

**МОСКОВКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
им. М.В. ЛОМОНОСОВА**

**НАУЧНО- ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ  
ФИЗИКИ им. Д.В. СКОБЕЛЬЦЫНА**

**Козлова Е.К., Черняев А.П., Черныш А.М., Алексеева П.Ю.**

**ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ – ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД  
ЭКСПРЕСС–ДИАГНОСТИКИ ПОВРЕЖДЕНИЙ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН В РЕЗУЛЬТАТЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ  
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ  
НА ЭРИТРОЦИТЫ**

**Препринт НИИЯФ МГУ – 2005-7/773**

УДК 612.014.421.5  
ББК 28.073  
К63

E.K. Kozlova, A.P. Chernyaev, A.M. Chernysh, P.J. Alekseeva, P.V.

E-mail address: [waterlake@mail.ru](mailto:waterlake@mail.ru)

**Electroporation – effective method of express train - diagnostic of membrane damage as a result of effect of the physico-chemical factors on erythrocytes**

Preprint NPI MSU-2005-7/773

Abