm molekulėm [10], reikia sukurti išorinį elektrinį lauką. Šį lauką ląstelės išorėje padeda sukurti elektriniai impulsai, kurie jos plazminėje membranoje sudaro laikinas laidžiasias poras [3]. Dažniausiai naudojami trumpi impulsai ($\mu s - ms$) ir aukštas elektrinio lauko intensyvumas (1 – 10 kV/cm). Susiformavusių porų skaičius ir dydis labai priklauso nuo elektrinio lauko parametrų (impulsų formos, jų skaičiaus, elektrinio lauko stiprumo, poveikio trukmės). Taip pat elektroporacijos efektyvumui įtakos turi ir suspensijos (tirpalo), kuriame yra ląstelė, parametrai (osmosinis slėgis, temperatūra, koncentracija, terpės pH, jonų sudėtis).



1.4 pav. Biomembranos molekulinės sandaros schema [69]. A – prieš elektroporaciją, B – po elektroporacijos

1.3.2. Ląstelės membranos laidžiųjų porų susidarymas

Ląstelę veikiant elektriniais impulsais jos membranoje formuojasi hidrofiliinės poros [21]. Manoma, kad hidrofiliinės poros susiformuoja iš hidrofobinių porų, kurios spontaniškai atsiranda dėl ląstelės membranos fosfolipidinių svyravimų. Hidrofobinės poros virsta hidrofobinėmis, kai porų energijų santykis pasiekia tam tikrą vertę [13]. Atsižvelgiant į šias sąlygas, galima teigti, kad

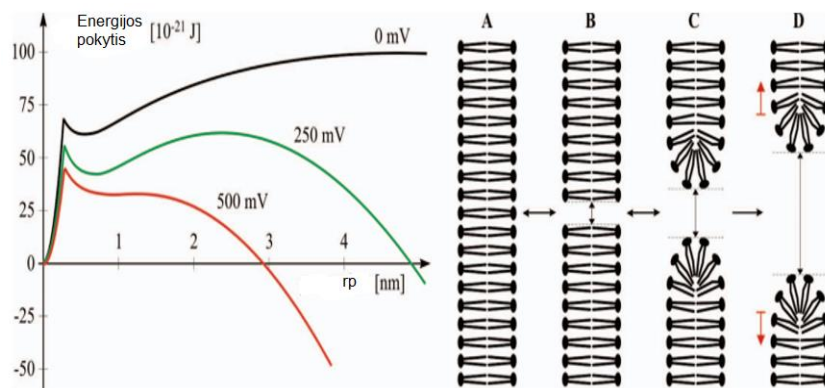
hidrofobinių porų virtimas hidrofilinėmis priklauso nuo išorinio elektrinio lauko sukkelto transmembraninio potencialo.

Porų formavimasis susidaro iš trijų etapų: porų susidarymas, porų plėtimasis ir porų užsivėrimas. Eksperimentais pastebėta, kad laikinos laidžiosios struktūros plečiasi išilgai elektrinio lauko kampu θ [23]. Porų formavimosi kryptingumą elektriniame lauke apibūdina formulė:

$$E \cdot \cos(\theta) > E_S, \quad (1.7)$$

čia E - elektrinio lauko stipris, E_S - ribinė elektrinio lauko stiprio vertė sukelianti ląstelės membranos pralaidumą, θ – kampas matuojamas tarp elektrinio lauko krypties ir ląstelės normalės [23]. Apibendrinus įvairius elektroporacijos proceso modelius yra priimta, kad laidžiųjų porų formavimąsi lemia ląstelės membranos indukavimas naudojant išorinį elektrinį lauką, (kai $> E_S$) ir ląstelės membranos išretėjimas dėl elektrinio lauko bei kitų parametru įtakos [23].

Porų formavimasis prasideda iškart paveikus ląstelę išoriniu elektriniu lauku [17]. Jeigu elektrinis laukas išlieka ilgiau nei keletą mikrosekundžių, tuomet prasideda porų plėtimasis. Kai elektrinis laukas nustoja veikti, sukeltas potencialas išnyksta. Tuomet poros pradeda užsitraukinėti ir grįžti į pradinę būseną [16]. Temperatūra taip pat daro įtaką porų užsivėrimui. Kuo temperatūra aukštesnė tuo greičiau poros išnyksta. Pagal porų dydį skiriami trys porų užsidarymo etapai: staigus poros užsivėrimas ($< 1s$), lėtas poros užsivėrimas ($\sim 2 - 10 \text{ min.}$) ir visiškas poros užsivėrimas ($> 10 \text{ min.}$) [28].



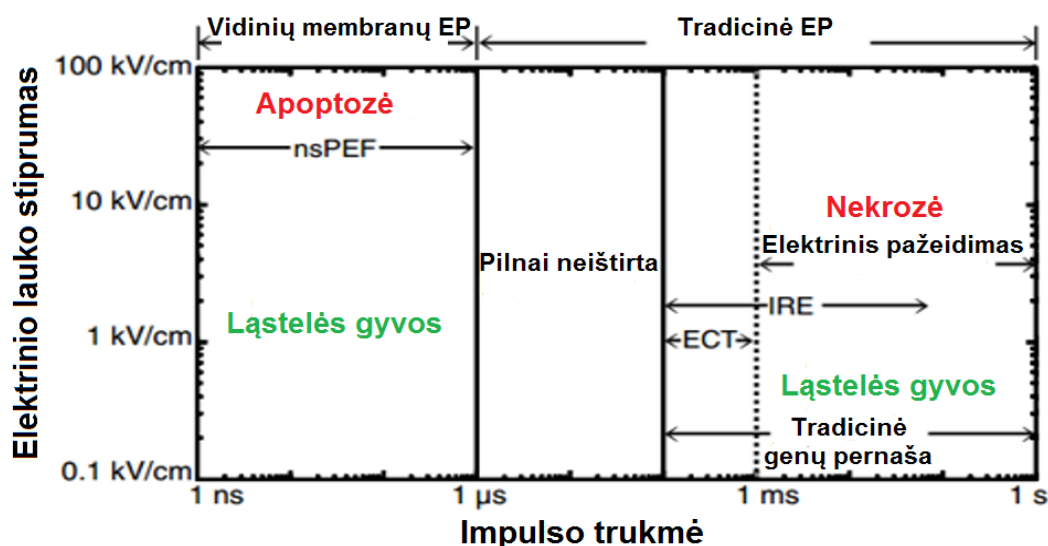
1.5 pav. Hidrofilinių porų formavimosi etapai [14]. Čia rp – poros spindulys

Pirmame paveikslėlyje (**1.5 pav.**) pavaizduota lipidinio membranos dvisluoksnio energijos pokyčiai, kai hidrofobinės poros virsta hidrofilinėmis bei porų formavimosi etapai. Kairėje paveikslėlio pusėje parodytas grafikas atvaizduoja energijos priklausomybę nuo transmembraninio potencialo didumo ir porų diametro. Dešinėje: A – membranos lipidinis dvisluoksnis be susiformavusių vandeninių porų (transmembraninis potencialas 0 mV), B – dvisluoksnis su hidrofobine pora (transmembraninis potencialas 0 - 250 mV), C – hidrofobinės poros perėjimas į

nestabilią hidrofilinės poros būseną (transmembraninis potencialas apie 250 mV), D – galutinai susiformavusi, savaime besiplečianti hidrofilinė pora (transmembraninis potencialas apie 500 mV).

1.3.3. Grįžtama ir negrįžtama elektroporacija

Porų užsivėrimas patvirtina, kad elektroporacija yra grįžtamas procesas ir parinkus tinkamas elektrinio lauko sąlygas, galima išsaugoti didelį ląstelių gyvybingumą, net ir po aukšto elektrinio intensyvumo impulsų taikymo. Bet, kai sukkeltojo potencialo reikšmė stipriai viršija kritinę vertę nuo kurios prasideda porų formavimasis, arba per didelio intensyvumo elektriniai impulsai veikia ląstelę per ilgai, tuomet įvyksta membranos desintegracija ir ląstelės mirtis (**1.6 pav.**). Porų dydžiui ir jų skaičiui viršijus tam tikrą kritinę vertę, ląstelės membrana yra mechaniškai suardoma. Tai vadinama negrįžtama elektroporacija.



1.6 pav. EP proceso žemėlapis, parodantis priklausomybę nuo išorinio elektrinio lauko stiprumo bei poveikio trukmės [20]

Negrįžtama elektroporacija, tai biofizikinis procesas sąlygojantis paveiktų ląstelių mirtį, nes suardoma ląstelės struktūra bei nebevyksta joninis laidumas [24]. Elektrinio lauko panaudojimas medicinoje, norint pašalinti nereikalingus audinius yra vadinamas Džaulio kaitinimu (angl. Joule heating). Taikant šį metodą, ne tik sunaikinamos nepageidaujamos biologinio audinio ląstelės, bet tuo pačiu negrįžtamai pažeidžiama sveiko audinio struktūra, kraujagyslių sienelės ir sunaikinamos nervų galūnėlės [25]. Tai labai didelis šio metodo trūkumas. Negrįžtamos elektroporacijos perspektyvumas medicinoje buvo suvoktas išmokus tinkamai kontroliuoti išorinio elektrinio lauko parametrus. Tai leido sunaikinti nepageidaujamus ląstelių darinius išvengiant nepageidautino šiluminio poveikio kraujagyslių sienelėms [26] ir nervų galūnėlėms [27].

1.3.4. Transmembraninis potencialų skirtumas

Taip pat žinoma, kad išorinis elektrinis laukas membranoje sukuria potencialų skirtumą [4]. Ląstelės elektroporacija įvyksta tik toje ląstelės membranos vietoje, kurioje membraninis potencialų skirtumas pasiekia kritinę vertę [3]. Įvairiais skaičiavimais potencialų skirtumo kritinė riba svyruoja nuo 0,4 iki 1V [12, 61]. Transmembraninio potencialo vertė kurios metu jau pastebimi negrįžtami ląstelės membranos pokyčiai yra apie 5V [61].

Skaičiuojant potencialų skirtumą atsižvelgiama į tai jog ląstelės nėra idealiai taisyklingos formos. Žinoma, kad potencialų skirtumas nėra vienodas visame membranos paviršiuje. Didžiausias potencialų skirtumas yra pasiekiamas tose membranos vietose, kurios yra arčiau elektrodų paviršiaus [10]. Tam įtakos turi ir ląstelės orientacija elektrinio lauko linijų atžvilgiu.

Kuo didesnė ląstelė yra veikiamą elektrinio lauko, tuo didesnis jos paviršiaus plotas būna elektroporuojamas [18]. Tai reiškia, kad didesnės ląstelės yra jautresnės elektrinio lauko poveikiui, o indukuoto potencialo didumas priklauso nuo ląstelės skersmens. Į tai būtina atsižvelgti parenkant išorinio elektrinio lauko intensyvumą, nes kritinė transmembraninio potencialo riba priklauso nuo ląstelės geometrinių matmenų.

Potencialų skirtumas sferinės formos ląstelėms homogeniniame elektriniame lauke, kurio poveikio trukmė ilgesnė nei keli šimtai mikrosekundžių išreiškiamas Schwano (1) lygtimi [8]:

$$\Delta\Phi_m = f \cdot R \cdot E \cdot \cos(\theta) \quad (1.8)$$

čia E – išorinio elektrinio lauko stipris (V/cm); R – ląstelės spindulys (μm); θ – kampas matuojamas tarp elektrinio lauko krypties ir ląstelės normalės ($0 - 0^\circ$, $0 - 180^\circ$). Konstanta f geometrinis faktorius, kuris sferinės formos ląstelėms lygus 1,5, o strypo formos ląstelėms lygus 1.

Norint apskaičiuoti transmembraninį potencialą sferinės formos ląstelėms, kai elektriniam laukui sukurti naudojamas sinusinis signalas, kurio dažnis mažesnis nei 1 MHz bei stačiakampio impulso trukmė didesnė nei $1\mu\text{s}$, naudojama pirmos eilės Schwano (2) lygties išraiška [9]:

$$\Delta\Phi_m = f \cdot R \cdot E \cdot \cos \theta \cdot (1 - \exp(-\frac{t}{\tau_m})), \quad (1.9)$$

čia τ_m – laiko konstanta apibūdinanti membranos užsikrovimo trukmę:

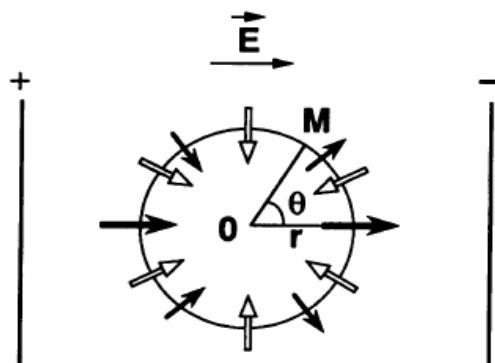
$$\tau_m = \frac{R \cdot \epsilon_m}{2 \cdot d \cdot \frac{\sigma_i \cdot \sigma_e}{\sigma_i \cdot 2 \cdot \sigma_e} + R \cdot \sigma_m} \quad (1.11)$$

čia σ_i , σ_e , σ_m ląstelės citoplazmos, ląstelės membranos ir suspensijos kurioje yra ląstelė elektrinis laidumas; ϵ_m – ląstelės membranos dielektrinė skvarba; d – membranos storis; R – ląstelės spindulys. Membranos užsikrovimo laiko konstanta priklauso nuo ląstelės spindulio. Kai ląstelės spindulys matuojamas mikrometrais, tai $\tau_m < 1\mu\text{s}$, kai ląstelės didesnės, tai $\tau_m > 1\mu\text{s}$ [11].

Transmembraninį potencialo pokytį lemia ne tik išorinis elektrinis laukas, bet ir ląstelės ramybės potencialas. Ramybės potencialo susidarymas priklauso nuo teigiamų ir neigiamų jonų tam tikro santykio ląstelės viduje, o jo dydis ląstelės išorinėje membranoje svyruoja nuo -90 mV iki -40 mV [15]. Ląstelės vidinėje membranoje (mitochondrijos) pastebimas didesnis ramybės potencialas, kuris kai kuriais atvejais gali vyruoti nuo -150 iki -200 mV (neigiamas viduje organelės) [61], o tai leidžia vidinėje membranoje indukuoti mažesnę elektrinį lauką norint pasiekti kritinę TRMBP vertę. Galima daryti prielaidą, kad panašus ramybės potencialas yra ir ląstelės branduolyje. Literatūros šaltinių analizės metu nerasta aiškaus skirtumo tarp TRMBP kritinių verčių, todėl laikoma, kad norint pasiekti hidrofiliųjų porų formavimasi vidinėje membranoje reikia indukuoti tokia pat kritinė TRMBP skaitinė vertė kaip ir išorinėje membranoje.

1.3.5. Elektrinio potencialo gradientas

Svarbūs joninio laidumo faktoriai ląstelėje yra $Na - K$ siurbliai, kurie eksportuoja teigiamus Na jonus į ląstelės išorę ir K laidumo kanalai, kuriais teigiami K jonai gali laisvai judėti per membraną iš ląstelės ir į ląstelę. Šie du reiškiniai atspindi elektrocheminę pusiausvyrą ląstelėje, kuri tiesiogiai susijusi su ramybės potencialo dydžiu [7]. Į membraną galima žiūrėti, kaip į įkrautą elektrinį kondensatorių, nes jos paviršiuje kaupiasi nesubalansuoti jonai, o dėl šios priežasties citoplazma išlieka neutrali [7]. Ląstelės membranos „užsikrovimo“ laikas tiesiogiai priklauso nuo ląstelės dydžio [19].



1.7 pav. Rodyklės vaizduoja elektrinio potencialo gradiento kryptį. Šviesios rodyklės rodo ramybės potencialo, tamsios rodyklės elektrinio lauko sukurto potencialo kryptį. E – elektrinis laukas, M – membrana, r – ląstelės spindulys. Rodyklių ilgis atitinka potencialų dydį [12]

Gauta transmembraninio potencialo reikšmė visada yra lygi ramybės potencialo ir išorinio elektrinio lauko sukurto potencialo sumai. Kai ši potencialų suma tam tikroje ląstelės membranos vietoje pasiekia 250 mV skaitinę vertę, šioje vietoje membrana tampa laidži mažoms molekulėms [10].

1.4. Sonoporacijos proceso analizė

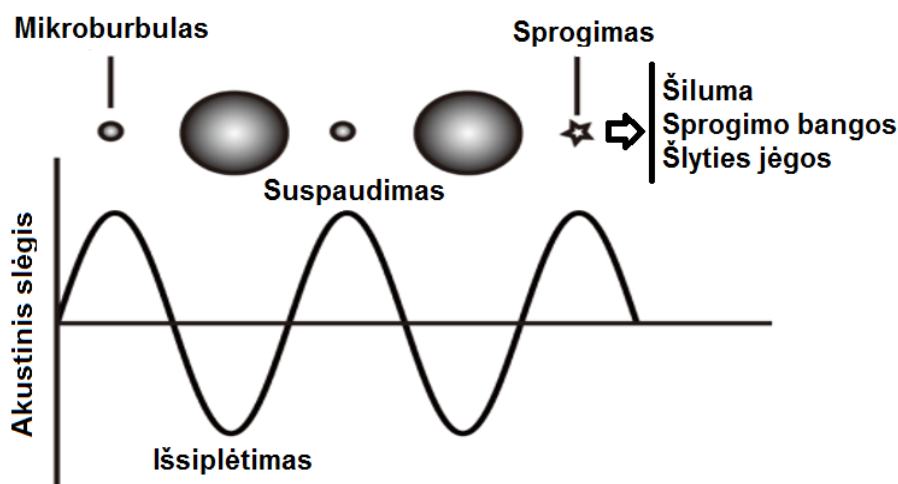
1.4.1. Kavitacija

Sonoporacijos procesas pagrįstas ultragarso bangų poveikiu į terpę, kurioje vyksta dujinių intarpų kavitacija. Kavitacija, tai ultragarsinės kontrastinės medžiagos, bei mikroburbulų susiformavusių iš skysčio dujų osciliacija bei sproginimas akustiniame lauke. Tikslus sonoporacijos mechanizmas šiuo metu dar nėra iki galo žinomas. Žinoma, kad svarbus faktorius sonoporacijos efektyvumui yra kavitacijos vieta proceso metu [32].

Tiek stabili tiek inercinė kavitacija sukelia porų formavimąsi [33, 34]. Proceso efektyvumas priklauso nuo ultragarso intensyvumo, ekspozicijos trukmės, centrinio dažnio, režimo (tolydaus ar impulsinio), bei veikimo ciklo.

Naudojant skenavimą elektroniniu mikroskopu buvo sonoporuojamos dviejų tipų žmogaus ląstelės (glioblastomos ir krūties vėžio) [29]. Šis tyrimas parodė, kad ląstelės laikinųjų laidžiųjų porų susiformavimas ir ląstelės membranos pralaidumas po sonoporacijos, priklauso nuo ląstelės tipo [29].

Didelės amplitudės virpėjimai šalia mikroburbulų yra pirminis sonoporacijos efektas, o mikroburbulų sproginimai lemia mažesnę sonoporacijos efektyvumą [42] ir gali sukelti ląstelės mirtį [43].



1.8 pav. Mikroburbulų atsakas į ultragarso bangos sukeltą akustinį slėgį [55]

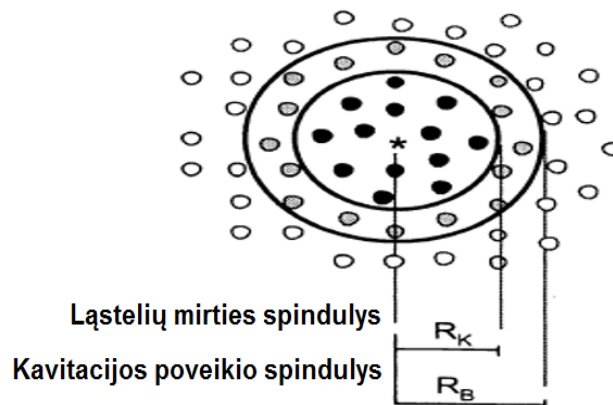
Burbulai susitraukia kai akustinis slėgis padidėja ir išsiplėčia, kai akustinis slėgis sumažėja. Mikroburbulo sproginimas įvyksta, kai burbulo sienelė neatlaiko akustinio slėgio sukkelto spaudimo. Įvykęs mikroburbulo sproginimas sukelia sproginimo (jaudinimo) bangas kurios sujaudina ląstelės membraną ir padidina ląstelės membranos pralaidumą (žiūr. 1.8 pav.).

1.4.2. Sonoporacijos efektyvumo įžvalgos

Atliekant sonoporacijos eksperimentą buvo keičiamos mikroburbulų vietos membranos paviršiuje, rezultatai parodė, kad burbulų sąlyčio su membrana vietose buvo pastebėti membranos pažeidimai [30]. Eksperimentų rezultatai parodė, kad sumažėjęs ląstelės membranos spaudimas, hipertoniniame tirpale, skatina membranos atsistatymą po sonoporacijos, o geriausiai atsistato sferinės formos ląstelių membranos turinčios mažesnę įtempimą [31]. Nutraukus ultragarso poveikį, laidžiųjų porų užsivėrimas (membranos atsistatymas) trunka apie 1 min. [58].

Eksperimento metu buvo tirta ląstelių pralaidumo ir gyvybingumo priklausomybė nuo mikroburbulų dydžio. Pastebėta, kad sonoporacijos efektyvumas priklauso nuo kontrastinio agento mikroburbulų dydžio. Mažesni mikroburbulai užtikrina didesnę sonoporacijos efektyvumą bei didesnę ląstelių gyvybingumą [35]. Naudojant kontrastinį agentą su didesniais mikroburbulais pastebėta, kad sonoporacija vyko platesniame ląstelės membranos ruože [35].

Eksperimento *In Vitro* (laboratorinis tyrimas) metu, geriausi sonoporacijos rezultatai buvo pasiekti naudojant $0,88 \text{ MPa}$ akustinį slėgį [36, 37, 38]. Panaudojus žemą akustinį slėgį ($0,05$ iki $0,3 \text{ MPa}$) po mikroburbulų kavitacijos ląstelės membranoje atsiradusių porų dydis yra nuo 100 nm iki $1,25 \mu\text{m}$ [54]. Akustinis slėgis didesnis nei 1 MPa sukelia ląstelių sukibimą bei ląstelių mirtį akustinio slėgio centre, kas sumažina sonoporacijos efektyvumą [36]. Tyrimai parodė, kad aukšto intensyvumo ultragarsas gali pakeisti ląstelių membranų pralaidumą [39]. Viršijus $0,3 \text{ W/cm}^2$ (keitiklio žadinimo įtampa 60 Vpp) ultragarso intensyvumą, pastebimas žymus ląstelių gyvybingumo sumažėjimas [39]. Ląstelės membranoje prasivėrusių porų dydis priklauso nuo akustinio slėgio didumo ir nuo poveikio trukmės. Kuo akustinis slėgis didesnis arba poveikio trukmė ilgesnė, tuo porų spindulys didesnis [55].



1.9 pav. Kavitacijos proceso poveikio priklausomybė nuo ląstelės atstumo iki mikroburbulo. Kai ląstelė nuo burbulo yra atstumu R_K , jos mirties tikimybė didžiausia. Jeigu ląstelė nuo burbulo yra atstumu $R_B - R_K$, tuomet įvyksta ląstelės sonoporacija. Ląstelė kuri nuo burbulo nutolusi atstumu

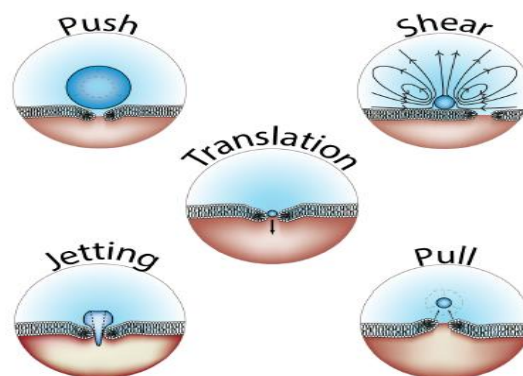
didesniu nei R_B nėra paveikiama kavitacijos reiškinio. Ląstelių mirties spindulys – (angl. Killing radius - R_K), kavitacijos poveikio spindulys – (angl. Blast radius - R_B) [49]

Ultragarso poveikis gali padėti pernešti mažus junginius, makromolekules į ląsteles bei baltymus ir DNA į audinius. Manoma, kad šių biologinių poveikių egzistavimą lemia mikroburbulų virpėjimas arba sproginimas akustiniame lauke. Tinkamai parinkti akustinio lauko parametrai dėka mikroburbulų osciliacijos ar sproginimo, sukelia grįžtamus ląstelės plazminės membranos prasivėrimus [47, 48]. Laboratoriniuose ir klinikiuose tyrimuose, kontrastinis agentas su mikroburbulais suleidžiamas į ląstelių suspensija tam, kad akustinio lauko poveikyje, būtų kaip kavitacijos branduoliai [50]. Šitie kavitacijos branduoliai sustiprina biologinį poveikį ląstelėse ir audiniuose [51, 52, 53].

Per didelę mikroburbulų koncentracija sumažina sonoporacijos, bet padidina ląstelės mirties tikimybę [49]. Norint pasiekti gerus molekulių pernašos į ląstelę rezultatus, būtina užtikrinti tinkamą ląstelių ir burbulų santykį bei naudoti mažos galios akustinį lauką [49]. Mikroburbulo poveikis ląstelei pasireiškia, kai atstumas nuo mikroburbulo iki ląstelės yra nuo 3 iki 90 mikroburbulo spindulių [49]. Šis atstumas labai panašus į atstumą tarp burbulų [49].

1.4.3. Mikroburbulo sąveika su ląstele

Šiuo metu yra keletas sonoporų susidarymo aiškinimo būdų, kurie iš dalies yra koncepciniai, nes kai kurie iš jų nėra iki galo patvirtinti. Visi šie būdai yra aiškinami mikroburbulų sąveika akustiniame lauke.



1.10 pav. Porų formavimosi mechanizmai sonoporacijos proceso metu [56, 57]

Sonoporacijos proceso metu naudojami mikroburbulai kurie yra padengti lipidais. Lipidinis mikroburbulo dangalas sustiprina jo sienelės, todėl jie tampa atsparesni akustinio slėgio pokyčiams. Reikia atsižvelgti į tai, kad skylantys burbuliukai negali sukurti laidžiųjų porų ląstelės membranoje,

nes skilimo metu sunaudojama svarbi energijos dalis [58]. Todėl galima teigti, kad sonoporacijos efektyvumas didesnis tuomet kai mikroburbulai išlieka vientisi.

Sonoporų susidarymo būdai [56, 57, 58]:

- ❖ **Stūmos procesas** (angl. Push), kai mikroburbulas liečia ląstelės membraną, tuomet išorinis akustinis laukas spausdamas burbulą į ląstelės vidų, tuo pačiu praveria membraną. Šis procesas galimas todėl, kad mikroburbulo sienelės yra plastiškesnės už ląstelės membraną bei vyksta tik akustinės bangos maksimumo fazėje. Stūmos procesas pasiekiamas per pusę ultragarso ciklo;
- Traukos procesas** (angl. Pull), kai akustinės bangos fazė yra minimume, tuomet mikroburbulas išsiplėčia ir šiek tiek atsitraukia nuo membranos palikdamas tarpelį į kurį suteka skystis. Burbulo atsitraukimo momentu sukuriama srautas ir traukos jėga kuri į save traukia membraną ir praveria jos poras. Traukos procesas pasiekiamas per pusę ultragarso ciklo;
- ❖ **Čiurkšlės procesas** (angl. Jetting), kai mikroburbulas sprogsa asimetriškai, o sprogo metu susidariusi čiurkšlė praduria membraną tarsi adata. Šis procesas įvyksta po pusės ultragarso ciklo ir taikant didelės amplitudės akustines bangas. Taip pat nėra įrodyta ar šis reiškinys sukelia grįžtamus membranos pralaidumo pokyčius;
- ❖ **Srovės procesas** (angl. Streaming), kai skysčių srautas aplink mikroburbulą, burbului esant šalia ląstelės yra pakankamai stiprus, kad sukurtų šlyties įtempimą. Kritinį šlyties įtempimą padeda pasiekti ilgi ultragarso impulsai, kurie sukuria skysčio srautus aplink silpnai prie ląstelės membranos prisitvirtinusį mikroburbulą;
- ❖ **Perkėlimo procesas** (angl. Translation), kai naudojamos terapinis poveikis priverčia burbulą įeiti į ląstelės membranos dvisluoksnį arba patekti į ląstelės vidų. Šiam procesui pasiekti naudojami ilgi, žemos amplitudės akustiniai impulsai. Radiacinių jėgų veikiamas mikroburbulas skverbdamasis per membraną netenka dalies dangalo, todėl patekęs į ląstelę arba membranos vidinius sluoksnius ištirpsta;
- ❖ **Inercinė kavitacija**, kai intensyvus mikroburbulų formavimasis arba jų sprogo sukelia jaudinimo bangas, kurios žaloja visus darinius esančius greta. Šios bangos sujaukina membraną suformuodamos laidžiąsias poras.

Yra žinoma, kad membranos dvisluoksnis pats savaime gali veikti kaip kavitacijos branduolys [58]. Akustinio slėgio įtakoje membranoje susidaro dujinės ertmės kurios gali praverti membranoje poras. Taip aiškinamas sonoporų susidarymas membranoje, kai nenaudojami kontrastiniai agentai su mikroburbulais.

1.4.4 . Sonoporos atsiradimo tikimybės skirstinys

Jeigu mikroburbulų pasiskirstymas yra tolygus, tuomet mikroburbulai aplink ląstelę išsidėsto pagal Puasono skirstinį [40]. Darant prielaidą, kad viena pora yra sukuriama vieno mikroburbulo, tikimybė turėti N porų yra apibrėžiama Puasono skirstiniu $f(N; \lambda)$ [41]:

$$f(N; \lambda) = \lambda^N \cdot e^{-\lambda} / N!, \quad (1.12)$$

čia λ - porų skaičius.

Iš to seka, kad tikimybė jog nesusiformuos nei viena pora yra lygi $p_0 = f(0; \lambda)$ arba susiformuos viena pora:

$$p_0 = f(1; \lambda) \quad (1.13)$$

Taigi tikimybė turėti bent viena porą ($N \geq 1$) ląstelės membranoje yra [41]:

$$p_{pore} = 1 - p_0 = 1 - f(0; \lambda) \quad (1.14)$$

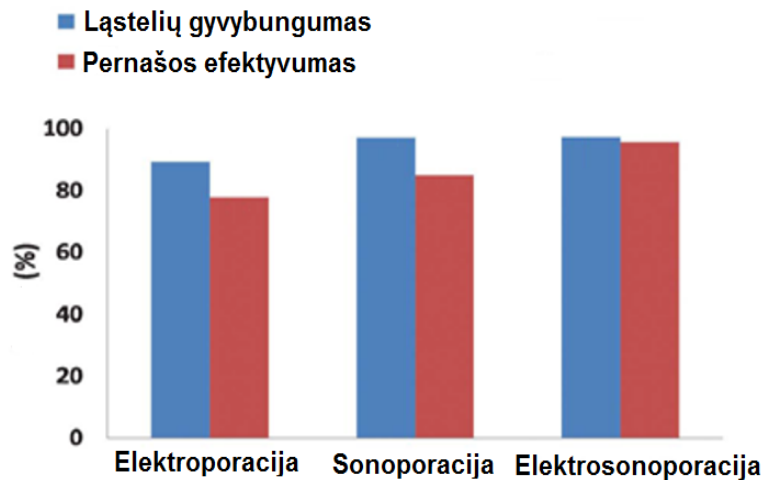
Bet $p_{pore} = n_{curr} / n_{not}$, kur n_{curr} – eksperimentų skaičius kuriuose buvo matuota srovė ir n_{not} – eksperimentų skaičius. Formulė 1.12 skirta nustatyti Puasono skirstinį pagal 1.13 formulę. Taigi, tikimybė, kad susiformuos viena pora įvykus poracijai, pagal formulę [41],

$$p_{1|pore} = \frac{p_1}{p_{pore}} = f(1; \lambda) / [1 - f(0; \lambda)], \quad (1.15)$$

yra didesnė nei ~95% [41]. Kad susiformuos tik viena pora, tikimybė išlieka tik tuomet, kai mikroburbulų koncentracija yra labai maža.

1.5. Elektrosonoporacijos metodo analizė

Šis metodas, tai nauja ląstelės membranos pralaidumo tyrimo kryptis. Šiuo metodu siekiama išsiaiškinti ar kombinuotas elektroporacijos ir sonoporacijos procesas gali padaryti ląstelės membraną labiau pralaidesnę vaistams, genams, baltymams ir kitoms biologiškai aktyvioms molekulėms, nei abu šie metodai taikomi atskirai. Pirmieji elektrosonoporacijos efektyvumą (in vivo) naudojant genų terapiją tyrė Yamashita ir kt. [67]. Gauti rezultatai parodė, kad pelių raumeninio audinio pažeidimai buvo mažesni naudojant elektrosonoporaciją nei elektroporaciją. Vėliau Yamashita ir kt. tyrė pelių kepenų karcinomos gydymą, naudojant geno perkėlimą (in vivo) elektrosonoporacijos metu. Buvo pasiekta didelė pelių išgyvenimo tikimybė po atlikto gydymo, todėl padaryta išvada, kad toks genų perkėlimo metodas yra perspektyvi tolimesnių tyrimų kryptis [68]. Paveikslėlyje 1.11 pav. pateikiami tyrimuose gauti rezultatai.



1.11 pav. Elektroporacijos, sonoporacijos ir elektrosonoporacijos procesų efektyvumo ir ląstelių gyvybingumo nustatymo tyrimas [23]

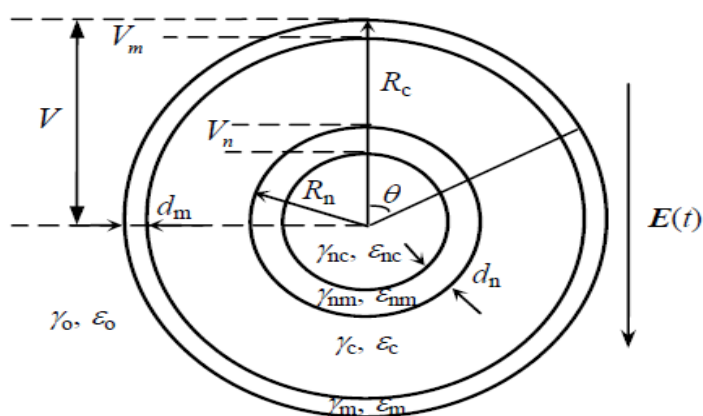
Taip pat elektrosonoporacijos efektyvumą genų pernašos (in vitro) metu tyrė J.M Escoffre ir kt. [66]. Pirmiausia, ląstelės buvo elektroporuojamos DNR plasmidėmis, kurios buvo pažymėtos fluorescenciniu žymekliu, o po to viena ląstelių grupė papildomai dar buvo sonoporuojama naudojant kontrastinius mikroburbulus. Po 24 valandų pastebėta, kad ląstelės su kuriomis buvo naudojama elektrosonoporacija, pasisavino keturis kartus daugiau DNR plasmidžių, o pernašos efektyvumas buvo šešis kartus didesnis. Tyrime aprašoma, kad taikant kombinuotą metodą, elektroporacija sukelia DNR plasmidžių susiporavimą ant ląstelės membranos, o paveikus ląsteles ultragarso bangomis, naudojant kontrastinius mikroburbulus, DNR plasmidės lengvai ir greitai patenka į ląstelę. Todėl buvo padaryta prielaida, kad sonoporacija padidina pernašos efektyvumą, o elektroporacija padeda ląstelėms išlikti gyvybingomis.

Paskutiniai laboratoriniai ląstelės membranos pralaidumo ir ląstelių gyvybingumo tyrimai po elektroporacijos, sonoporacijos ir taikant kombinuotą metodą buvo atlikti 2013 metų pabaigoje [23]. H. Wang ir kt. atlikti tyrimai parodė, kad taikant abu metodus vienu metu, parinkus tam tikrus elektrinio ir akustinio laukų parametrus, ląstelių membranų pralaidumas yra didesnis nei kiekvieno metodo atskirai. Taip pat pastebėta, kad ląstelių gyvybingumas buvo didesnis nei po elektroporacijos ir labai panašus į sonoporacijos proceso. Buvo iškelta hipotezė, kad elektrinis laukas ir akustinė banga taikomi ląstelei tuo pačiu metu statmenomis kryptimis, gali lemti efektyvesnę molekulių pernašą tuo pačiu metu užtikrinant didžiausią lipidinių porų susiformavimą veikiamoje ląstelės membranos vietoje [23].

2. LAŠTELĖS TRANSMEMBRANINIO POTENCIALO TYRIMAS

2.1. Ląstelės ekvivalentinės grandinės modelis

Ekvivalentinės grandinės modelis, tai supaprastintas daugiasluoksnio dielektrinio (2.1 pav.) modelio variantas, todėl dielektrinio ląstelės modelio parametrai (1 Lentelė) yra naudojami grandinės modelyje, tik paverčiami atitinkamais grandinės komponentų parametrais.



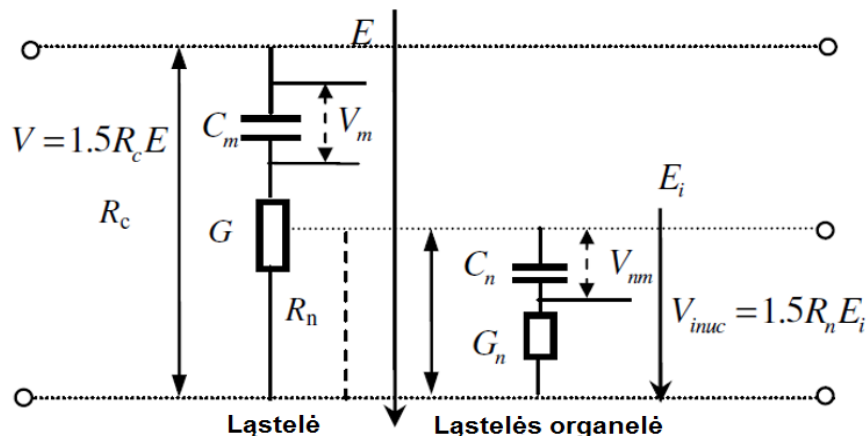
2.1 pav. Daugiasluoksnis dielektrinis sferinės formos ląstelės modelis [62, 65]

Dielektriniame modelyje išorinio elektrinio lauko poveikio metu yra atsižvelgiama į daugelį svarbių ląstelės elektrinių parametru, bet ląstelės membranos, citoplazmos, branduolio (organelių) citoplazmos, membranų, taip pat suspensijos laidumai imami kaip konstantos ir modeliavimo metu nėra keičiami. Taip pat skaičiavimuose nėra keičiamos ir keičiami atitinkami santykiniai skverbčių dydžiai. Modeliuojant keičiami geometriniai parametrai, bet skaičiuojant TRMBP kitimą nėra atsižvelgiama į membranų storius, todėl, kad modelis orientuotas į ląstelės ir organelių spindulių dydžius, o nm eilės membranos storis jiems didesnės įtakos neturi. Modelyje taip pat nėra atsižvelgiama į elektrinio lauko linijų kryptį, kuri apibrėžia kampas θ .

Šis ląstelės modelis apibrėžia potencialo kitimą ląstelės membranoje tiek branduolio membranoje (ląstelės membrana vadinama išorine, o branduolio – vidine). Todėl dar vadinamas dvigubu modeliu, nes atsižvelgia, ne tik į išorinės membranos pokyčius, po elektrinio lauko poveikio, bet galima sumodeliuoti šio lauko įtaką organelių TRMBP pokyčiui. Taip yra todėl, kad išorinio elektrinio lauko $E(t)$ kitimas, vienu metu veikia abi membranas tuo pačiu citoplazmą esančią tarp branduolio membranos ir ląstelės membranos bei citoplazmą esančią branduolyje. Kadangi didžiąją ląstelės dalį sudaro laidūs citoplazma, jos membrana galima apibrėžti kaip talpumo elementą C_m ekvivalentų membranos organelių laidumui G . Tai pat branduolio membrana, prilyginama talpumui

C_n ekvivalenčių organelės citoplazmos laidumui G_n . Todėl membraninių potencialų kitimas priklauso nuo talpumų bei ekvivalenčių jiems laidumų.

Taip pat šiame modelyje yra atsižvelgiama į ląstelės geometrinius parametrus (**1 Lentelė**).



2.2 pav. Ekvivalentinė elektrinės grandinės modelio schema [62, 65]

Atsižvelgiant į ekvivalentinės grandinės schemą, aprašoma priklausomybė tarp įtampos tenkančios ląstelei ir išorinio elektrinio lauko [62].

$$V(s) = f \cdot R_c \cdot E(s), \quad (2.1)$$

čia $f \approx 1,5$ - sferinės formos ląstelės geometrinis faktorius, R_c – ląstelės spindulys. Ši priklausomybė galioja visuomet kai $\gamma_0, \gamma_c \gg \gamma_m$ ir $R_c \gg d_c$, kur $s = j \cdot \omega$.

Išorinės membranos perdavimo charakteristika apibrėžiama lygtimi:

$$H_m(s) = \frac{V_m(s)}{E(s)} = 1,5 \cdot R_c \cdot \frac{\frac{1}{s \cdot C_m}}{\frac{1}{G} + \frac{1}{s \cdot C_m}} = \frac{1,5 \cdot R_c}{\tau_{cell} \cdot s + 1} \quad (2.2)$$

1 Lentelė. Daugiasluoksnio ląstelės modelio elektriniai parametrai [65]

| Parametras | Ląstelės komponentas | Modeliavimo vertė |
|--|-----------------------------|------------------------------|
| Laidumas, S/m | Suspensija | $\gamma_0 = 0,6$ |
| | Ląstelės membrana | $\gamma_m = 1 \cdot 10^{-5}$ |
| | Ląstelės citoplazma | $\gamma_{mc} = 0,5$ |
| | Branduolio membrana | $\gamma_n = 1 \cdot 10^{-3}$ |
| | Branduolio citoplazma | $\gamma_{nc} = 1$ |
| Santykinė skverbtis | Suspensija | $\epsilon_0 = 80$ |
| | Ląstelės membrana | $\epsilon_m = 10$ |
| | Ląstelės citoplazma | $\epsilon_{mc} = 80$ |
| | Branduolio membrana | $\epsilon_{nm} = 10$ |
| | Branduolio citoplazma | $\epsilon_{nc} = 80$ |
| Geometriniai parametrai, μm | Ląstelės membranos storis | 0,007 |
| | Branduolio membranos storis | 0,04 |

Remiantis literatūros šaltinių [2] membranos užsikrovimo laikas aprašomas Schwano lygtimi:

$$\tau_{cell} = \left(\frac{1}{2 \cdot \gamma_0} + \frac{1}{\gamma_c} \right) \cdot \frac{\varepsilon_i \cdot \varepsilon_m}{d_m} \cdot R_c, \quad (2.3)$$

čia ε_i – vakumo skverbtis.

Įtampa per laidumo elementą G :

$$V_i(s) = 1,5 \cdot R_c \cdot E(s) \cdot \frac{\frac{1}{G}}{\frac{1}{G} + \frac{1}{s \cdot C_m}} \quad (2.4)$$

Kadangi ląstelės membrana yra labai plona ($d_m = 0,007 \cdot 10^{-9} \text{m}$), ląstelės vidinis elektrinis laukas išreiškiamas naudojant ne vidinį spindulį iki ląstelės membranos visinės sienelės, bet ląstelės spindulį kartu įskaičiuojant išorinės membranos storį į bendrą ląstelės spindulio ilgį.

$$E_i(s) = \frac{V_i(s)}{R_c} = \frac{1,5 \cdot \tau_{cell} \cdot s}{\tau_{cell} \cdot s + 1} \cdot E(s) \quad (2.5)$$

Kai elektroporacijai naudojami aukšti dažniai ($\omega_{cell} \gg 1$), tai $E_i \approx 1,5 \cdot E$, o naudojant žemus dažnius ($\omega_{cell} \ll 1$), tai $E_i \ll E$. Ląstelė su išoriniu elektriniu lauku sąveikauja kaip filtras.

Įtampos kritimas ant organelės, veikiant ją elektriniu lauku E_i lygus [62]:

$$V_{inuc}(s) = E_i(s) \cdot R_n = \frac{1,5 \cdot \tau_{cell} \cdot s}{\tau_{cell} \cdot s + 1} \cdot E(s) \cdot R_n \quad (2.6)$$

Vidinės membranos perdavimo funkcija:

$$H_{nm}(s) = \frac{V_{nm}(s)}{E(s)} = \frac{1,5 \cdot \tau_{cell} \cdot s \cdot R_n \cdot s}{(\tau_{nuc} \cdot s + 1) \cdot (\tau_{cell} \cdot s + 1)} \quad (2.7)$$

Vidinės membranos užsikrovimo laikas :

$$\tau_{nuc} = \left(\frac{1}{2 \cdot \gamma_c} + \frac{1}{\gamma_{nc}} \right) \cdot \frac{\varepsilon_i \cdot \varepsilon_m}{d_n} \cdot R_n \quad (2.8)$$

Remiantis ląstelės parametrais (laidumas, skverbtis, geometrinis faktorius) membranų užsikrovimo laiko konstantoms galioja lygybė $\tau_{nuc} < \tau_{cell}$.

2.2. Transmembraninio potencialo laikinė analizė

Panaudojus Aplaso transformacijas vidinės ir išorinės membranos perdavimo funkcijų lygtims, kintantis elektrinis laukas $E(s)$ gali būti išreiškiamas lygtimis [62]:

$$v_m(t) = L^{-1}[H_m(s) \cdot E(s)] \quad (2.9)$$

$$v_{nm}(t) = L^{-1}[H_{nm}(s) \cdot E(s)] \quad (2.10)$$

Elektroporacijai naudojant stačiakampius impulsus, kintančio elektrinio lauko amplitudė kuri veikia ląstelės membrana, gali būti išreiškiama $E \cdot [1 \cdot (t) - 1 \cdot (t - \tau)]$. Tuomet išorinės membranos transmembraninis potencialas impulse pabaigoje lygus:

$$V_m = 1,5 \cdot R_c \cdot E \cdot (1 - e^{\frac{-t}{\tau_{cell}}}) \quad (2.11)$$

Kai $\tau \geq 4 \cdot \tau_{cell}$, tuomet išorinė membrana gali pilnai įsikrauti ir išlaikyti didžiausią transmembraninį potencialą ($V_m = 1,5 \cdot R_c$) iki impulso pabaigos. Kai $\tau \ll \tau_{cell}$ išorinė membrana užsikrauna prastai ir pasiekia mažas potencialo vertes impulse pabaigoje [62]. Iš to seka, kad per trumpi impulsai neleidžia išoriniai membranai pilnai užsikrauti. Reikia paminėti, kad išorinė membrana nėra pilnai įsikrovusi kai transmembraninis potencialas pasiekia savo didžiausią reikšmę.

Analogiškai yra apibrėžiama įtampa tenkanti vidinei membranai:

$$V_{nm} = \frac{1,5 \cdot \tau_{cell} \cdot R_n \cdot E}{\tau_{cell} - \tau_{nuc}} \cdot (e^{\frac{-t}{\tau_{cell}}} - e^{\frac{-t}{\tau_{nuc}}}) \quad (2.12)$$

Kai $\tau \geq 4 \cdot \tau_{nuc}$, vidinė membrana pasiekia didžiausia potencialo dydį, bet impulse pabaigoje sumažėja iki 0. Kai $\tau \ll \tau_{nuc} < \tau_{cell}$ V_{nm} pasiekia mažas vertes ir pilnai neįsikrauna [62]. Todėl galima teigti kad vidinės membranos užsikrovimas priklauso nuo vidinės ir išorinės membranos užsikrovimo laiko konstantų, nes τ_{nuc} daug kartų mažesnė nei τ_{cell} todėl tiek per trumpas tiek per ilgas elektrinio lauko poveikis gali sukelti transmembraninio potencialo depoliarizaciją vidinėje membranoje. Pasibaigus impulsui, abiejų membranų išsikrovimo laikai nusakomi atsižvelgiant į šias laiko konstantas.

2.3. Ekvivalentinio grandinės modelio simuliaciniai tyrimai

Ląstelės branduolys yra didžiausia ląstelės organelė, kurios skersmuo $4 - 10 \mu m$, dažniausiai rutulio formos. Žinoma, kad įprastomis sąlygomis ląstelės membrana ir mitochondrijų membranos prasivėrusių porų neturi, priešingai nei branduolio membrana. Branduolio membranoje nuolatos yra prasivėrusių porų, kitaip dar vadinamų branduolio poros kompleksais. Šie kompleksai pasyvios difuzijos metu praleidžia į branduolio vidų molekules kurių skersmuo iki $9 nm$ [70]. Didelių molekulių patekimas yra ribotas ir priklauso nuo to ar yra tai molekulei skirtas judrus pernašos baltymas. Makromolekulės be baltyminio nešiklio pro branduolio membraną nepraeina, išimtis tik kai kurie virusai.

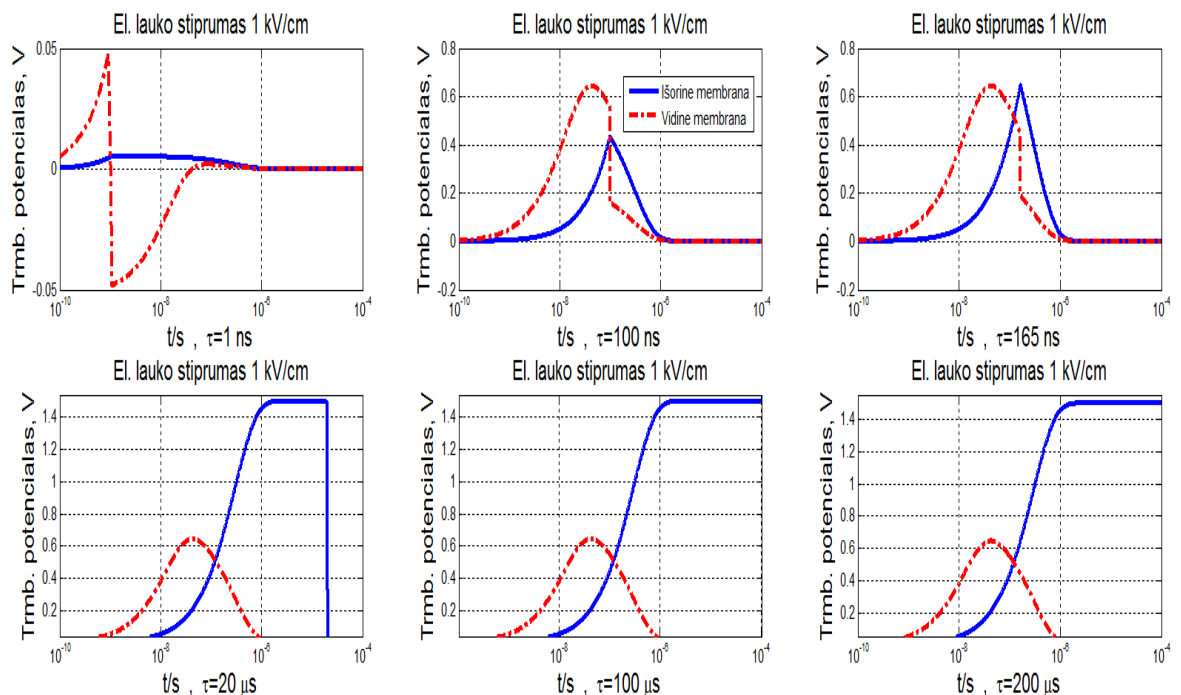
Prieš navikinių vaistų molekules, tokios kaip bleomicino į ląstelės branduolį patenka ir sukelia reikalaujamą citoksinį poveikį (DNR grandžių suardymą). Pro ląstelės membraną bleomicinas įprastomis sąlygomis patenka dviem būdais:

1. **Pinocitozės būdu**, bet intaktinėse molekulėse nepasižymi citoksiniu poveikiu [71]
2. **Endocitozės būdu**, kuomet vaisto molekulė saveikauja su nešikliniais baltymais ir taip patenka į ląstelės vidų. Tačiau nustatyta, kad šis procesas labai lėtas ir gali transportuoti ribotą kiekį molekulių [71]

Todėl, norint pasiekti didesnę šio vaisto efektyvumą, būtina naudoti didelius šio vaisto kiekius arba palengvinti šio vaisto patekimą į ląstelę. Dažniausiai naudojami būdai, tai elektroporacija [4,71] ir sonoporacija [73]. Bleomicino molekulės į branduolį patenka lengvai, nes jų skersmuo mažesnis, nei 9 nm . Tačiau jų patekimo į ląstelę per jos plazminę membraną palengvinimui reikia nuoseklių papildomų tyrimų.

Genų pernašos metu, DNR molekulės į branduolį patenka tik per keletą valandų. Toks ilgas DNR molekulės patekimo į branduolį laikotarpis dar nėra iki galo ištirtas.

Kad geriau išsiaiškinti kaip palengvinti bleomicino, didelių molekulių, genų patekimą į ląstelę arba mitochondrijas per jų plazmines membranas, taip pat DNR plazmidžių ir kitų didelių molekulių patekimui į branduolį, buvo nuspręsta atlikti kompiuterinį modeliavimą. Modeliavimo rezultatų kitimo grafikai pavaizduoti **2.3 pav.**



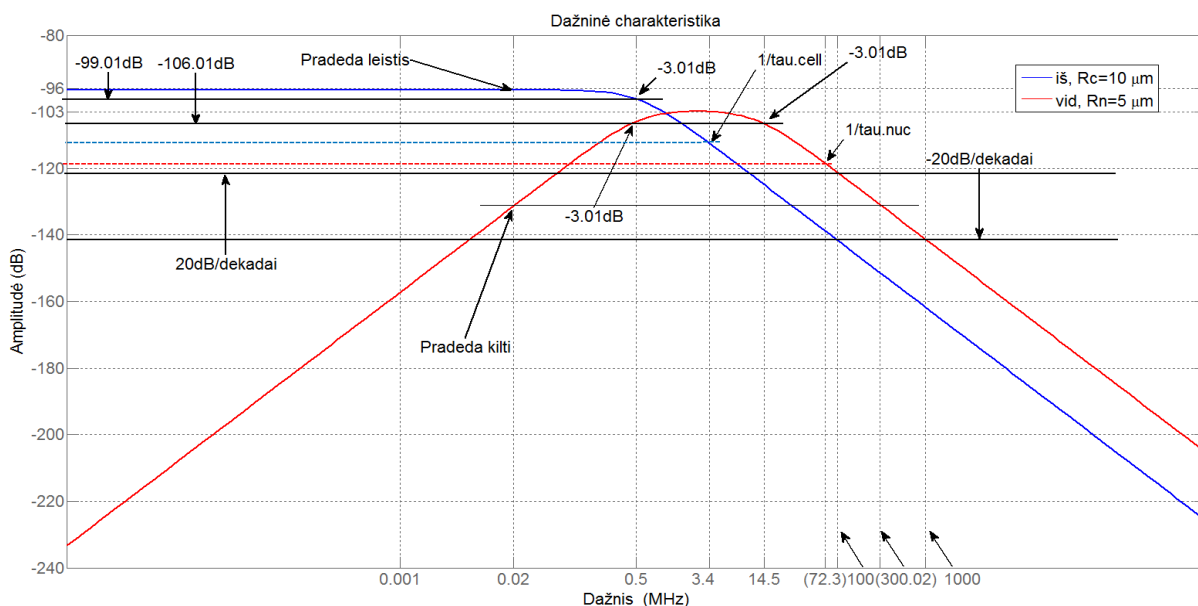
2.3 pav. TRMB potencialo kitimas, kai $E=1\text{ kV/cm}$, o ląstelės skersmuo $20\text{ }\mu\text{m}$

Atlikus literatūros šaltinių analizę ir išsiaiškinus pagrindinius elektroporacijos ir sonoporacijos tyrimų metodikos principus, taip pat naudojantis **2.1** ir **2.2** skyriuose aprašomomis formulėmis buvo sukurtas ląstelės TRMBP modelis. Modelis buvo sukurtas naudojantis inžinerinių ir mokslinių skaičiavimų paketu Matlab. Modeliui kurti buvo panaudoti standartiniai ląstelės ir suspensijos

elektriniai ir dielektriniai parametrai kurie aprašyti **1 lentelėje**. Lentelėje nėra nurodomi ląstelės ir branduolio spinduliai, kurie buvo parinkti pagal tyrimų pobūdį. Šio tyrimo metu buvo modeliuojamas ląstelės ir ląstelės organelių membranų indukuotieji potencialai. Kadangi elektroporacijos efektyvumas priklauso nuo veikiamo membranos paviršiaus ploto, todėl kai modeliavimo metu parenkamas mažas branduolio spindulys ($1,5 - 5 \mu m$) gautus branduolio TRMBP dydžius galime laikyti artimus mitochondrijos ar kitos ląstelės organelės TRMBP. Mitochondrijos neturi stabilios formos, dažniausiai būna cilindriškos, bet kai kuriais atvejais ir apvalios. Todėl modelio skaičiavimuose laikoma, kad branduolio TRMBP atitinka ląstelės organelių TRMBP.

2.4. Transmembraninio potencialo dažninės ir fazinės priklausomybės

Tyrimo metu, naudojantis **2.2** ir **2.7** perdavimo funkcijų formulėmis buvo iširtos ląstelės membranų TRMBP dažninės ir fazinės charakteristikos. Atliktas tyrimas parodė, kad dažniai mažesni už $2 \cdot 10^4$ Hz išorinė membrana praleidžia geriausiai, nes dažniui pasiekus $2 \cdot 10^4$ Hz ribą, prasideda membranos TRMBP amplitudės kritimas. Vidinė membrana geriausiai praleidžia dažnius kurie yra siaurame dažnių juostos diapazone nuo $0,5 \cdot 10^6$ Hz iki $14,5 \cdot 10^6$ Hz. Šiame diapazone pastebimas $-3,01$ dB vidinės membranos TRMBP amplitudės kritimas, kas atitinka $0,7$ amplitudės lygio. Todėl dažniai nepatenkantys į šio diapazono ribas suteiks didesnę slopinimą.



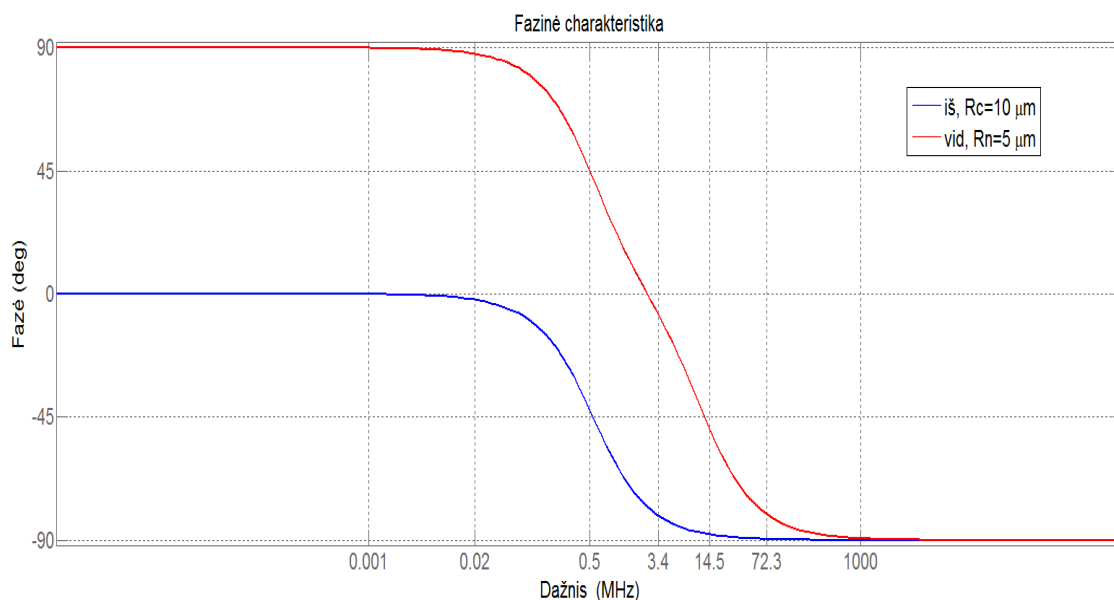
2.4 pav. Ląstelės dažninė charakteristika, kai ląstelės skersmuo $20 \mu m$

Išorinės membranos TRMBP $-3,01$ dB amplitudės kritimas pastebimas esant $0,5 \cdot 10^6$ Hz dažniui. Todėl išorinę membrana galime laikyti žemų dažnių filtru, o vidinę juostiniu filtru. Tiek vidinė tiek išorinė membranos veikia kaip pirmos eilės filtrai, nes dažniui padidėjus dekada abiejų membranų amplitudės lygis sumažėja -20 dB (žiūr. **2.4 pav.**). Toks amplitudės lygio mažėjimas

dekadai pastebimas diapazone nuo $3,4 \cdot 10^6 \text{ Hz}$ iki $1 \cdot 10^9 \text{ Hz}$. Dažnių juostoje iki $3,4 \cdot 10^6 \text{ Hz}$ matomas 20 dB dekadai vidinės membranos TRMBP amplitudės didėjimas. Kai $R_c = 10 \mu\text{m}$, sumodeliuotas -99 dB potencialo lygis, o vidinės membranos, kai $R_n = 5 \mu\text{m}$ sumodeliuotas -103 dB potencialo amplitudė. Skirtumas tarp amplitudžių -7 dB , kuris parodo, kad elektriniai impulsai, kurių pasikartojimo dažnis diapazone nuo $0,02 \cdot 10^6 \text{ Hz}$ iki $1 \cdot 10^9 \text{ Hz}$ išorinės membranos TRMBP bus didesnis 2,24 karto.

Konstantos $1/\tau_{cell}$ ir $1/\tau_{nuc}$ žymi stačiakampio impulso energijos spektro pagrindinio lapelio pabaigą, kas parodo sukuriama spektro harmonikų dažnį [62]. Išanalizavus ląstelės dažninę charakteristiką galima tinkamai parinkti stačiakampio impulso trukmę bei atitinkamą elektrinio signalo amplitudę. Tinkamai suderinta impulso trukmė ir amplitudė padės pasiekti TRMBP kritinę ribą abiejose membranose vienu metu, todėl bus galima pagerinti elektroporacijos efektyvumą. Taip pat atsižvelgiant į dažnines ir fazines charakteristikas galima tiksliau parinkti tolimesnių tyrimų nustatymus.

Fazės priklausomybė nuo dažnio (**2.5 pav.**) parodo, kad vidinės membranos reakcija į elektrinį impulsą yra daug greitesnė nei išorinės membranos. Todėl atsižvelgiant į sumodeliuotas dažnines ir fazines charakteristikas galima teigti, kad vidinei membranai labiau tinka trumpesni elektriniai impulsai, o išorinei ilgesni.

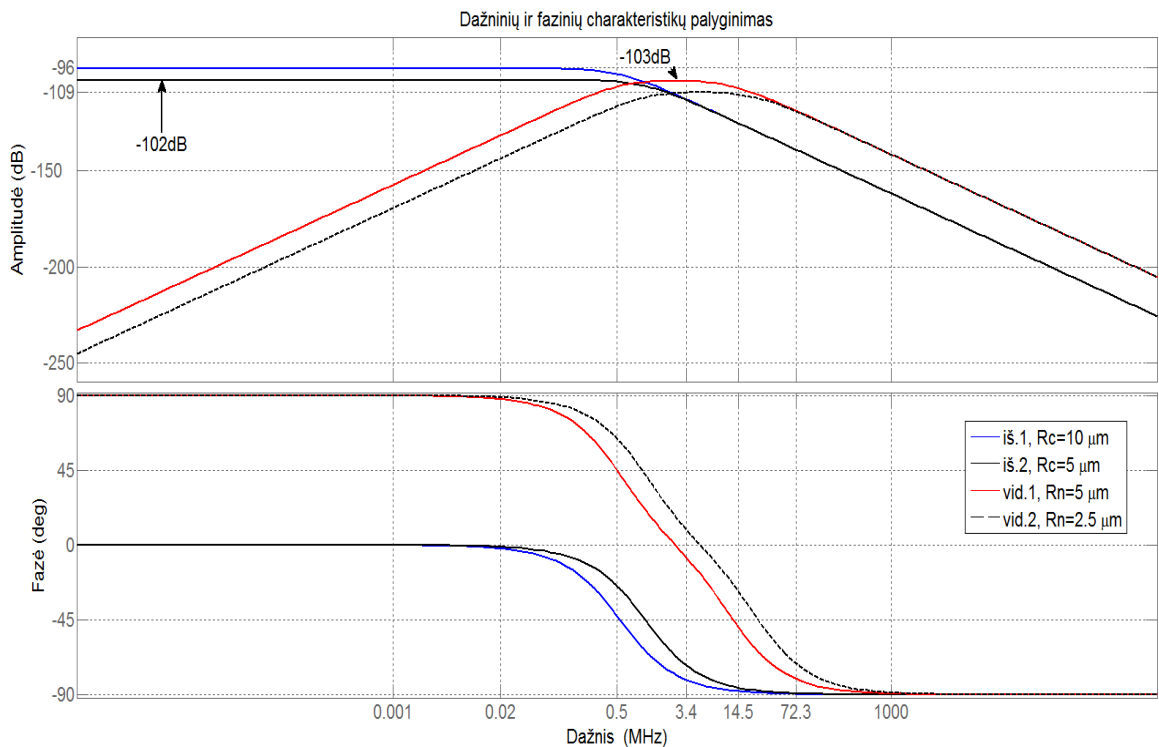


2.5 pav. Ląstelės fazinė charakteristika, kai ląstelės skersmuo $20 \mu\text{m}$

Kaip matome iš formulių **2.2. skyriuje** didelę įtaką TRMBP slopinimui turi ląstelės skersmuo, nuo kurio priklauso membranų užsikrovimo laiko konstantų didumas. Todėl norint ištirti dažninių ir fazinių charakteristikų priklausomybę nuo ląstelės skersmens buvo atliktas skirtingo diametro ląstelių

charakteristikų palyginimas. Analogiškai kaip **2.4 pav.** ir **2.5 pav.** buvo sumodeliuotos $10\ \mu\text{m}$ priklausomybės ir pateiktos viename grafike palyginimui (**žiūr. 2.6 pav.**).

Iš gautų grafikų matome, kad dažnių diapazonai kuriose membranos yra pralaidžios trumpiems arba ilgiems impulsams sutampa. Tai parodo, kad ląstelės skersmuo nedaro įtakos pirmos eilės filtro dažninei charakteristikai, bet pastebimas didesnis amplitudės slopinimas. Išorinės membranos (iš.2) TRMBP amplitudė yra $-102\ \text{dB}$, o tai $-6\ \text{dB}$ didesnis slopinimas, nei $20\ \mu\text{m}$ ląstelės atveju. Vidinės membranos apskaičiuotas TRMBP amplitudė yra $-109\ \text{dB}$, o tai $-7\ \text{dB}$ mažiau nei vidinės membranos. Tokį dėsningumą galima paaiškinti tuo, kad abiejų ląstelių atvejais branduolio ir ląstelės skersmuo skyrėsi du kartus. Iš fazinių charakteristikų palyginimo **2.6 pav.** pastebime, kad $10\ \mu\text{m}$ ląstelės tiek išorinės tiek vidinės membranų reakcijos į elektrinį impulsą yra greitesnės nei $20\ \mu\text{m}$ ląstelės membranų.



2.6 pav. Dažniųjų ir fazinių charakteristikų palyginimas, kai ląstelės skersmuo $10\ \mu\text{m}$ arba $20\ \mu\text{m}$

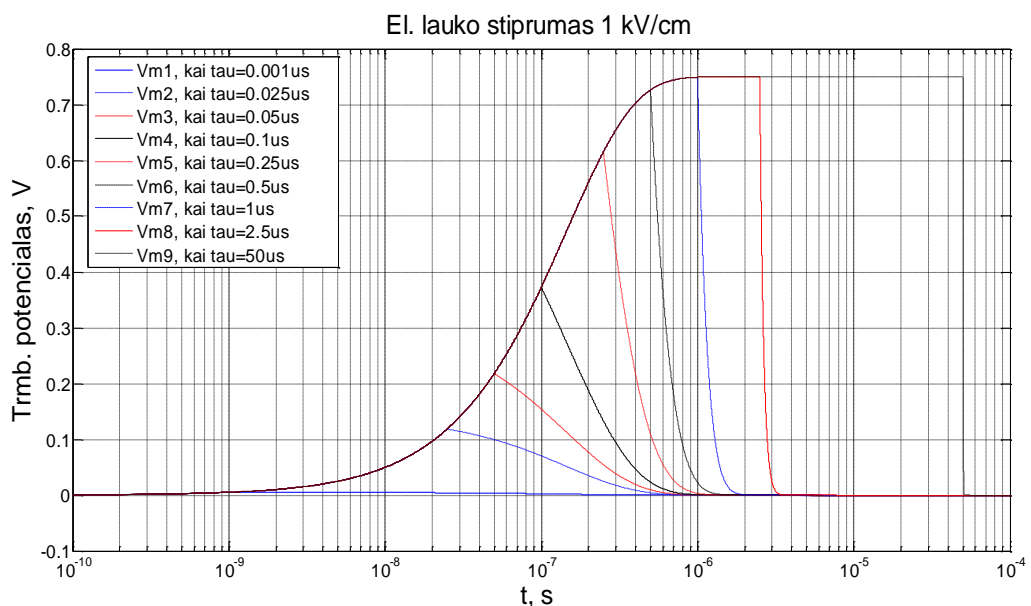
Gauti charakteristikų palyginimo rezultatai parodo, kad ląstelės skersmuo tiesiogiai susijęs su TRMBP dydžiu, veikiant ją skirtingais impulsų pasikartojimo dažnumais, bet mažesnės ląstelės yra jautresnės ir greičiau reaguoja (užsikrauna) paveikus išoriniu elektriniu impulsu. Reikia paminėti, kad tokie tyrimų duomenys gauti, kai ląstelių skersmenys skyrėsi du kartus, bet daroma prielaida, kad skirtingų diametrų ląstelių dažniųjų ir fazinių charakteristikų kitimo dėsningumai turėtų išlikti panašūs ir kitokio skersmens ląstelėms.

2.5. Transmembraninio potencialo priklausomybė nuo impulso trukmės

Atliekant simuliacinius eksperimentus buvo panaudotas vienas stačiakampio formos impulsas, o impulso trukmė keičiama pasirinktais laiko intervalais atsižvelgiant į branduolio ir išorinės membranų užsikrovimo laikus.

Norint geriau pateikti stačiakampio impulso trukmės įtaką abiejų membranų transmembraninio potencialo pokyčiui, impulso amplitudė buvo nekeičiama ir nustatyta, kad užtikrinti 1 kV/cm kintančio elektrinio lauko stiprumui, o ląstelės skersmuo $10 \mu\text{m}$ arba $20 \mu\text{m}$. Ląstelės skersmuo parinktas atsižvelgiant į CHO (Kinijos žiurkėno kiaušidžių) ląstelių skersmenį ($6 - 25 \mu\text{m}$) [63]. Modelyje ląstelės branduolio (vidinė membrana) skersmuo visais atvejais nustatytas dvigubai mažesnis nei ląstelės skersmuo.

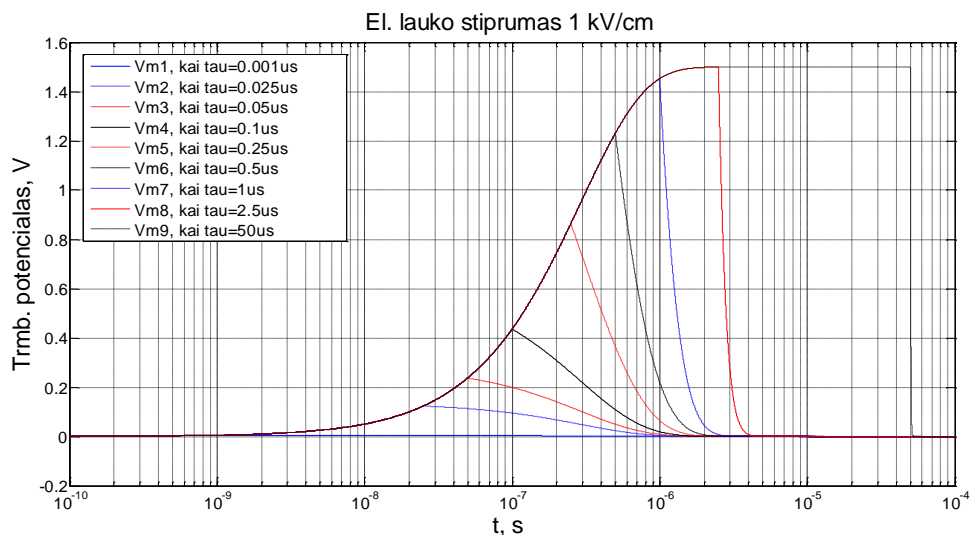
Pagal pateiktus ląstelės elektrinius parametrus (**1 lentelė**) buvo gauta, kad $10 \mu\text{m}$ ląstelės $\tau_{cell} = 0,14 \mu\text{s}$, o $5 \mu\text{m}$ branduolio $\tau_{nuc} = 6,9 \text{ ns}$. Kai ląstelės skersmuo $20 \mu\text{m}$ tuomet $\tau_{cell} = 0,29 \mu\text{s}$, o $10 \mu\text{m}$ branduolio $\tau_{nuc} = 13 \text{ ns}$. Laiko konstantos nulemia membranų užsikrovimo ir išsikrovimo greitį, o tai turi tiesioginę įtaką parenkant impulse trukmę.



2.7 pav. Ląstelės išorinės membranos transmembraninio potencialo priklausomybė nuo impulso trukmės, kai ląstelės skersmuo $10 \mu\text{m}$, o branduolio skersmuo $5 \mu\text{m}$. V_m – išorinė membrana

Pirmiausiai buvo atlikti išorinės ląstelės membranos transmembraninio potencialo priklausomybės nuo impulso trukmės simuliaciniai eksperimentai. Potencialo kreivės (**žiūr. 2.7 pav.**) $V_m1 - V_m8$ atitinka elektrinio impulso trukmes $0,001 \mu\text{s}$; $0,025 \mu\text{s}$; $0,05 \mu\text{s}$; $0,1 \mu\text{s}$; $0,25 \mu\text{s}$; $0,5 \mu\text{s}$; $1 \mu\text{s}$; $2,5 \mu\text{s}$; $50 \mu\text{s}$.

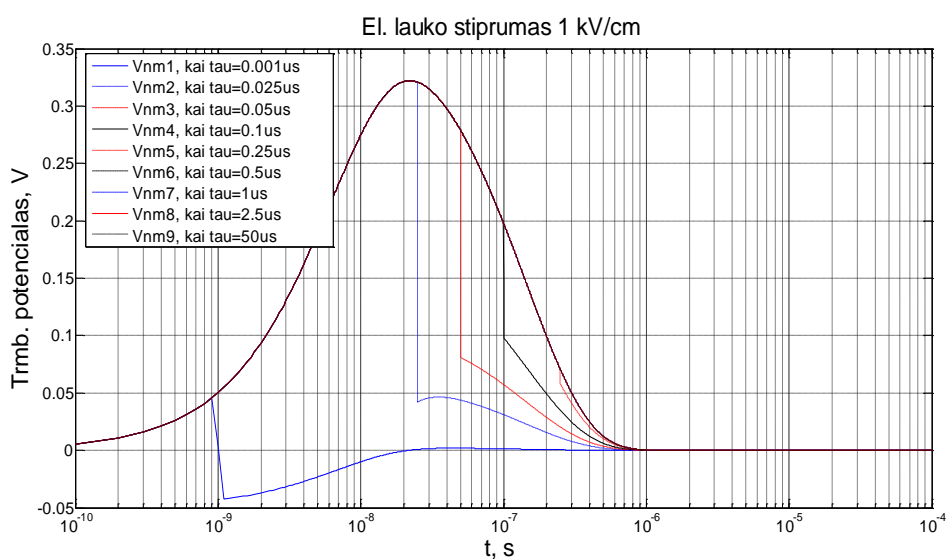
Transmembraninio potencialo didumas tiesiogiai priklauso nuo elektrinio lauko stiprumo ir nuo to ar membrana spėja užsikrauti iki didžiausios vertės kol impulsas pasibaigia. Taip pat svarbus faktorius yra ląstelės geometriniai parametrai, (šiam modelyje atsižvelgiama į ląstelės ir branduolio spindulius), bet atliekant laikinės analizės tyrimus parenkami du konkretūs ląstelių dydžiai. Analizuodami grafiką pateiktą **2.7. pav.** matome, kad didėjant impulso trukmei išorinės membranos transmembraninio (TRMBP) skaitinė vertė didėja, tol kol pasiekia didžiausią reikšmę. Kai $\tau = 1 \text{ ns}$ TRMBP pokytis labai nežymus, o kai $\tau = 50 \mu\text{s}$ ląstelės membranos potencialas pasiekia $0,75 \text{ V}$ skaitinę vertę. Išorinės membranos skaitinė TRMBP vertė $0,75 \text{ V}$ ribą pasiekia kai impulso trukmė yra apie $0,56 \mu\text{s}$, kas atitinka $4 \cdot \tau_{\text{cell}}$ toliau didinant impulso trukmę potencialas nesikeičia. Remiantis literatūros šaltiniais [12,] žinoma, kad TRMBP riba prie kurios ląstelės membranoje susidaro laidžiosios poros yra nuo $0,4 - 0,5$ iki 1 V , bet kitur nurodoma pradinė riba $0,2 \text{ V}$ [61]. Žinoma, kad potencialui pasiekus 250 mV vertę membrana tampa laidži mažoms molekulėms [10], bet šiuo modeliavimo atveju siekiama išsiaiškinti pralaidumą didelėms molekulėms, todėl laikysim, kad tikroji riba nuo kurios prasideda porų formavimasis yra $0,4 \text{ V}$. Tuomet iš grafiko matyti, kad $10 \mu\text{m}$ skersmens ląstelėje elektroporacija prasideda, kai impulso trukmė daugiau nei $0,1 \mu\text{s}$ ($V_{m4} = 0,37 \text{ V}$). Bet esant 1 kV/cm elektrinio lauko stiprumui kritinė 1 V vertė nėra pasiekama. Todėl galima teigti, kad išorinėje membranoje porų prisivėrimas įvyksta ir medžiagų pralaidumas galimas.



2.8 pav. Ląstelės išorinės membranos transmembraninio potencialo priklausomybė nuo impulso trukmės, kai ląstelės skersmuo $20 \mu\text{m}$, o branduolio skersmuo $10 \mu\text{m}$. V_m – išorinė membrana

Naudojant tokio pat elektrinio lauko stiprumą, buvo sumodeliuota impulsų trukmės įtaka TRMBP, kai ląstelės skersmuo $20 \mu\text{m}$. Pastebėti panašūs potencialo kitimo dėsniumai, bet tais pačiais laiko momentais potencialo skaitinė vertė buvo didesnė nei $10 \mu\text{m}$ ląstelės (**žiūr. 2.8 pav.**). Kai $\tau = 0,1 \mu\text{s}$, tai $V_{m4} = 0,43 \text{ V}$, tai labai panašus dydis kaip ir nei $10 \mu\text{m}$ ląstelės. Bet kai $\tau =$

$1 \mu\text{s}$ tuomet $V_{m7} = 1,45 \text{ V}$, o tai beveik dvigubai daugiau nei $10 \mu\text{m}$ ląstelės. Kritinė potencialo vertė šiuo atveju pasiekama intervale nuo $0,25$ iki $0,5 \mu\text{s}$.

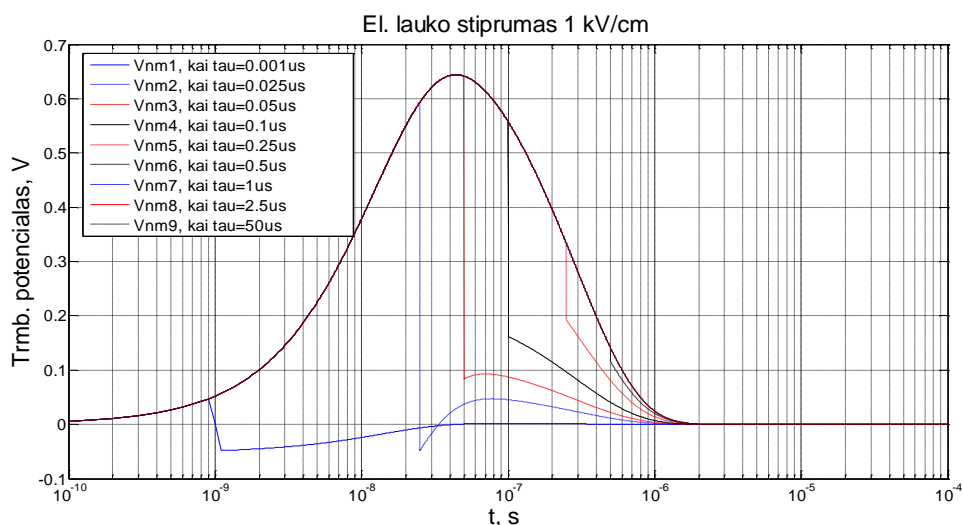


2.9 pav. Ląstelės vidinės membranos transmembraninio potencialo priklausomybė nuo impulso trukmės, kai ląstelės skersmuo $10 \mu\text{m}$, o branduolio skersmuo $5 \mu\text{m}$. V_{nm} – vidinė membrana

Pastebimai didesnės potencialo vertės randamos ir kitais stebėtais impulso trukmių atvejais. Didesnį TRMBP sąlygoja didesnis išorinės membranos užsikrovimo greitis, kuris priklauso nuo ląstelės spindulio [11]. Tik 1 ns atveju TRMBP dydis išlieka nepakitęs. Tai galima paaiškinti remiantis ląstelės dažninės priklausomybės modeliavimu (2.5 skyrius) bei literatūra [59 – 62].

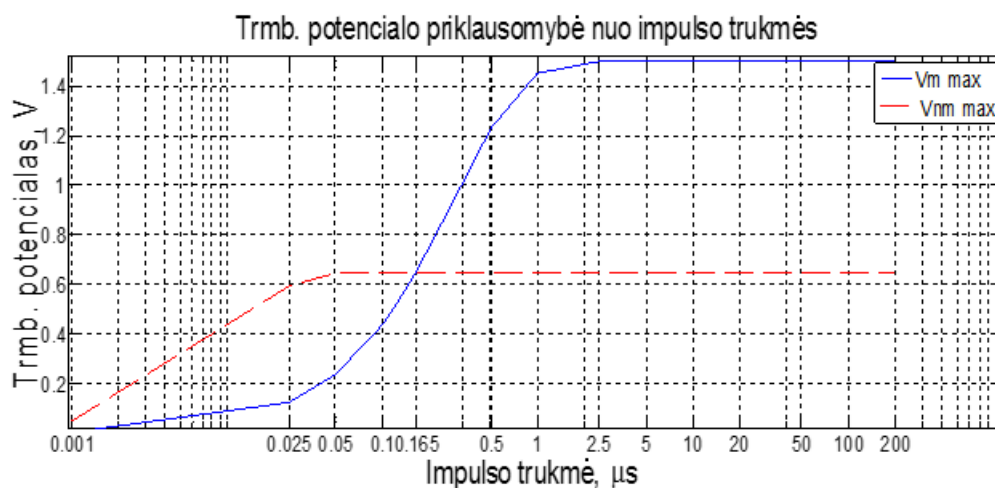
Gauti dviejų skirtingo didumo ląstelių išorinės membranos TRMBP modeliavimo rezultatai patvirtina literatūroje [18] pateiktą išvadą jog kritinė TRMBP priklauso nuo ląstelės didumo. Taip pat analogiški simuliaciniai tyrimai buvo atlikti ir ląstelės branduoliui. TRMBP kritinė vertė vidinei membranai laikoma tokia pat kaip ir išorinei, bet jautrumas elektrinio lauko stiprumui nurodomas didesnis [61], tai aiškinama didesniu baltymu kiekiu vidinėse membranose. Todėl modeliavimo metu buvo bandoma pastebėti TRMBP nuo $0,4$ iki 1 V . Kai $\tau = 1 \text{ ns}$ tuomet priešingai nei abiem prieš tai analizuotais išorinių membranų atvejais pastebimas TRMBP nežymus padidėjimas V_{nm1} (žiūr. 2.9 pav.). Vidinės membranos atsakas į išorinį elektrinį impulsą buvo modeliuotas su tokiais pat impulsų trukmėmis kaip ir 2.7 pav. ir 2.8 pav., tam kad būtų galima stebėti galimą ryšį tarp abiejų membranų užsikrovimo. Kai impulsų trukmės nuo $0,025$ iki $0,1 \text{ ns}$ tirtais laiko intervalais pastebima vidinės membranos TRMBP regeneracinė depoliarizacija (1.2.2. skyrius). Depoliarizacija stebima kol impulso trukmė viršija τ_{cell} . Kai impulso trukmė ilgesnė nei τ_{cell} tuomet depoliarizacijos nėra, vidinė membrana impulso trukmei pasiekus τ_{nuc} reikšmę pilnai įsikrauna ir pasiekia didžiausią TRMBP. Po to iškart pradeda išsikraudinėti, kol TRMBP pasiekia 0 V . Didžiausias apskaičiuotas potencialas $0,32 \text{ V}$, o tai nesiekia pradinės poracijos vertės, todėl 1 kV/cm elektrinio lauko stiprumas

nėra pakankamas užtikrinti porų prasivėrimą vidinėje $5 \mu\text{m}$ skersmens branduolio membranoje nepriklausomai nuo impulso trukmės.



2.10 pav. Ląstelės vidinės membranos transmembraninio potencialo priklausomybė nuo impulso trukmės, kai ląstelės skersmuo $20 \mu\text{m}$, o branduolio skersmuo $10 \mu\text{m}$. V_{nm} – vidinė membrana

Literatūroje nurodoma, kad $20 \mu\text{m}$ ląstelę veikiant 1 kV/cm elektriniu lauku ir impulso trukmei esant $100 \mu\text{s}$, porų dydis išorinėje membranoje yra $20 - 110 \mu\text{m}$, [62]. Nors **2.7 – 2.8 pav.** naudota didžiausia impulso trukmė $\tau = 50 \mu\text{s}$, bet kadangi nepastebėta TRMBP pokyčio kai $\tau > 1,16 \mu\text{s}$ galima teigti, kad porų dydis membranoje panašus prie visų impulso trukmių didesnių nei $4 \cdot \tau_{cell}$ esant 1 kV/cm elektriniam laukui, kai ląstelės skersmuo $20 \mu\text{m}$ (**žiūr. 2.11 pav.**).



2.11 pav. Ląstelės išorinės ir vidinės membranos transmembraninio potencialo priklausomybė nuo impulso trukmės. Grafike vaizduojamos didžiausios potencialo vertės prie atitinkamų impulso trukmių, ląstelės skersmuo $20 \mu\text{m}$, $E=1 \text{ kV/cm}$

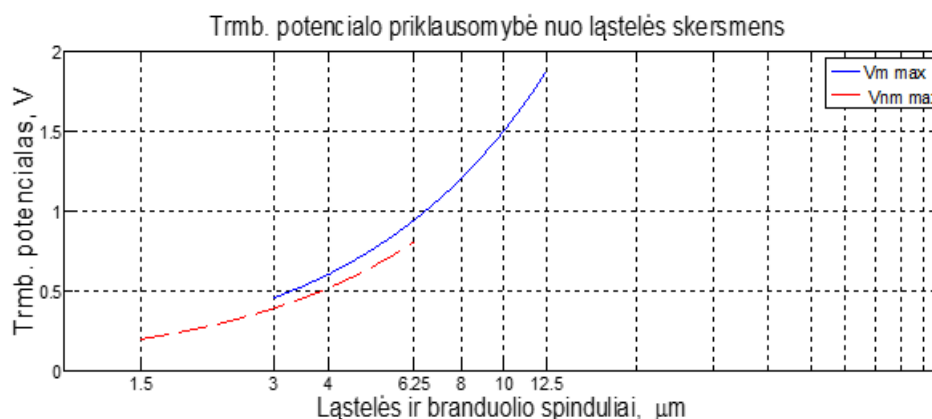
Atlikus didžiausių TRMBP verčių analizę, pastebėta, kad tam tikru laiko momentu išorinės ir vidinės membranos potencialas sutampa. Kai $\tau=0,165 \mu\text{s}$, tuomet $V_m = V_{nm}$. Vidinės membranos

TRMBP didžiausia vertė apskaičiuojama, kai $\tau = 52 \text{ ns}$, o ši trukmė atitinka $4 \cdot \tau_{nuc}$. Kai $\tau > 52 \text{ ns}$ TRMBP nesikeičia.

2.6. Transmembraninio potencialo priklausomybės nuo ląstelės skersmens

Šio tyrimo metu atlikti ląstelės skersmens įtakos TRMBP didumui modeliavimo eksperimentai. Pirmiausiai buvo siekiama išsiaiškinti, kaip kinta TRMBP dydis keičiant išorinės ir vidinės membranų spindulius, bet nekeičiant elektrinio lauko stiprumo ($E=1\text{kV/cm}$) ir impulse trukmės ($\tau = 20 \mu\text{s}$).

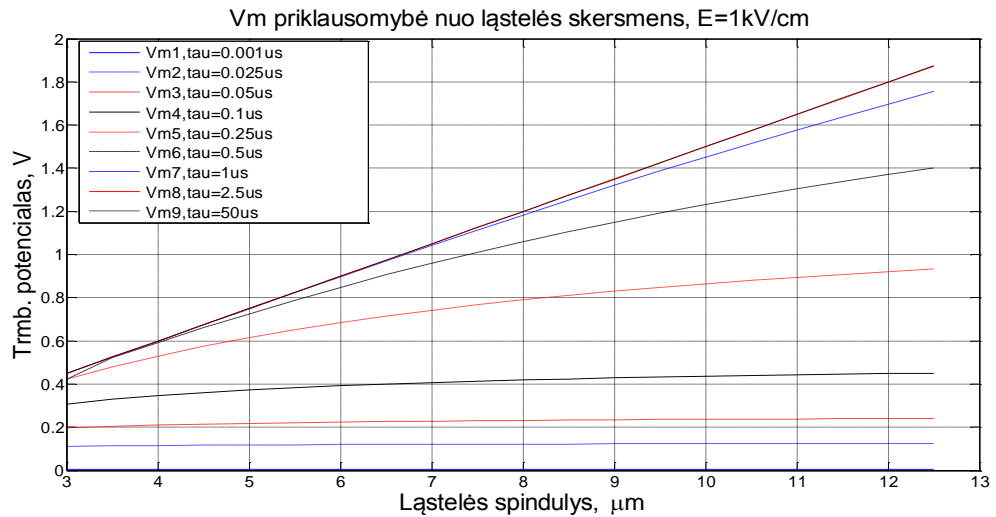
Paveikslėlyje **2.12** pav. matome, kad ląstelės skersmeniui esant $25 \mu\text{m}$ ($R_c = 12,5 \mu\text{m}$, $R_n = 6,25 \mu\text{m}$) sumodeliuojamas didžiausias išorinės ir vidinės membranų TRMBP, o kai ląstelės skersmuo $6 \mu\text{m}$ ($R_c = 3 \mu\text{m}$, $R_n = 1,5 \mu\text{m}$) mažiausias. Todėl galime teigti, kad modeliavimo metu gautas potencialo dydis tiesiogiai priklauso ląstelės skersmens, o modeliavimo rezultatai patvirtina literatūros šaltiniuose aprašytas išvadas [59 – 62].



2.12 pav. Ląstelės išorinės ir vidinės membranos transmembraninio potencialo priklausomybė nuo ląstelės skersmens. Grafike vaizduojamos didžiausios potencialo vertės esant parinktam ląstelės ir branduolio skersmeniui. $E=1\text{kV/cm}$, $\tau=20\mu\text{s}$

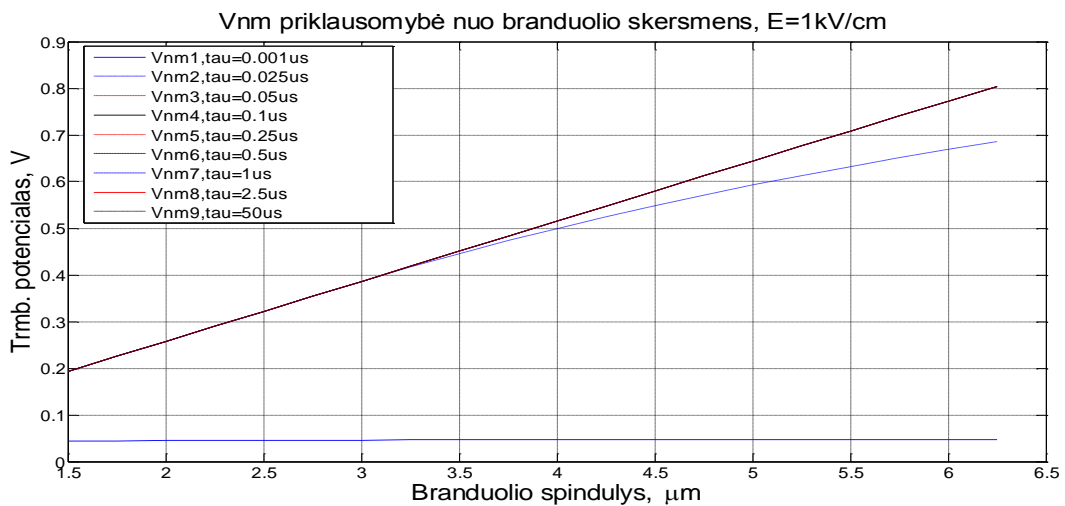
Sužinojus ryšį tarp ląstelės skersmens ir TRMBP, buvo sumodeliuota išorinės ir vidinės membranų skerspjūvių priklausomybės nuo impulso trukmių (žiūr. **2.12 pav**; **2.13 pav.**). Išorinės membranos skersmenys (žiūr. **2.12 pav.**) buvo parinkti atsižvelgiant į CHO ląstelių skersmenį ($6 - 25 \mu\text{m}$) [63], bet grafiko x ašyje atvaizduoti ląstelių spinduliai, kadangi jie vedami į modelio skaičiavimo formules (**2.1. ir 2.2. skyriai**).

Atlikus išorinės membranos modeliavimą pastebėta, kad kai ląstelės skersmuo $6 \mu\text{m}$ ($R_c = 3 \mu\text{m}$), visais modeliuotais impulse trukmių intervalais apskaičiuotas mažiausias TRMBP, o kai poveikio trukmė $0,025 \mu\text{s}$ TRMBP apskaičiuotas pats mažiausias iš modeliuotų impulsų trukmių.



2.13 pav. Ląstelės vidinės membranos transmembraninio potencialo priklausomybė nuo ląstelės skersmens, kai keičiama impulso trukmė. Grafike vaizduojamos didžiausios potencialo vertės esant parinktam ląstelės skersmeniui

Impulso trukmei esant 1 ns nepastebėtas TRMBP padėjimas nepriklausomai nuo ląstelių skersmens. Kai $\tau = 0,05\ \mu\text{s}$ pastebėtas TRMBP didėjimas didėjant ląstelės spinduliui, o didžiausias beveik prie visų laiko intervalų (išskyrus 1 ns ir $0,0025\ \mu\text{s}$) TRMBP apskaičiuotas kai ląstelės skersmuo $25\ \mu\text{m}$ ($R_c = 3\ \mu\text{m}$).



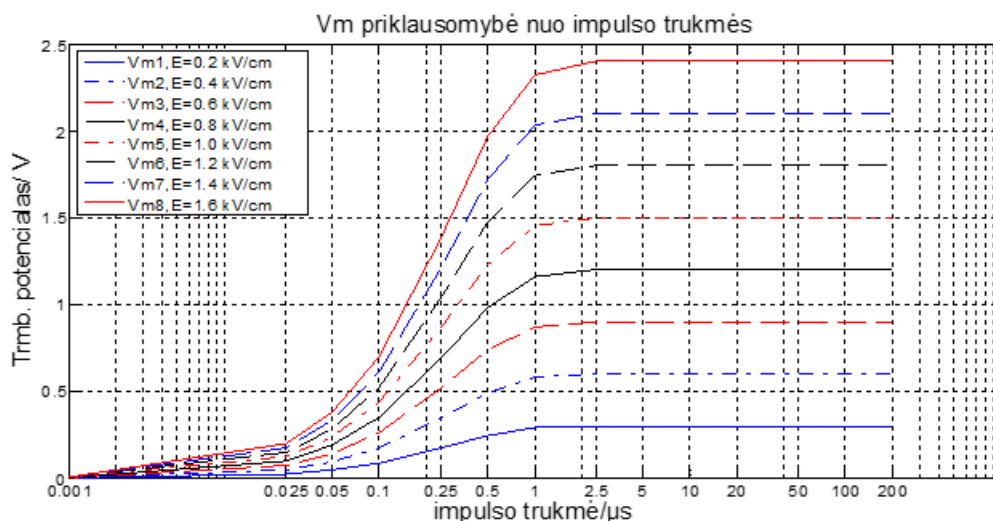
2.14 pav. Ląstelės vidinės membranos transmembraninio potencialo priklausomybė nuo branduolio skersmens, kai keičiama impulso trukmė. Grafike vaizduojamos didžiausios potencialo vertės esant parinktam branduolio skersmeniui

Analogiškas tyrimas buvo atliktas ir su vidinės membranos skirtingais skersmenų didumais (**2.14 pav.**). Pastebėta, kad visais analizuotais impulse trukmių atvejais (išskyrus 1 ns) TRMBP didėjo didėjant branduolio spinduliui. Kai impulso $\tau = 1\text{ ns}$ TRMBP pastebėtas, bet jo didumas nesikeitė

didėjant branduolio spinduliui. TRMBP nebuvimą (2.12 pav.) arba jo mažą padidėjimą (2.13 pav.) galima paaiškinti remiantis membranų užsikrovimo laikų ir impulso trukmių sąryšiais (2.2 skyrius). Kai $\tau = 0,0025 \mu s$ pastebėtas V_{nm2} kreivės išlinkimas lyginant su didesnių impulso trukmių kreivėmis. V_{nm2} kreivės pokytį kai branduolio skersmenys viršija $3,25 \mu m$ galima paaiškinti didesnėmis τ_{nuc} vertėmis, todėl $0,0025 \mu s$ neužtenka pilnai užkrauti membraną (žiūr. 2.10 pav.). Taip pat gauti rezultatai patvirtina jog didesnės ląstelės yra jautresnės elektrinio lauko poveikiui dėl veikiamo didesnio paviršiaus ploto [18].

2.7. Transmembraninio potencialo priklausomybė nuo elektrinio lauko stiprumo

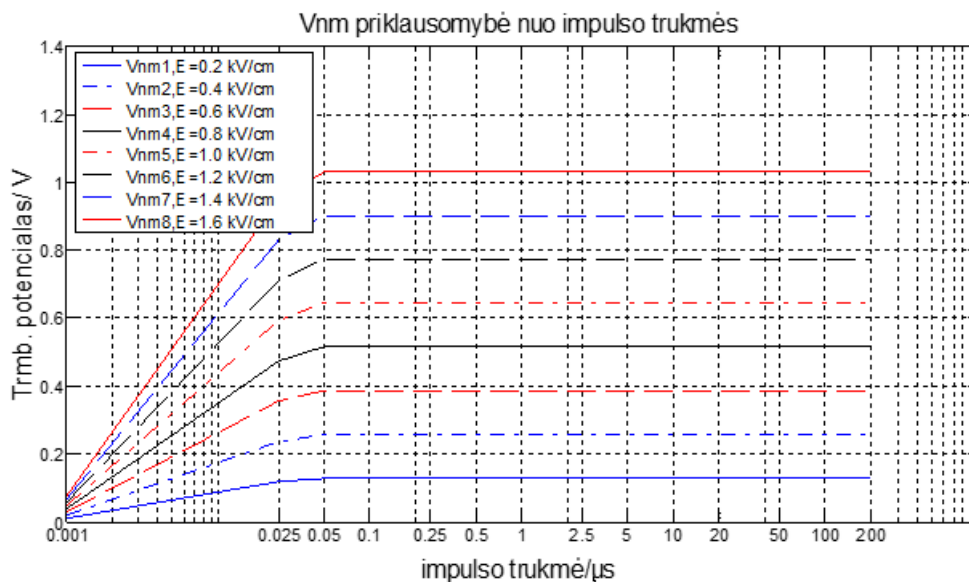
VDU (Vytauto Didžiojo universitetas) gamtos mokslų fakulteto tyrimuose standartiškai naudojama $1 - 1,5 kV/cm$ elektrinio lauko vertės, o impulsų trukmės parenkamos $20 - 200 \mu s$ intervale [64]. Elektrinio lauko stiprumas ir impulso trukmė parenkami atsižvelgiant į elektroporacijos pobūdį. Kai siekiama pagerinti medžiagų pernašą per membraną, tuomet kuo didesnės amplitudės impulsas naudojamas tuo jis turi būti trumpesnis [62]. Elektrinio lauko stiprumas gali siekti ir dešimtis ar šimtus kV/cm , bet tuomet impulsai privalo būti ns arba ps eilės [62].



2.15 pav. Ląstelės išorinės membranos transmembraninio potencialo priklausomybė nuo impulso trukmės, kai keičiamas elektrinio lauko stiprumas. Grafike vaizduojamos didžiausios potencialo vertės prie atitinkamų impulso trukmių, ląstelės skersmuo $20 \mu m$

Jeigu norima pasiekti negrįžtamą membranų pažeidimą, tuomet ilginama impulso trukmė, o elektrinio lauko stiprumas parenkamas nuo 1 iki $100 kV/cm$ atsižvelgiant į veikiamą turį (žiūr. 1.3.3. skyrius). Tai dažniausiai naudojama naikinant auglius žmogaus organizme.

Elektrinio lauko stiprumas buvo keičiamas nuo $0,2 \text{ kV/cm}$ iki $1,6 \text{ kV/cm}$ ir stebimas TRMBP pokytis prie skirtingų impulso trukmių. Pirmuoju atveju modeliavimas buvo atliktas naudojant $20 \mu\text{m}$ išorinės membranos (ląstelės) skersmenį (žiūr. **2.15 pav.**). Tyrimas parodė, kad didinant elektrinio lauko stiprumą ir stačiakampio impulse trukmę TRMBP didėja, o didžiausia potencialo vertė prie visų elektrinio lauko stiprumų buvo pastebėta, kai impulse trukmė buvo $2,5 \mu\text{s}$.

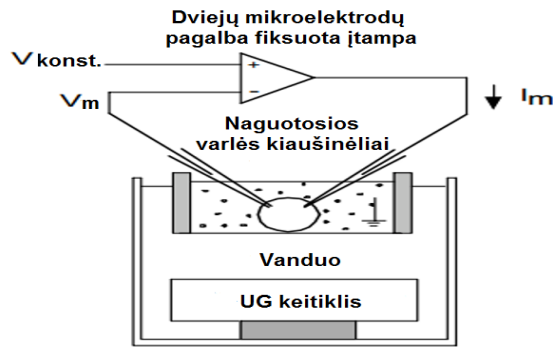


2.16 pav. Ląstelės vidinės membranos transmembraninio potencialo priklausomybė nuo impulso trukmės, kai keičiamas elektrinio lauko stiprumas. Grafike vaizduojamos didžiausios potencialo vertės prie atitinkamų impulso trukmių, branduolio skersmuo $10 \mu\text{m}$.

Analogiškas tyrimas buvo atliktas naudojant branduolio skersmenį. Atlikus TRMBP priklausomybę nuo elektrinio lauko stiprumo ir impulso trukmės pastebėti tokie pat potencialo kitimo dėsninukai kaip ir išorinės membranos atveju. TRMBP didėjo didinant elektrinio lauko stiprumą ir ilginant impulso trukmę. Analizuojant **2.15 pav.** ir **2.16 pav.**, reikia atsižvelgti, kad grafikų išvedimam naudotos didžiausios potencialo vertės prie parinktų impulso trukmių, todėl **2.16 pav.** nėra pastebimas V_{nm} kreivių nusileidimas, po to kai vidinės membranos TRMBP pasiekia didžiausią reikšmę. Didžiausia vidinės membranos potencialo vertė prie visų elektrinio lauko stiprumų buvo pastebėta, kai impulso trukmė buvo $0,05 \mu\text{s}$. Galima teigti, kad VDU gamtos mokslų fakulteto tyrimuose naudojamos elektrinio lauko stiprumo ir impulso trukmių vertės yra pakankamos užtikrinti laidžiųjų porų susidarymą ląstelės išorinėje membranoje. Efektyviausia vidinės ir išorinės membraną elektroporacija stebima, kai naudojami 100 ns eilės elektriniai impulsai [62], todėl impulsų trukmė nuo $20 \mu\text{s}$ kelia abejonių dėl abiejų membraną elektroporacijos vienu metu.

2.8. Sonoporų dydis plazminėje ląstelės membranoje

Kad nustatyti sonoporų dydį plazminėje ląstelės membranoje tyrimo metu buvo naudotas įtampos fiksavimo metodas (angl. Voltage clamp) [72]. Cilindriškos formos kamera ($1,5 - 0,3 \text{ cm}$), kurios dugnas buvo iš akustiškai laidžios medžiagos.



2.17 pav. Įtampos fiksavimo metodo schema [72]. V_m – transmembraninis potencialas, I_m – transmembraninė srovė, $V_{konst.} = -50 \text{ mV}$

Kamera buvo įdėta į kitą indą pripildyta vandens, tam, kad jo apačioje įtaisyto ultragarsinio keitiklio siunčiamos ultragarso bangos lengviau pasiektų kameros dugną ir joje esantį naguotosios varlės kiaušinėlį ($0,8 \mu\text{m}$). Kiaušinėlis buvo padėtas ant skaidraus kameros dugno. Dviem elektrodais buvo pradurta kiaušinėlio membrana ir iš įtampos šaltinio paduota -50 mV įtampa. Tarp elektrodų atsiradusi srovė pravėrė membranų poras. Kai prie membranos priartėdavo mikroburbulas, būdavo pastebimas transmembraninės srovės kritimas, nes veikiant ultragarsui, kavitacijos metu mikroburbulas praverdavo porą per kurią įvykdavo srovės nutekėjimas. Todėl siekiant išlaikyti tarp elektrodų esančią įtampą reikėjo kompensuoti. Kompensuota srovė buvo laikoma ta kuri reikalinga vienai porai praverti. Tyrimo principinė schema pavaizduota **2.17 pav.**

Transmembraninės srovės (angl. the transmembrane current) pasikeitimą sonoporacijos metu lemia jonų koncentracijos pasikeitimas dėl jų judėjimo per susidariusias ląstelės poras ir elektrinio potencialo gradientas tarp ląstelės membranos išorinės ir vidinės sienelių [41]. Iš visų jonų esančių ląstelės viduje ir jos išorėje, didžiausia įtaką transmembraninės srovės pasikeitimui turi tik teigiami Na , K ir neigiami Cl [44]. Srovės tankis gaunamas k -ųjų jonų, apskaičiuojamas pagal *GHK* (Goldman – Hodgkin – Katz) srovės lygtį [44]:

$$i_k = z_k \cdot F \cdot P_k \cdot U_k \cdot (c_k^{in} \cdot U^{U_k} - c_k^{ex}) / (e^{U_k} - 1), \quad (2.13)$$

čia

$$U_k = z_k \cdot F \cdot V / R \cdot T \quad (2.14)$$

z_k – jonų valentingumas, F – Faradėjaus konstanta, V – potencialas membranos išorėje, R – idealiųjų dujų konstanta, T – temperatūra,

$$P_k = D_k \cdot K_k / h \quad (2.15)$$

jonų pralaidumas, D_k – jonų difuzijos koeficientas [46], K_k – jonų pasiskistymo koeficientas, c_k^{in} ir c_k^{ex} parodo vidinę ir išorinę jonų koncentraciją, h – membranos storis. Taip pat naudoti parametrai: $V = -50 \text{ mV}$, $h = 7 \text{ nm}$ [17], $T = 293 \text{ K}$ ($19,85 \text{ }^\circ\text{C}$). Bendra transmembraninės srovės vertė apskaičiuojama pagal formulę [44]:

$$I = (\sum_k i_k) \cdot \pi \cdot r^2, \quad (2.16)$$

čia r – bendras spindulys N porų su spinduliu r_m (kai skaičiuojama srovė per vieną porą, tai r yra tos vienos poros spindulys) [44]:

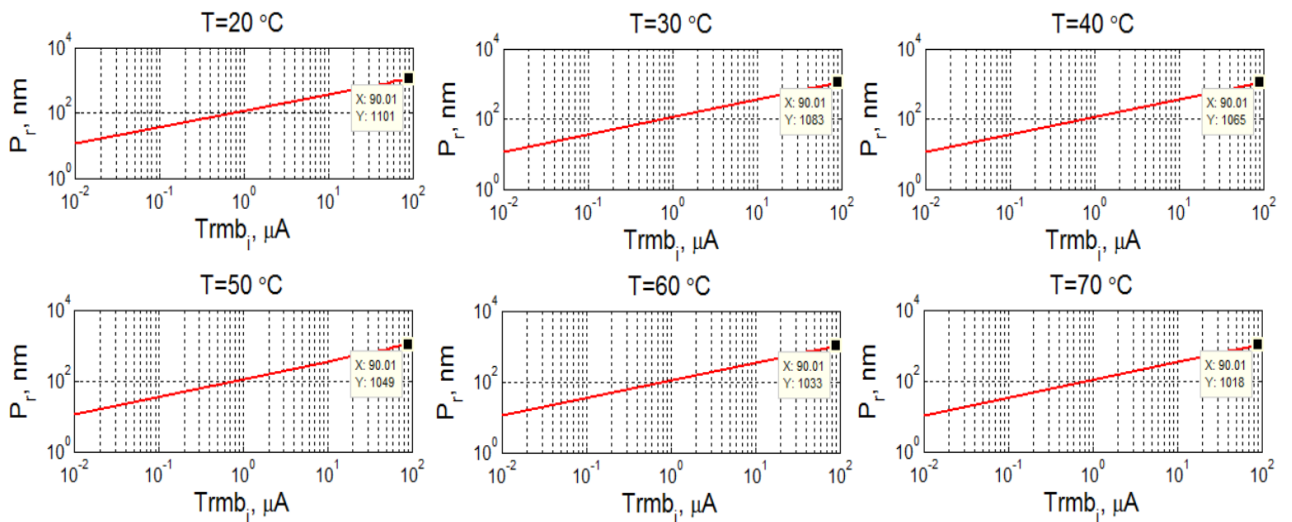
$$r = (\sum_{m=1}^N r_m^2)^{1/2} = I^{1/2} \cdot [\pi \cdot (\sum_k i_k)]^{-1/2} \quad (2.17)$$

2 Lentelė. Modelio parametrai [41]

| Jonai | c_k^{ex} , mM | c_k^{in} , mM | D_k , m^2/s | P_k , m/s | P_k^{pore} , m/s |
|---------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------|
| Na^+ | 96 | 10,1 | $1,33 \cdot 10^{-9}$ | $3,75 \cdot 10^{-10}$ | 0,266 |
| K^+ | 2 | 109,5 | $1,96 \cdot 10^{-9}$ | $9,55 \cdot 10^{-10}$ | 0,392 |
| Cl^- | 100 | 37,7 | $2,03 \cdot 10^{-9}$ | $3,40 \cdot 10^{-10}$ | 0,406 |

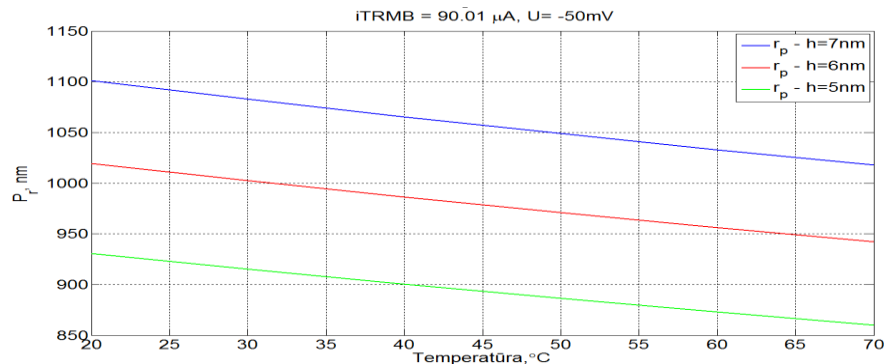
Pasinaudojus modelio autorių pateiktomis formulėmis, Matlab programinio paketo pagalba buvo atliktas transmembraninės srovės įtakos sonoporų didumui modeliavimas. Buvo sumodeliuota poros spindulio priklausomybė nuo transmembraninės srovės, jeigu terpėje pasikeistų temperatūra. Modelio parametrai pateikti **2 Lentelėje**. Temperatūra didėtų tuo atveju jeigu ultragarsas veiktų terpę ilgesnį laiko momentą arba sumažėtų suspensijos kiekis kurioje yra ląstelė. Taip pat modeliavimo rezultatai parodė, kad prasivėrusios poros spindulys priklauso nuo joninės srovės didumo arba susidariusio transmembraninio potencialo poveikio vietoje. Modeliavimo metu prie visų skaičiuotų temperatūros verčių, poros spindulys keitėsi tiesine priklausomybe nuo srovės didumo. Prie visų temperatūrų, didžiausias poros spindulys apskaičiuotas esant $90,01 \mu\text{A}$.

Kai $T=20^\circ\text{C}$, tuomet poros spindulys keičiasi nuo $11,6 \text{ nm}$ iki 1100 nm , kai $T=30^\circ\text{C}$ didžiausias poros spindulys 1083 nm . Kylant temperatūrai poros spindulys mažėja, o pasiekus 60°C yra 1033 nm , kai $T=70^\circ\text{C}$ poros prasivėrimo spindulys 1018 nm . Taip pat reikia atsižvelgti, kad tokia aukšta temperatūra kai kuriom ląstelėm gali būti per aukšta gyvybinių funkcijų palaikymui, todėl šio modelio taikymas bei gauti rezultatai turi būti suprantami individualiai kiekvienai ląstelei. Modeliavimo rezultatai pateikti **2.18 pav.**



2.18 pav. Membranos poros spindulio priklausomybė nuo $iTRMB$, kai keičiasi terpės temperatūra. Kur $iTRMB$ – transmembraninė srovė, P_r – poros spindulys

Kadangi įvairių šaltinių duomenimis ląstelės ar jos organelių membranų storiai skiriasi, buvo atliktas poros spindulio priklausomybės tyrimas nuo membranos storio kai keičiasi terpės temperatūra. Buvo pasirinkti trys skirtingi membranos storiai: 5 nm , 6 nm ir 7 nm .



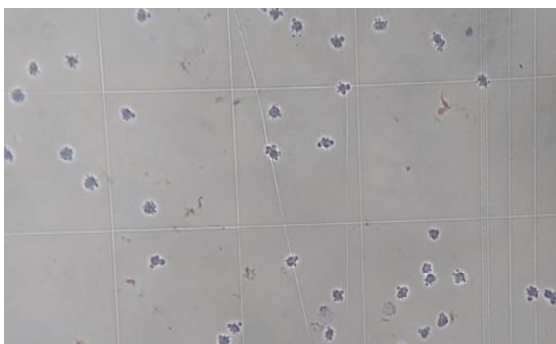
2.19 pav. Membranos poros spindulio priklausomybė nuo membranos storio ir temperatūros, kai transmembraninė srovė $90,01\text{ uA}$. Kur r_p – membranos storis, $iTRMB$ – transmembraninė srovė, P_r – poros spindulys

Atlikus modeliavimą pastebėta, kad didėjant temperatūrai poros spindulys mažėja, bet tuo mažesnis poros storis tuo poros spindulys mažesnis. Porų spindulio mažėjimą būtų galima paaiškinti suaktyvėjusia Na, K ir Cl jonų pasyviaja pernaša per membraną dėl pakilusios terpės temperatūros bei pakitusia membranos struktūra. Todėl galime darome prielaidą, kad per tą patį laiko tarpą pro prasivėrusią porą praeina daugiau jonų, o porai reikia mažiau prasiverti, kad praleistų tą patį jonų skaičių. Atliktas trijų skirtingų membranos storių palyginimas parodė, kad 7 nm membranoje keičiantis temperatūrai poros spindulys yra didesnis nei 6 nm ar 5 nm membranose. Taip pat pastebime, kad poros spindulio mažėjimo dėsningumas išlieka nepriklausomai nuo membranos storio.

3. MEDŽIAGOS IR METODAI

3.1 Ląstelės

Tyrimams naudotos Kinijos žiurkėno kiaušidžių (CHO) ląstelės (Prancūzija). Ląstelės augintos monosluoksniu 20 cm² talpos flakonėliuose (TPP, Šveicarija) su augimo terpės ((10 % FBS (fetalinio jaučio serumo, Sigma)), 1 % L-Glutamino tirpalo (Life technologies), 100 U/ml penicilino ir 100 µg streptomicino (Sigma). Ląstelių kultūra buvo auginama inkubatoriuje (NU-2500E, Nuair, JAV), palaikant +37°C temperatūrą bei 5 % CO₂. Ląstelės buvo įdėtos į petri lėkštelę ir įdėta kalceino - AM tiek, kad galutinė koncentracija būtų 0,1 µM. Po to ląstelės inkubuotos 1 val. inkubatoriuje. Gautų ląstelių vaizdas pro mikroskopą pavaizduotas **3.1 pav.**



3.1 pav. Tripano mėliu nudažytų CHO ląstelių vaizdas pro mikroskopą

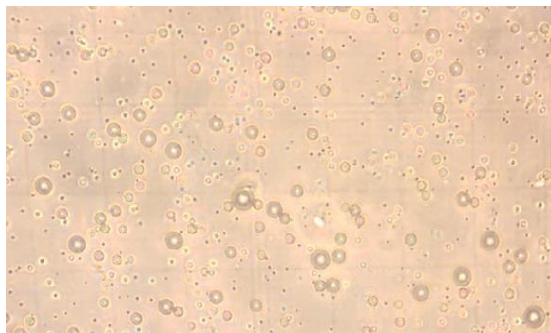
Ląstelių suspensijos paruošimui ląstelių monosluoksnis buvo tripsinuojamas tripsino/EDTA (Sigma) tirpalu. Ląstelių suspensija buvo centrifuguota apie 2 min. 1000 rpm ir suspenduota eksperimentinėje elektroporacijos terpėje. Visiems eksperimentams toliau buvo naudojama $3 \cdot 10^5$ ląstelių/ml koncentracija. Terpės laidumas 0,1 S/m.

3.2. Mikroburbulai

Mikroburbulų gamybai naudota 2mg/ml polietilenglikolio – 40 seratas (Sigma) ir 2mg/ml DL alfa-fosfatidilcholinas (Sigma), NaCl 0,9% izotoninis tirpalas bei heksafluorido 18 dujos. Po to 2mg polietilenglikolio – 40 serato ir 2mg DL alfa-fosfatidilcholino suberti į 1,5ml ependorfinį mėgintuvėlį (Reaktionsgefäße 3810×1,5ml). Vėliau milteliai užpilti 1ml NaCl izotoniniu tirpalu.

MB terpė 20s paveikta 200W stiprumo ultragarsu (Braun Sonic 1510) tam, kad išmaišyti sunkiai tirpstančius miltelius. Į MB terpę įleista 5ml heksafluorido dujų (Sigma). Įleidus dujų MB terpė iškart

paveikiama 30s trukmės 400W stiprumo ultragarsu (Braun Sonic 1510). Visa tai atlikus yra gaunami MB, kurie naudoti eksperimentų metu (žiūr. 3.2 pav.).



3.2 pav. Mikroburbulų vaizdas pro mikroskopą

3.3. Ultragarso poveikio aparatūra

Tyrime panaudojome ultragarso dažnio generatorių, terpėje sukuriantį 500 kPa pikinį neigiamą akustinį slėgį. Naudoto ultragarso keitiklio centrinis dažnis 1 MHz, skersmuo – 22 mm. Žadinimo įtampa buvo impulsinė, todėl terpėje sužadinama impulsinė ultragarso banga.

Tyrime naudotas 2s trukmės impulsas, kurio darbo ciklas 10 %.

3.4. Ultragarso generavimo sistema

UG generavimo sistema leidžia generuoti norimų parametrų UG ir realiu laiku stebėti tiek pro MB/ ląstelių terpę praėjusį signalą, tiek ir nuo MB atsispindėjusį UG signalą. Tokiu būdu galime stebėti MB spektrinius pokyčius realiaame laike bei juos susieti su sonoporacijos efektyvumu. Galime generuoti nuo 1 iki 10 MHz dažnio, 1.5 MPa PNP amplitudės, nuo 0 iki 100 % veikimo ciklo signalus, kurių bendras veikimo laikas gali būti nuo keleto μs iki keleto min. Sistemą taip pat sudaro UG generatorius bei skaitmeninis osciloskopas Picoscope; aukštadažnis signalo stiprintuvas; maitinimo įtampos šaltinis; 1MHz dažnio UG keitiklis; nešiojamas kompiuteris skirtas sistemos valdymui, o kabeliai reikalingi atskirų komponentų sujungimui.

Picoscope 5242B (Picotech, UK) UG generatorius gali generuoti UG signalus iki 20 MHz dažniu. Signalas siunčiamas iki 200 MS/s greičiu. Picoscope 5242B taip pat yra ir skaitmeninis osciloskopas, todėl tuo pat metu galima ir generuoti signalą, ir užrašyti gautą atsaką. UG signalą užrašyti galima iki 250 MS/s greičiu bei 8 bitų rezoliucija. Picoscope 5242B su kompiuteriu jungiamas per USB jungtis; su kitais sistemos komponentais - per BNC jungtis. Šio tyrimo atveju per terpę praėjęs bei nuo mikroburbulų atsispindėjęs signalas nebuvo registruojamas. Registracija nebuvo

atliekama dėl laiko trūkumo tarp eksperimentinių grupių, nes po poveikio buvo atliekamas impedanso matavimas, todėl dar vienas matavimas galėjo pakeisti citometrines analizės rezultatus.

Tyrimė buvo naudojamas aukštadažnis signalo stiprintuvas, kuris yra pagamintas Kauno Technologijos Universiteto signalų apdorojimo katedroje. Jis gali signalą sustiprinti nuo 0.5 MHz iki 10 MHz dažnių juostoje; galima impulsų amplitudė: nuo 0 iki 500 V . Stiprinamo signalo paketų ilgis gali būti nuo 1 periodo iki 100 periodų, išėjimo galingumas yra iki 5 W . Stiprintuvas yra sujungtas su maitinimo šaltiniu (MCP lab electronics, Shanghai, Kinija).

Taip pat buvo naudojamas kompiuteris, kuris buvo reikalingas ultragarsinės sistemos valdymui bei generuojamų impulsų parametrų nustatymui.

Eksperimentams buvo naudota vonelė, kuri yra 20 cm ilgio, 10 cm pločio bei 5 cm aukščio. Vonelės centre yra kiuvetė, kurioje vykdomi eksperimentai su ląstelėmis bei mikroburbulais. Į vonelę galima sandariai įtvirtinti ultragarso keitiklius. Keitiklius galima keisti, į tą pačią angą įtvirtinant skirtingo dažnio keitiklius. Kiuvetės poziciją keitiklių atžvilgiu taip pat galima keisti.

3.5. Elektroporatorius

Eksperimento metu buvo naudotas KTU (Kauno Technologijos universitetas) elektros ir elektronikos fakultete sukurtas elektroporacijos prietaisas (**3.3 pav.**). Prietaiso veikimo principas pagrįstas modeliuotos įtampos impulsų generavimu bei jų perdavimu dviem elektrodais. Tarpas tarp elektrodų buvo nustatytas 8 mm , o parinktas atsižvelgiant į kiuvetės dydį.



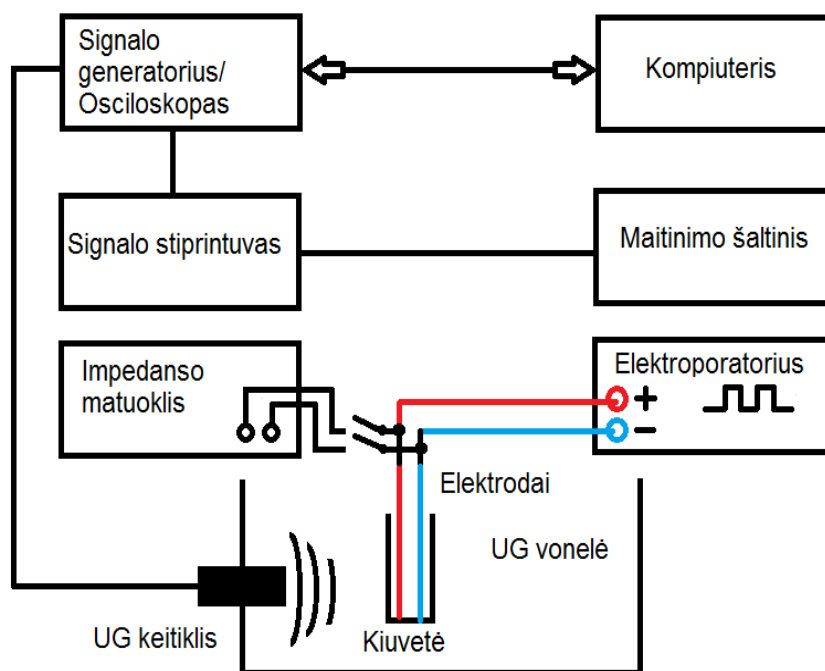
3.3 pav. Elektroporatorius

Pagrindiniai elektroporatoriaus parametrai: aukštos amplitudės impulsai iki 1500 V , srovė impulso metu gali siekti 50 A , impulso trukmės nuo $1\text{ }\mu\text{s}$ iki $0,5\text{ s}$, trumpo impulso frontų trukmės nano sekundžių eilės. Prietaisas turi du veikimo režimus – HV (angl. High voltage) ir LV (angl. Low voltage). HV veikimo stadijos metu formuojami aukštos įtampos, mikro sekundžių eilės stačiakampiai elektriniai impulsai. Šio tyrimo metu buvo naudojamas teigiamo poliarumo stačiakampių impulsų formavimo režimas, o norint užtikrinti eksperimento sąlygose nustatytą elektrinio lauko stiprumą, impulso amplitudė parinkta 800 V . Impulsų trukmė $100\text{ }\mu\text{s}$, darbo režimas

50 %. LV veikimo stadijoje prietaisai formuoja žemos amplitudės, mili sekundžių eilės stačiakampius elektrinius impulsus. Žemos įtampos veikimo stadijoje, prietaisai gali formuoti tiek teigiamus tiek neigiamus stačiakampius impulsus.

3.6. Tyrimo atlikimo eiga

Eksperimentas suskirstytas į tris grupes (elektroporacija, sonoporacija ir elektrosonoporacija) ir kontrolinis bandymas. Tyrimui buvo panaudota CHO ląstelių suspensija. Prieš ir po kiekvieno eksperimentinės grupės bandymo, impedanso matuokliu (Wayne Kerr 6500B) buvo išmatuojamas suspensijos impedansas, tokių būdu pamatuojant terpės laidumo pokyčius.



3.4 pav. Tyrimo struktūrinė schema

Po elektroporacijos ir elektrosonoporacijos, osciloskopu (Rigol DS2072A, 70 MHz, 2GSa/s) buvo atlikti siunčiamų impulsų amplitudės ir tarp elektrodų pratekėjusios impulsinės srovės matavimai. Tyrimo metu buvo atlikta mėgintuvėlyje patalpintų CHO ląstelių suspensijos kontrolė, dėl žuvusių ląstelių skaičiaus nustatymo. Eksperimento metu kiuvetė su ląstelių suspensija patalpinta ultragarsinėje vonelėje tarp elektrodų. Kiekvienai eksperimentinei grupei atlikta po vieną pakartojimą. Toks pakartojimų skaičius pasirinktas dėl brangių eksperimento medžiagų. Elektroporuojamos, sonoporuojamos ir elektrosonoporuojamos terpės kiekis buvo 1 ml, o pipetavimo metu gautos paklaidos nebuvo vertinamos, nes jų įtaka citometrijos analizės rezultatams nevertinama.

Kad skyrėsi suspensijos kiekis (nebuvo lygus 1 ml) buvo pastebėta impedanso matavimo tyrimuose (**4.2. skyrius**). Elektroporacijos metu plastikinė kiuvetė su ląstelių suspensija buvo veikama stačiakampiais elektriniais impulsais ($2 \times HV$, $100 \mu s$, $1000 V/cm$, darbo ciklas 50%), sonoporacijos metu impulsine ultragarso banga ($1MHz$, $500 kPa$, darbo ciklas 10%), o taikant abu metodus vienu metu ($1s.$, $1MHz$, $500 kPa$, darbo ciklas 10% + $2 \times HV$, $100 \mu s$, $1000 V/cm$ + $1s.$, $1MHz$, $500 kPa$, darbo ciklas 10%) buvo atlikta elektrosonoporacija.

Elektroporacija:

- ❖ CHO ląstelės (1 ml) + elektroporacijos terpė + elektroporacija ($2 \times HV$, $100 \mu s$, $1000 V/cm$);

Sonoporacija:

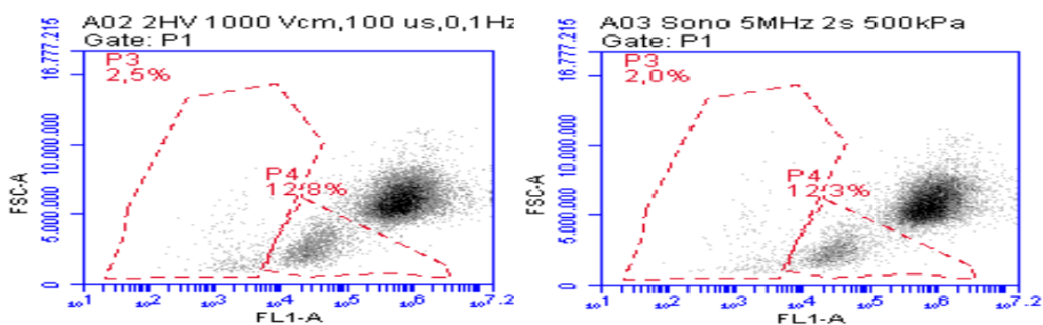
- ❖ CHO ląstelės (1 ml) + elektroporacijos terpė + sonoporacija ($1MHz$, $500 kPa$, 2 s., darbo ciklas 10%);

Elektrosonoporacija:

- ❖ CHO ląstelės (1 ml) + elektroporacijos terpė + sonoporacija (1s., $1MHz$, $500 kPa$, darbo ciklas 10%) + elektroporacija ($2 \times HV$, $100 \mu s$, $1000 V/cm$) + sonoporacija (1s., $1MHz$, $500 kPa$, darbo ciklas 10%).

3.7. Kalceino išnašos nustatymas

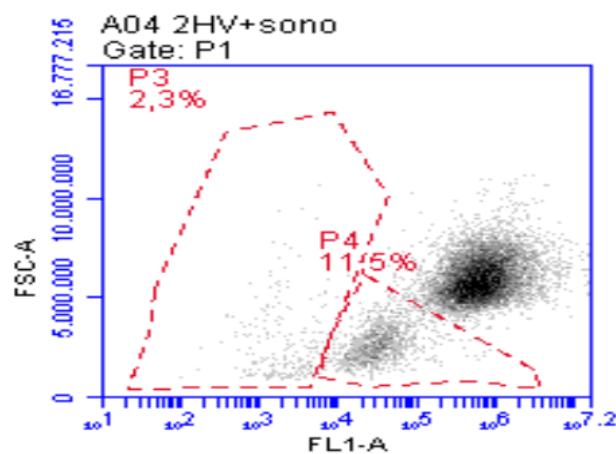
Kalceino išnašos efektyvumas matuojamas tėkmės citometrijos metodu. Prieš naudojimą tėkmės citometras 10 minučių skalaujamas distiliuotu vandeniu, naudojant „greitą“ skysčių pateikimo režimą ($66 \mu l/min$). Jei aptinkamos daugiau nei 5 dalelės, per sekundę praeinančios pro detektorių, skalaujama papildomai. Praplovus paeiliui matuojami ląstelių pavyzdžiai, naudojant greitą skysčių pateikimo režimą. Pirmame kontroliniame mėginyje ląstelės atskiriamos nuo kitų terpėje esančių dalelių, naudojant apribojimo (angl. gate) funkciją.



3.5 pav. CHO ląstelių citometrinės analizės duomenys. A – po elektroporacijos, B – po sonoporacijos

Prietaisas skirtingos šviesos spektro ir skirtingais kampais šviečiančių lazerių pagalba suskaičiuoja skirtingos fluorescencijos objektus į populiacijas ir surinktus duomenis pateikia grafiškai. Kalceinu – AM inkubuotos ląstelės šviesiniu mikroskopu neišsiskiria nuo kontrolinių ląstelių. Kalceinas – AM ląstelėse hidrolizuojamas ir tampa kalceinu, kuris fluorescuoja, sužadinus 488 nm bangos ilgio šviesa. Gautus duomenis galima kopijuoti ir apdoroti pasirinkta programine įranga. Citometro programinės įrangos lange pasirenkamas grafikas, vaizduojantis tiesioginės sklaidos (angl. forward scatter, FSC) – x logaritminėje ašyje ir šoninės sklaidos (angl. side scatter, SSC) – y logaritminėje ašyje. Duomenys parenkami iš kanalo FL-1A, matuojančio fluorescenciją regione 540-585 nm. Tokiame grafike ląstelės atsiskiria kaip populiacija (**3.5 pav.**, **3.6 pav.**). Procentinis suskirstymas parodo kiek vieno fluorescencinio intensyvumo objektų aptikta. P4 populiacija žymi žuvusių ląstelių procentinę dalį, o P3 populiacija neatpažintų objektų.

Kiekviename mėginyje išmatuojama po 10000 ląstelių, o toks kiekis paimamas tam, kad užtikrinti duomenų teisingumą. Citometro duomenys apdorojami, naudojantis citometro programine įranga (BD Accuri C6 software).



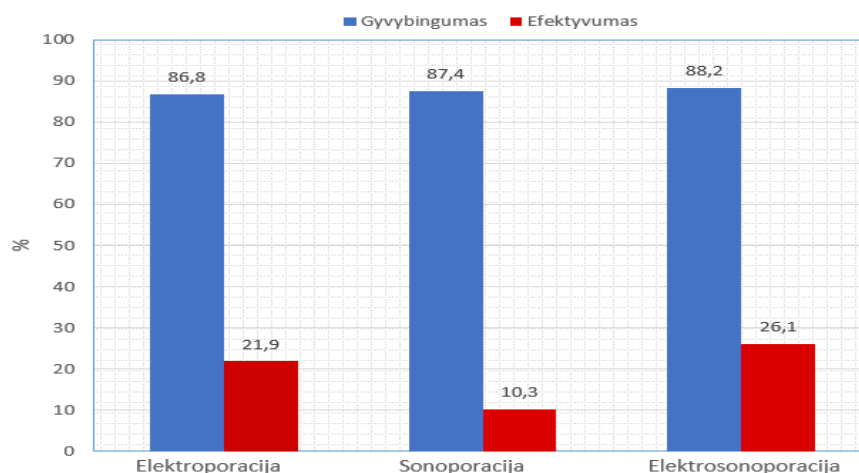
3.6 pav. CHO ląstelių citometrines analizės duomenys po elektrosonoporacijos

Liuciferazės ekspresija vertinama pagal liuciferino – liuciferazės reakcijos išskiriamos liuminescencijos intensyvumą. Reakcijos išskiriama liuminescencija matuojama keturis kartus mikroplokštelių skaitytuvu (GENios Pro, Tecan Group Ltd., Männedorf, Šveicarija, kat. nr. P97084), nustačius liuminescencijos matavimo režimą. Matavimai atliekami ne daugiau kaip po penkių minučių nuo reakcijos pradžios.

4. ELEKTROSONOPORACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI

4.1. Kalceino išnašos rezultatai

Atlikus paveiktos ląstelių suspensijos kalceino išnašos rezultatų citometrinę analizę po elektroporacijos, sonoporacijos ir elektrosonoporacijos pastebėtas skirtingas ląstelių gyvybingumas ir išnašos efektyvumas. Ląstelės inkubuojamos kalceinu – AM, kuris nešvyti, tačiau ląstelėse kacleinas – AM hidrolizuojamas ir gaunamas kalceinas. Todėl matuojama kalceino, o ne kalceino – AM išnaša. Po elektroporacijos ląstelių gyvybingumas buvo mažiausias, bet išnašos efektyvumas buvo didesnis nei sonoporacijos, bet mažesnis už elektrosonoporacijos. Sonoporacijos kalceino išnašos efektyvumas buvo mažiausias, o gyvybingumas didesnis nei po elektroporacijos, bet mažesnis už elektrosonoporacijos. Po elektrosonoporacijos CHO ląstelių gyvybingumas ir išnašos efektyvumas buvo didžiausi. Gauti rezultatai pateikti **4.1 pav.**



4.1 pav. Ląstelių gyvybingumo ir kalceino išnašos efektyvumo rezultatai po elektroporacijos, sonoporacijos ir elektrosonoporacijos

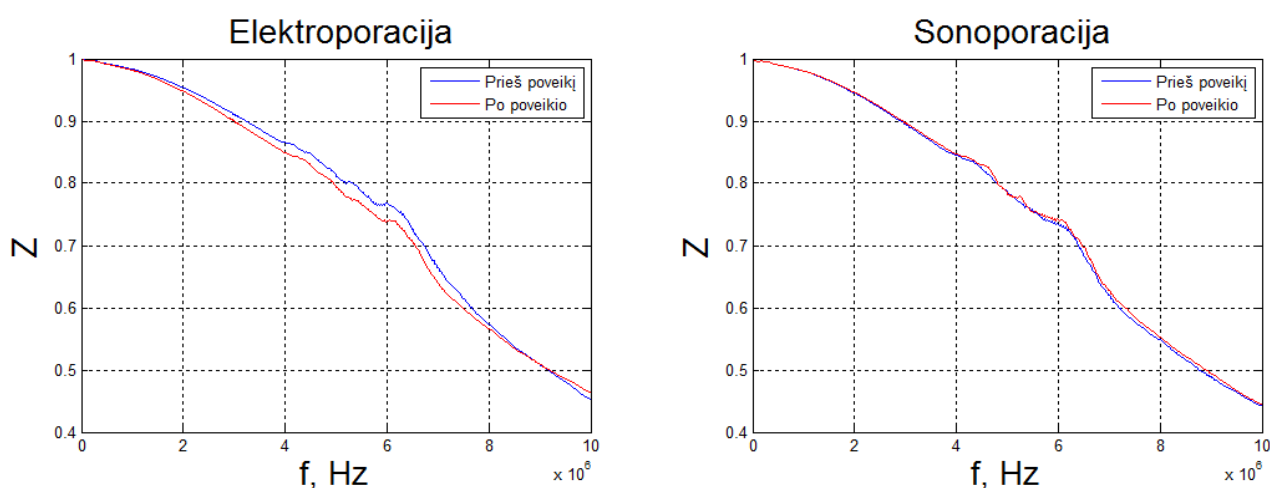
Apdorojant gautus išnašos duomenis buvo padaryta kontrolinė tyrimo mėgintuvėlyje buvusių ląstelių gyvybingumo citometrinė analizė. Pastebėta, kad žuvusių ląstelių skaičius populiacijoje sudarė 5,5 %. O toks natūralus ląstelių mirtingumas leidžia tikėti gautų rezultatų patikimumu, bet daryti toli siekiančių išvadų negalima, nes buvo atlikta tik po vieną visų trijų tyrimo grupių pakartojimą. Pakartojimų skaičių apribojo brangios tyrimų medžiagos bei laboratorinės įrangos užimtumas ir sudėtingas aptarnavimo procesas.

Apibendrinus kalceino išnašos rezultatus galima teigti, kad elektrosonoporacija yra perspektyvi molekulių pernašos per ląstelės membraną tyrimų kryptis.

4.2. Impedanso matavimo rezultatai

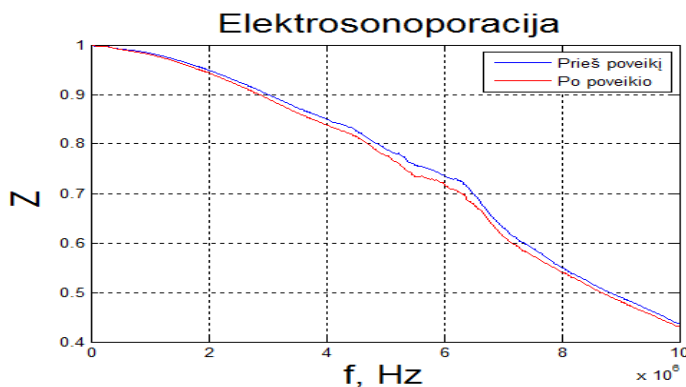
Norint geriau išsiaiškinti suspensijos elektrinių parametų kitimą, buvo atlikti impedanso matavimai prieš ir po elektroporacijos, sonoporacijos ir elektrosonoporacijos. Impedanso pokytis buvo stebimas nuo 20Ω iki $1 k\Omega$, dažnių juostos plotyje nuo 0 Hz iki 10 MHz . Tuo pačiu metu buvo matuojamas terpės talpumas. Vėliau gauti duomenys pasinaudojus Matlab programiniu paketu buvo sunormuoti ir apdoroti pasinaudojus slenkančiojo vidurkio filtru. Kad geriau suprasti gautus rezultatus duomenys išvesti grafiniuose languose palyginimui.

Terpės impedansas pasikeičia tuomet, kai pravėrus ląstelių poras įvyksta kalceino dažo išnaša iš ląstelės į suspensiją, tuomet padidėja terpės laidumas. Gauti rezultatai parodė, kad po elektroporacijos didėjant signalo dažniui terpės impedansas sumažėja. Po sonoporacijos pastebimi tik labai nežymūs suspensijos impedanso pokyčiai. Tyrimo metu buvo siekiama rasti optimalius elektrosonoporacijos parametrus, todėl šiuo atveju parinkti elektroporacijos ir sonoporacijos parametrai nebuvo optimizuojami, bet parenkami tokie kurie atrodė labiausiai tinkantys pasiekti geriausią elektrosonoporacijos efektyvumą. Toks parametų parinkimas turėjo įtaką elektroporacijos ir sonoporacijos procesų impedanso pokyčiui. Taikant stipresnius ir ilgesnius elektrinius impulsus terpės impedanso pokyčiai būtų didesni. Taip pat sonoporacijos metu impulsinį režimą pakeitus stovinčia UG banga ir parinkus didesnę keitiklio žadinimo įtampą tikėtinas analogiškas impedanso pokytis ir po sonoporacijos.



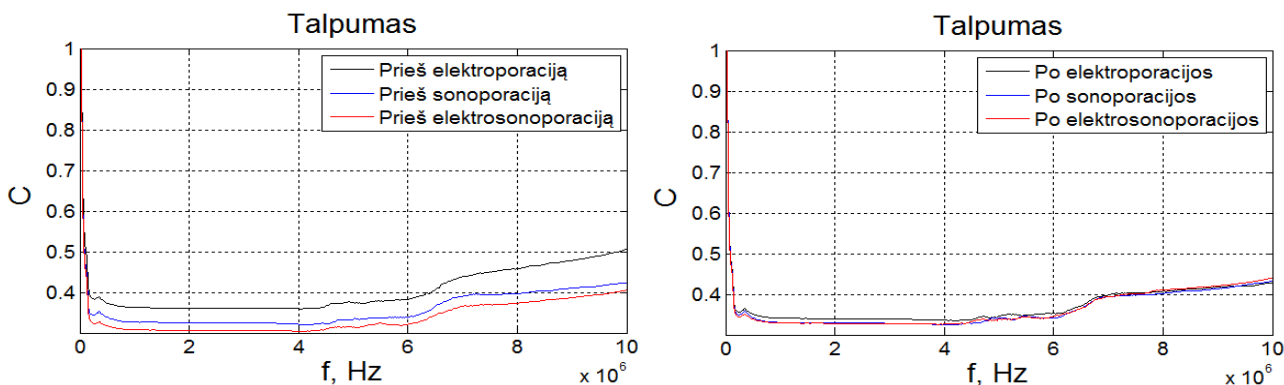
4.2 pav. Išmatuotas ir sunormuotas ląstelių suspensijos impedansas po elektroporacijos ir sonoporacijos

Po elektrosonoporacijos impedanso pokytis toje pačioje dažnių juostoje kaip ir elektroporacijos ir sonoporacijos atvejais buvo didesnis nei po sonoporacijos, tačiau nedaug skyrėsi nuo po elektroporacijos išmatuoto. Elektroporacijos atveju signalo dažniui artėjant prie 10 MHz impedansas padidėjo lyginant su prieš poveikį buvusiu, o elektrosonoporacijos atveju išlieka stabiliai mažesnis visoje matuotoje dažnių juostoje (žiūr. 4.3 pav.). Visų tyrimo grupių atveju ties 6 MHz dažnių juostos riba pastebimas impedanso šuolis. Toks ryškus reikšmių diapazono pakitimas galimas dėl terpėje įvykusio rezonanso.



4.3 pav. Išmatuotas ir sunormuotas ląstelių suspensijos impedansas po elektrosonoporacijos

Taip pat ištyrus talpumų įtaką impedanso pokyčiui buvo pastebėta, kad po elektroporacijos terpės talpumas sumažėjo, po sonoporacijos beveik nepasikeitė, o po elektrosonoporacijos terpės talpumas padidėjo.



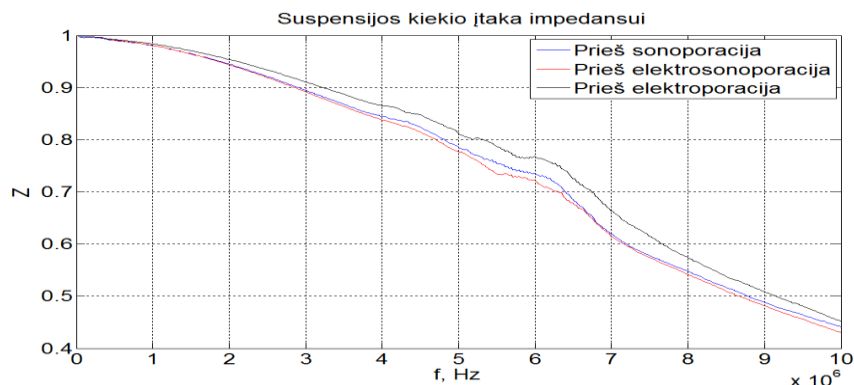
4.4 pav. Išmatuotų terpės talpumų palyginimas

Reikia atsižvelgti į tai jog išmatuoti talpumas buvo pF eilės, o išmatuotas impedansas buvo matuojamas šimtais omų, todėl talpumo pokyčiai šiuo atveju didelės įtakos išmatuotiems impedansų pokyčiams neturėjo.

Kiekvieno eksperimento pakartojimo metu, į kiuvetę naudojant pipetę buvo įlašinamas 1 ml suspensijos, o po kiekvieno poveikio ir atliktų matavimų kiuvetė išplaunama. Po išplovimo kiuvetės dugne buvo pastebimi vandens lašeliai kurių visiškai nusausti nepavyko. Likę vandens lašeliai ir

pipetės sudaroma paklaida galėjo lemti terpės kiekio pokytį bei koncentraciją, o tai įrodo išmatuoto terpės impedanso pokyčių sulyginimas parodytas **4.5 pav.**

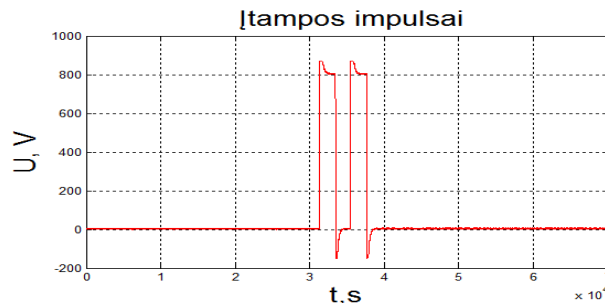
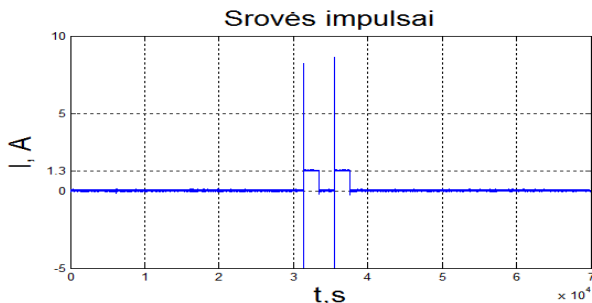
Prieš elektroporaciją išmatuotas impedansas buvo didžiausias, o prieš sonoporacijos ir elektrosonoporacijos poveikius impedansas visoje matuotoja dažnių juostoje buvo panašus. Suspensijos kiekio įtakos impedanso didumui palyginimas parodė, kad elektroporacijos atveju paveiktas terpės kiekis buvo didžiausias, o sonoporacijos ir elektrosonoporacijos atveju skyrėsi nežymiai. Todėl vertinant impedanso matavimo rezultatus galima į tai atsižvelgti.



4.5 pav. Suspensijos kiekio įtaka impedanso didumui

4.3. Įtampos ir srovės matavimas

Matuojant srovę buvo atsižvelgta jog srovės daliklio varža $0,15 \Omega$. Todėl remiantis omo dėsnio osciloskopu išmatuotos srovės kanalo reikšmės buvo padalintos iš $0,15$. Pastebimi srovės pikai gaunami dėl grandinės elementų parazitinių talpumų ir dėl impulsų registravimo metu buvusių įrangos triukšmų (kabelių jungtys, elektrodai). Įtampos impulsų užlinkimai gaunami dėl nepakankamos apkrovos varžos (varža tarp elektrodų). Išmatuota srovės amplitudė impulso metu buvo $1,3 \text{ A}$, o įtampos amplitudė 800 V .



4.6 pav. Išmatuoti elektroporacijos ir elektrosonoporacijos srovės ir įtampos impulsai

Įtampos matavimo metu buvo atsižvelgta, kad varžinis daliklis sumažina osciloskopu išmatuotą reikšmę 10 kartų, todėl išmatuotos reikšmės padaugintos iš 10 .

5. IŠVADOS

5.1. Tyrimą apibendrinančios išvados

1. Atlikus mokslinės literatūros analizę pastebėta, kad elektroporaciją taikant kartu su sonoporacija, tam tikromis sąlygomis galima padidinti molekulių pernašą į ląsteles ir audinius.
2. Modeliavimo metu atlikta pasirinktų ląstelių dydžių indukuotojo potencialo priklausomybė nuo impulso trukmės parodė, kad impulso trukmės įtaka transmembraninio potencialo didumui priklauso nuo membranų užsikrovimo konstantų τ_{cell} ir τ_{nuc} . Kuo konstantų užsikrovimo trukmė didesnė, tuo elektroporacijos metu naudojamo stačiakampio impulso trukmė gali būti didesnė.
3. Indukuotojo TRMBP modeliavimo metu pastebėta, kad kuo didesnis ląstelės skerspjūvis tuo ląstelės indukuotasis potencialas didesnis. Taip pat didesnis ląstelės skerspjūvio plotas leidžia membranai indukuoti didesnę potencialą nei mažesnio skerspjūvio ląstelei, naudojant tokį patį elektrinio lauko stiprumą.
4. Modeliavimo metu ištirta, kad TRMBP didumui elektrinio lauko stiprumas daro tiesioginę įtaką. Kuo didesnis stačiakampio elektrinio impulso sukuriamas elektrinio lauko stiprumas, tuo ląstelės arba ląstelės organelės membranoje indukuojasi didesnis transmembraninis potencialas.
5. Atlikus ląstelių ir ląstelių organelių fazinės ir dažninės charakteristikų analizės pastebėta, kad norint pasiekti geresnius pernašos rezultatus, organelių membranoms geriau taikyti trumpesnius (ns eilės) impulsus, nes jų membranų reakcija į elektrinį impulsą yra greitesnė, o išorinėms (ląstelių) membranoms geriau tinka ilgesni (ms eilės) elektriniai impulsai.
6. Modeliavimo metu ištyrus terpės temperatūros įtaka sonoporų dydžiui, pastebėta, kad didėjant terpės temperatūrai sonoporų spindulys mažėja. Taip pat pastebėta, kad porų spindulio dydis priklauso ir nuo membranos storio.
7. Atlikus eksperimentinį kalceino išnašos iš CHO ląstelių tyrimą pastebėta, kad ląstelių gyvybingumas ir išnašos efektyvumas po poveikio buvo didžiausias taikant elektrosonoporaciją nei elektroporaciją ar sonoporaciją atskirai.
8. Atlikti impedanso matavimai parodė, kad impedanso didumas tiesiogiai priklauso nuo suspensijos kiekio, bei nuo poveikio pobūdžio. Labiausiai terpės impedansas pasikeitė po elektroporacijos ir elektrosonoporacijos, o po sonoporacijos pasikeitimai buvo nežymūs.

9. Atlikus terpės talpumų matavimus, pastebėta, kad po elektroporacijos suspensijos talpumas sumažėjo, po sonoporacijos nepasikeitė, o po elektrosonoporacijos padidėjo. Nuspręsta, kad dėl labai mažų talpumų verčių, jų įtakos impedansui galima nevertinti.

5.2. Galimos tolimesnių tyrimų kryptys

1. Terpės temperatūros pokyčio matavimas prieš ir po elektroporaciją, sonoporaciją ir elektrosonoporaciją. Temperatūros įtakos suspensijos laidumui nustatymas.
2. Molekulių įnašos į ląstelę efektyvumo tyrimas po elektrosonoporacijos poveikio bei elektrosonoporacijos metodo parametrų optimizavimas.
3. Dozavimo paklaidų įtakos elektrosonoporacijos proceso efektyvumui bei terpės laidumui tyrimai.
4. Elektrosonoporacijos poveikio efektyvumo palyginimas skirtingų rūšių ląstelėms.
5. Chemoterapinių vaistų pernaša į ląstelę, naudojant elektrosonoporacijos metodą.
6. Induktyvumo įtakos terpės impedansui tyrimai.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Kirvelis D. Biofizika. Vadovėlis. Vilniaus universiteto leidykla, Vilnius, 2007 m.
2. Kopustinskas A.; Kopustinskiene G. Biofizika. Mokomoji knyga. Leidykla „Technologija“, Kaunas, 2009 m.
3. Bernhardt, J.; Pauly, H. On the generation of potential differences across the membranes of ellipsoidal cells in an alternating electrical field. *Biophysik*. 1973, vol 10, iss. 1, p. 89 - 98.
4. Jaroszeski, M. J.; Heller, R.; Gilbert, R. Electrochemotherapy, Electrogenotherapy, and Transdermal Drug Delivery. New Jersey: Humana Press, 2000.
5. Mir, L. M.; Tounekti, O.; Orłowski, S. Bleomycin: revival of an old drug. *General Pharmacology: The Vascular System*. July.1996, vol. 27, iss. 5, p. 745 – 748.
6. Sukharev, S. I.; Klenchin, V. A.; Serov, S. M.; Chernomordik, L. V.; Chizmadzhev, YuA. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. Nov. 1992. *Biophys J*. vol. 63, iss 5, p.1320-1327.
7. Kotnik, T.; Resting and Induced Transmembrane Voltage. Electroporation – Based Technologies and Treatments. International Scientific Workshop and Postgraduate Course. Ljubljana, Slovenia. Nov. 2013, p. 7 – 12 .
8. Schwan, H.P. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Advances in biological and medical physics*. Feb.1957, vol. 5, p. 147 – 209.
9. Pauly, H.; Schwan, H. P. Über die Impedanz Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale. Impedanz einer suspension von kugelförmigen teilchen. 1959, vol.14, p. 125 – 131.
10. Teissie, J. In Vitro Cell Electroporation. Electroporation – Based Technologies and Treatments. International Scientific Workshop and Postgraduate Course. Ljubljana, Slovenia. Nov. 2013, p. 33 – 36 .
11. Tsong, T. Y. Electroporation of cell membranes. *Biophys J*. 1991, vol. 60, iss. 2, p. 297 – 306.
12. Teissie, J.; Rols, M. P. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation. *Biophys J*. July. 1993, vol. 65, iss. 1, p. 409 – 413.
13. Saulis, G.; Venslauskas, M. S. Cell electroporation. Part 2. Experimental measurements of the kinetics of pore formation in human erythrocytes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. Dec. 1993, vol. 32, iss. 3, p. 237- 248.
14. Kotnik, T.; Kramar, P.; Pucihar, G.; Miklavic, D. Cell Membrane Electroporation – Part 1: The Phenomenon. *IEEE Electrical Insulation Magazine*. September/October. 2012, vol. 28, iss. 5, p. 14 – 23.
15. Cole, K. S. Membranes, Ions and Impulses. Berkeley: University of California Press, 1972.
16. Newman, E.; Toensing, K.; Kakorin, S. Mechanism of electroporative dye uptake by mouse B cells. *Biophysical J*. January.1998, vol. 74, iss. 1, p. 98 – 108.
17. Tarek, M. Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. *Biophysical J*. June. 2005. vol.88, iss. 6, p. 4045 –4053.

18. Kinoshita, K. Jr.; Tsong, T. Y. Voltage – induced conductance in human erythrocyte membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. July. 1979, vol. 554, iss.2, p. 479 – 497.
19. Sixou, S.; Teissie, J. Specific electroporation of leucocytes in blood sample and application to large volumes of cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. April.1990, vol. 1028, iss. 2, p. 154 – 160.
20. Weaver, J. C.; Smith, K.C.; Esser, A. T.; Son, R. S.; Gowrishankar, T. A brief overview of electroporation pulse strength – duration space: a region where additional intracellular effects are expected. *Bioelectrochemistry*. October. 2012, vol. 87, p. 236 – 243.
21. Šatkauskas, S.; Ruzgys, P.; Venclauskas, M. S. Towards the mechanisms for efficient gene transfer into cells and tissues by means of cell electroporation. *Expert Opinion on Biology Therapy*. March. 2012, vol. 12, no. 3, p. 275 – 286.
22. Barnett, A.; Weaver, J. C. Electroporation: a unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and mechanical rupture in artificial planar bilayer membranes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacing Electrochemistry*. April. 1991, vol. 320, iss. 2, p. 163–182.
23. Wang, H.; Longsine – Parker, W.; Koo, C.; Kim, J.; Kim, B. J.; Jayaraman, A.; Han, A. Microfluidic electro – sonoporation by simultaneous application of electric field and acoustic field. 17 th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. Freiburg. October.2013, p. 1332 – 1334.
24. Rubinsky, B. Irreversible electroporation in medicine. *Technology in Cancer Research and Treatment*. August. 2007, vol. 6, no. 4, p. 255 – 260.
25. Miklavčič, D.; Haberl, S.; Serša, G.; Frey, W.; Rubinsky, B. Cell Membrane Electroporation – Part 2: The Applications. *IEE Electrical Insulation Magazine*. January/February. 2013, vol. 29, no. 1, p. 29 – 37.
26. Edd, J. F.; Horowitz, L.; Davalos, R. V.; Mir, L. M.; Rubinsky, B. In vivo results of new focal tissue ablation technique: Irreversible electroporation. *IEEE Transactions on biomedical engineering*. June. 2006, vol. 53, no. 7, p. 1409 – 1415.
27. Onik, G.; Mikus, P.; Rubinsky, B. Irreversible electroporation: Implications for prostate ablation. *Technology in Cancer Research and Treatment*. August. 2007, vol. 6, no. 4, p. 295 – 300.
28. Weaver, J.; Chizmadzhev, Yu. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. December. 1996, vol. 41, iss. 2, p. 135 – 160.
29. Zeghimi, A.; Escoffre, J. M.; Bouakaz, A. Ultrastructural sonoporation bio-effects: Comparative study on two human cancer cell lines. *Ultrasonics Symposium (IUS), 2013 IEEE International*. Prague. July. 2013, p. 61 – 64.
30. Kudo, N.; Tanaka, Y.; Uchida, K. Basic studies on sonoporation with size- and position-controlled microbubbles adjacent to cells. *Ultrasonics Symposium (IUS), 2013 IEEE International*. Prague. July. 2013, p. 53 – 56.
31. Tanaka, Y.; Kudo, N. Relation between cell membrane tension and repair of membrane damaged during sonoporation. *Ultrasonics Symposium (IUS), 2013 IEEE International*. Prague. July. 2013, p. 1777 – 1780.

32. Mullin, L.; Han, J.; Jay, M.; Dayton, P. A. Ultrasound and microbubble parameter optimization for maximizing sonoporation. *Ultrasonics Symposium (IUS), 2011 IEEE International*. Orlando, FL. October. 2011, p. 1478 – 1481.
33. Ferrara, K.; Pollard, R.; Borden, M. Ultrasound microbubble contrast agents: fundamentals and application to gene and drug delivery. *Annual review of Biomedical Engineering*. August. 2007, vol.9, p. 415 – 447.
34. Ferrara, K.; Borden, M. A.; Zhang, H. Lipid – shelled vehicles: engineering for ultrasound molecular imaging and drug delivery. *Accounts of chemical research*. July. 2009, vol. 42, p. 881 – 892.
35. Philips, L.; Klibanov, A. L.; Wamhoff, B. R.; Hossack, J. A. Ultrasound – Microbubble – Mediated Drug Delivery Efficacy and Cell Viability Depend on Microbubble Radius and Ultrasound Frequency. *2010 IEEE International Ultrasonics Symposium Proceedings*. San Diego, CA. October. 2010, p. 1775 – 1778.
36. Lepetit-Coiffé, M.; Yudina, A.; Poujol, C.; Oliveira, P.; Couillaud, F.; Moonen, C. Quantitative Evaluation of Ultrasound-Mediated Cellular Uptake of a Fluorescent Model Drug. *Molecular imaging and biology*. October. 2013, vol.15, iss.5, p. 523-533.
37. Huber, P.E.; Pfisterer, P. In vitro and in vivo transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327 – AT1 is enhanced by focused ultrasound. *Gene Therapy*. September. 2000, vol. 7, no.17, p. 1516 – 1525.
38. Rahim, A.; Taylor, S.L.; Bush, N. L.; ter Haar G. R.; Bamber, J. C.; Porter C. D. et. all. Physical parameters affecting ultrasound/ microbubble – mediated gene delivery efficiency in vitro. *Ultrasound in medicine and Biology*. August. 2006, vol. 32, iss. 8, p.1269 – 1279.
39. Šatkauskas, S.; Čepurnienė, K.; Šatkauskienė, I.; Jurkonis, R. Ultragarso poveikio CHO ląstelių membranų pralaidumui tyrimas in vitro. Biomedicininė inžinerija (Biomedical engineering : tarptautinės konferencijos pranešimų medžiaga), 2008 m. spalio 23-24 d., Kaunas / Kauno technologijos universitetas. Kaunas : Technologija, 2008.
40. Walpole, R. E.; Mayers, R. H.; Mayers, S. L.; Ye, K. Probability and Statistics for Engineers and Scientists, 8th ed. Upper Saddle River, NJ:Pearson Prentice Hall, 2007.
41. Zhou, Y.; Kumon, R.E.; Deng, C.X.; Jianmin, C. The size of sonoporation pores on the cell membrane. *Ultrasound in medicine and biology*. October. 2009, vol. 35, iss. 10, p. 1756 – 1760.
42. Forbes, M. M.; O’Brien, W. D. 6A - 1 The Role of Inertial Cavitation of Ultrasound Contrast Agents in Producing Sonoporation. *In Proceedings of the 2007 IEEE Ultrasonics Symposium*. New York, NY. October. 2007, p. 424 – 427.
43. Hallow, D. M.; Mahajan, A. D.; McCutchen, T. E.; Prausnitz, M. R. Measurement and Correlation of Acoustic Cavitation with Cellular Bioeffects. *Ultrasound and Medicine Biology*. July. 2006, vol. 32 p. 1111 – 1122.
44. Costa, P. F.; Emilio, M. G.; Fernandes, P. L.; Ferreira, H. G. Determination of ionic permeability coefficients of the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes under voltage clamp. *Physiology J*. June. 1989, vol. 413, p.199 – 211.
45. DeBruin K. A.; Krassowska, W. Modeling electroporation in a single cell I. Effects Of field strength and rest potential. *Biophysical J*. September. 1999, vol.77, iss. 3, p. 1213-1224.
46. Cussler, E. L. Diffusion: Mass transfer in fluid systems. New York, NY: Cambridge University Press, 1997.

47. Miller, D. L., Quddus, J. Sonoporation of monolayer cells by diagnostic ultrasound activation of contrast-agent gas bodies. *Ultrasound and Medicine Biology*. May. 2000, vol. 26, iss. 4, p. 661–667.
48. Wu, J. Theoretical study on shear stress generated by microstreaming surrounding contrast agents attached to living cells. *Ultrasound and Medicine Biology*. January. 2002, vol. 28, p. 125–129.
49. Guzman, H. R.; McNamara, A. J.; Nguyen, D. X.; Prausnitz, M. R. Bioeffects caused by changes in acoustic cavitation bubble density and cell concentration: a unified explanation based on cell – to – bubble ratio and blast radius. *Ultrasound and Medicine Biology*. August. 2003, vol. 29, iss. 8, p. 1211 – 1222.
50. Apfel, R. E.; Holland, C. K. Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound. *Ultrasound and Medicine Biology*. April. 1991, vol.17, iss. 2, p.179–185.
51. Miller, D. L, Gies, R. A.; Chrisler, W. B. Ultrasonically induced hemolysis at high cell and gas body concentrations in a thin-disc exposure chamber. *Ultrasound and Medicine Biology*. December. 1997, vol.23, iss. 4, p. 625–633.
52. Greenleaf, W. J.; Bolander, M. E.; Sarkar, G.; Goldring, M.B.; Greenleaf, J. F. Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound and Medicine Biology*. May.1998, vol. 24, iss.4, p. 587–595.
53. Poliachik, S.L.; Chandler, W.L.; Mourad, P.D. et al. Effect of high-intensity focused ultrasound on whole blood with and without microbubblecontrast agent. *Ultrasound and Medicine Biology*. July. 1999, vol. 25, iss. 6, p. 991–998.
54. Qiu, Y.; Zhang, C.; Tu, J.; Zhang, D. Microbubble-induced sonoporation involved in ultrasound-mediated DNA transfection in vitro at low acoustic pressures. *Journal of Biomechanics*. May. 2012, vol.45, iss. 8, p. 1339-1345.
55. Tomizawa, M.; Shinozaki, F.; Motoyoshi, Y.; Sugiyama, T.; Yamamoto, S.; Sueishi, M. Sonoporation: Gene transfer using ultrasound. *World J. of Methodology*. December. 2013, vol 3 iss. 4, p. 39 – 44.
56. Postema, M.; Kotopoulos, S.; Delalande, A.; Gilja, O. H. Sonoporation: Why microbubbles create pores. *Ultraschall in medicine*. 2012, vol. 33, no 1, p. 97–98.
57. Kotopoulos, S.; Dimcevski, G.; Gjertsen, B. T.; Gilja, O. H.; Cormack, O. M.; Postema, M. Sonoporation: From the lab to human clinical trials. 2014 IEEE International Ultrasonics Symposium Proceedings. Chicago, IL. September. 2014, p. 846 – 849.
58. Krasovitski, B.; Frenkel, V.; Shoham, S.; Kimmel, E. Intramembrane cavitation as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. February. 2011, vol. 108, iss. 8, p. 3258–3263.
59. Yao, C.; Mi, Y.; Li, C.; Hu, X.; Chen, X.; Sun, C. Study of transmembrane potentials on cellular inner and outer membranes – frequency response model and filter characteristic simulation. *IEEE Trans. Biomedical Engineering*. 2008, vol. 55, p. 1792 – 1799.
60. Yao, C.; Mo, D.; Li, C.; Sun, C.; Mi, Y. Study of transmembrane potentials of inner and outer membranes, induced by pulsed – electric field model and simulation. *IEEE Trans. Plasma Sci*. 2007, vol. 35, p. 1541 – 1549.
61. Weaver, J. C.; Electroporation of biological membranes from multicellular to nano scales. *IEEE Trans. Dielectrics and Electrical Insulation*. 2003, vol. 10, p. 754 – 768.

62. Yao, C.; Hu, X.; Mi, Y.; Li, C.; Sun, C. Window effect of pulsed electric field on biological cells. *IEEE Transactions on dielectrics and electrical insulation*. 2009, vol. 16, no. 5, p. 1259 – 1266.
63. Validated cell types. CHO cells. 2015. Prieiga internete: <http://www.merckmillipore.com/INTL/en/life-science-research/cell-analysis/scepter-cell-counter/validated-cell-types/Vlib.qB.VKQAAAFpA4.1ab8,nav>. Žiūrėta [2015.03.31].
64. Šalomskaitė – Davalgienė, S. Biologiškai aktyvių molekulių elektropernašos į ląsteles invitro ir į navikinius audinius efektyvumo tyrimas. Kauno medicinos universitetas; Vytauto didžiojo universitetas. Daktaro disertacija. Kaunas 2006.
65. Yao, C.; Hu, X.; Li, C.; Mi, Y.; Sun, C. Study on time - frequency characteristics of cellular transmembrane potentials based on equivalent circuit model. Aug. 2008, 30th Annual international conference of IEEE, p. 1032 – 1035.
66. Escoffre, J. M.; Kaddur, K.; Rols, M.; Bouakaz, A. In vitro gene transfer by electrosonoporation. *Ultrasound in medicine and biology*. June. 2010, vol. 36, no. 10, p. 1746 – 1755.
67. Yamashita, Y – I.; Shimada, M.; Tachibana, K.; Harimoto, N.; Tsujita, E.; Shirabe, E.; Miyazaki, J – I.; Sugimachi, K. In vitro gene transfer into muscle via electro – sonoporation. *Human gene therapy*. November. 2002, vol. 13, p. 2079 – 2084.
68. Yamashita, Y.; Shimada, M.; Minagawa, R.; Tsujita, E.; Harimoto, N.; Tanaka, S.; Shirabe, K.; Miyazaki, J.; Maehara, Y. Muscle-targeted interleukin-12 gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in mice using in vivo electrosonoporation. *Mol. Cancer Ther.* 2004, p. 177-182
69. Venslauskas, M. S. Biomembranos elektroporacija ir vėžio gydymas. *Mokslas ir gyvenimas*. 2010, nr. 2 – 3, psl. 6 – 7.
70. Paine, P. L.; Moore, L. C; Horowitz, S. B. Nuclear envelope permeability. *Nature*. 1975, vol. 254, p. 677 – 690.
71. Pron, G.; Belehradek, J.; Orłowski, S.; Mir, L. M. Involvement of membrane bleomycinbinding sites in bleomycin cytotoxicity. *Biochemical pharmacology*. 1994, vol. 48, p. 301 – 310.
72. Pan, H.; Zhou, Y.; Sieling F.; Shi, J.; Cui, J.; Deng, C. Sonoporation of cells for drug and gene delivery. *Proceedings of the 26th annual international conference of the IEEE EMBS*. 2004, vol. 2, p. 3531 – 3534.
73. Larkin, J. O.; Casey, G. D.; Tangney, M.; Cashman, J.; Collins, C. G.; Soden, M. D.; O’Sullivan, G. Effective tumor treatment using optimized ultrasound – mediated delivery of bleomycin. *Ultrasound Med. Biol.*, 2007 m., Ireland.
74. Prausnitz, M. R.; Banga, A. K.; Assessing the potential of skin electroporation for the delivery of protein – and gene – based drugs. *TibTech*. 1998 m. , vol. 16, iss. 10, p. 408 – 412.
75. Cancer. World health organization. Media center. 2015. Prieiga internete: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Žiūrėta [2015.05.05].

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DARBO TEMA SĄRAŠAS

Perskaitytas pranešimas konferencijoje

- ❖ Visockis, M; Juška, V. Elektrosonoporacijos efektyvumo analizė – techninio lygio apžvalga. Telekomunikacijos ir elektronika – 2014 = Telecommunications and electronics - 2014: tarptautinės studentų mokslinės konferencijos programa ir pranešimų medžiaga. Kauno technologijos universitetas. Kaunas : Technologija, 2014. ISSN 2335 – 7878.

Straipsniai spausdinti konferencijų pranešimų medžiagoje

- ❖ Visockis, M; Kopustinskas, A; Juška, V. Elektrosonoporacijos energetinių parametru modeliavimas ir prietaiso projektavimas. E2TA – 2015: tarptautinės studentų mokslinės konferencijos programa ir pranešimų medžiaga. Kauno technologijos universitetas. Kaunas: Technologija, 2015. ISBN 978 – 609 – 02 – 1133 – 5, p. 32 – 35.
- ❖ Visockis, M.; Rajeckaitė, V.; Rafinavičius, A.; Kopustinskas, A.; Šatkauskas, S. Investigation of electrosonoporation efficiency. Virtualūs instrumentai biomedicinoje 2015 = Virtual instruments in biomedicine 2015 : tarptautinės mokslinės - praktinės konferencijos pranešimų medžiaga. Klaipėdos universitetas. Sveikatos mokslų fakultetas. Klaipėda: Klaipėdos universiteto leidykla, 2015. ISBN 978 – 9955 – 18 – 856 – 8, p. 136 – 141.

PRIEDAI

Priedas 1. Sonoporos spindulio modeliavimo programos tekstas

```
% ESTIMATION OF PORE SIZE FROM TMC
% 2015.02.04

clear all
close all

% Modelio parametrai

% Transmembranines sroves pasiskirstymas

I=1*10^-2:1*10^1:1*10^2
T=2*10^1*10^1:1:7*10^1

% 1 grafikas

h1=5*10^(-9); % Membranos storis
h2=6*10^(-9); % Membranos storis
h=7*10^(-9); % Membranos storis

% The membrane potential in relation to
%the exterior surface of the membrane
%V=-50*10^(-3);
V=-50*10^(-3)
%T=293;

K_k=1; % Ion partition coefficient
R=8.315; % Idealiuju duju konstanta
F=96490; % Faradejaus konstanta
pi=3.141592654; %

T1=293.15; % Temperatura, K (273.15 K = 20 C )
T2=303.15; % Temperatura, K (283.15 K = 30 C )
T3=313.15; % Temperatura, K (313.15 K = 40 C )
T4=323.15; % Temperatura, K (323.15 K = 50 C )
T5=333.15; % Temperatura, K (333.15 K = 60 C )
T6=343.15; % Temperatura, K (343.15 K = 70 C )

% Cl- valentingumas: -1, +1, +2, +3, +4, +5, +7
% Na + valentingumas: +1
% K + valentingumas: +1

% Na + jonai
c1_kex=96; % Intracellular ion concentration
c1_kin=10.1; % Extracellular ion concentration
D1_k=1.33*10^(-9); % Jonu difuzijos koeficientas
%P1_kp=0.266; % Jonu pralaidumas K_k=1
%P1_k=3.75*10^(-10); % Jonu pralaidumas K_k>1
P1_kp=D1_k/h; % priklausomybe nuo membranos storio

z1_k=1; % Jonu valentingumas
```



```

% K+ jonai
c2_kex=2; % Intracellular ion concentration
c2_kin=109.5; % Extracellular ion concentration
D2_k=1.96*10^(-9); % Jonu difuzijos koeficientas
%P2_kp=0.392; % Jonu pralaidumas K_k=1
%P2_k=9.55*10^(-10); % Jonu pralaidumas K_k>1
P2_kp=D2_k/h; % priklausomybe nuo membranos storio

z2_k=1; % Jonu valentingumas

% Cl- jonai
c3_kex=100; % Intracellular ion concentration
c3_kin=37.7; % Extracellular ion concentration
D3_k=2.03*10^(-9); % Jonu difuzijos koeficientas
%P3_kp=0.406; % Jonu pralaidumas K_k=1
%P3_k=3.40*10^(-10); % Jonu pralaidumas K_k>1
P3_kp=D3_k/h; % priklausomybe nuo membranos storio

z3_k=7 % Jonu valentingumas

% GHK current equatation

U1_k=z1_k*F*V/R*T1; % Ramybes potencialas Na+
U2_k=z2_k*F*V/R*T1; % Ramybes potencialas K+
U3_k=z3_k*F*V/R*T1; % Ramybes potencialas Cl-

U4_k=z1_k*F*V/R*T2; % Ramybes potencialas Na+
U5_k=z2_k*F*V/R*T2; % Ramybes potencialas K+
U6_k=z3_k*F*V/R*T2; % Ramybes potencialas Cl-

U7_k=z1_k*F*V/R*T3; % Ramybes potencialas Na+
U8_k=z2_k*F*V/R*T3; % Ramybes potencialas K+
U9_k=z3_k*F*V/R*T3; % Ramybes potencialas Cl-

U10_k=z1_k*F*V/R*T4; % Ramybes potencialas Na+
U11_k=z2_k*F*V/R*T4; % Ramybes potencialas K+
U12_k=z3_k*F*V/R*T4; % Ramybes potencialas Cl-

U13_k=z1_k*F*V/R*T5; % Ramybes potencialas Na+
U14_k=z2_k*F*V/R*T5; % Ramybes potencialas K+
U15_k=z3_k*F*V/R*T5; % Ramybes potencialas Cl-

U16_k=z1_k*F*V/R*T6; % Ramybes potencialas Na+
U17_k=z2_k*F*V/R*T6; % Ramybes potencialas K+
U18_k=z3_k*F*V/R*T6; % Ramybes potencialas Cl-

% Transmembraninė srovė sukuriama Na, K, Cl jonu

i_k1=z1_k*F*P1_kp*U1_k*((c1_kin*exp(U1_k))-c1_kex)/(exp(U1_k)-1);
i_k2=z2_k*F*P2_kp*U2_k*((c2_kin*exp(U2_k))-c2_kex)/(exp(U2_k)-1);
i_k3=z3_k*F*P3_kp*U3_k*((c3_kin*exp(U3_k))-c3_kex)/(exp(U3_k)-1);

i_k4=z1_k*F*P1_kp*U4_k*((c1_kin*exp(U4_k))-c1_kex)/(exp(U4_k)-1);
i_k5=z2_k*F*P2_kp*U5_k*((c2_kin*exp(U5_k))-c2_kex)/(exp(U5_k)-1);

```

```

i_k6=z3_k*F*P3_kp*U6_k*((c3_kin*exp(U6_k))-c3_kex)/(exp(U6_k)-1)

i_k7=z1_k*F*P1_kp*U7_k*((c1_kin*exp(U7_k))-c1_kex)/(exp(U7_k)-1);
i_k8=z2_k*F*P2_kp*U8_k*((c2_kin*exp(U8_k))-c2_kex)/(exp(U8_k)-1);
i_k9=z3_k*F*P3_kp*U9_k*((c3_kin*exp(U9_k))-c3_kex)/(exp(U9_k)-1)

i_k10=z1_k*F*P1_kp*U10_k*((c1_kin*exp(U10_k))-c1_kex)/(exp(U10_k)-1);
i_k11=z2_k*F*P2_kp*U11_k*((c2_kin*exp(U11_k))-c2_kex)/(exp(U11_k)-1);
i_k12=z3_k*F*P3_kp*U12_k*((c3_kin*exp(U12_k))-c3_kex)/(exp(U12_k)-1)

i_k13=z1_k*F*P1_kp*U13_k*((c1_kin*exp(U13_k))-c1_kex)/(exp(U13_k)-1);
i_k14=z2_k*F*P2_kp*U14_k*((c2_kin*exp(U14_k))-c2_kex)/(exp(U14_k)-1);
i_k15=z3_k*F*P3_kp*U15_k*((c3_kin*exp(U15_k))-c3_kex)/(exp(U15_k)-1)

i_k16=z1_k*F*P1_kp*U16_k*((c1_kin*exp(U16_k))-c1_kex)/(exp(U16_k)-1);
i_k17=z2_k*F*P2_kp*U17_k*((c2_kin*exp(U17_k))-c2_kex)/(exp(U17_k)-1);
i_k18=z3_k*F*P3_kp*U18_k*((c3_kin*exp(U18_k))-c3_kex)/(exp(U18_k)-1)

```

```

% Bendra transmembranine srove

```

```

A1=pi*(i_k1+i_k2+i_k3);
A2=pi*(i_k4+i_k5+i_k6);
A3=pi*(i_k7+i_k8+i_k9);
A4=pi*(i_k10+i_k11+i_k12);
A5=pi*(i_k13+i_k14+i_k15);
A6=pi*(i_k16+i_k17+i_k18);

```

```

% Poros spindulio apskaičiavimas

```

```

r1= sqrt(I)/sqrt(A1);
r2= sqrt(I)/sqrt(A2);
r3= sqrt(I)/sqrt(A3);
r4= sqrt(I)/sqrt(A4);
r5= sqrt(I)/sqrt(A5);
r6= sqrt(I)/sqrt(A6);

```

```

Y7=abs(r1)*10^9;
Y8=abs(r2)*10^9;
Y9=abs(r3*10^9);
Y10=abs(r4)*10^9;
Y11=abs(r5)*10^9;
Y12=abs(r6)*10^9;

```

```

% max ir min poros spinduliai

```

```

y1=Y7;
x1=I;
y1max=max(y1);
x1max=x1(find(y1==y1max));

```

```

y1=Y7;
x1=I;
y1min=min(y1);
x1min=x1(find(y1==y1min));

```

```

% Max kai I= 1uA

index = find(x1==100);
Y7_point = Y7(index);
%figure(2)
%plot(x1,Y7,x1(index),Y7_point,'o');

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%5
y2=Y8;
x2=I;
y2max=max(y2);
x2max=x2(find(y2==y2max));

y3=Y9;
x3=I;
y3min=min(y3);
x3min=x3(find(y3==y3min));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
y4=Y10;
x4=I;
y4max=max(y4);
x4min=x4(find(y4==y4max));

y5=Y9;
x5=I;
y5min=min(y5);
x5min=x5(find(y5==y5min));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
y6=Y12;
x6=I;
y6max=max(y6);
x6max=x6(find(y6==y6max));

% Grafinė priklausomybė

figure(1)
subplot(3,3,1)
loglog('r-')
grid on
title('T=20 \circC','FontSize',16)
xlabel('Trmb_i, \muA','FontSize',16)
ylabel('P_r, nm','FontSize',16)

```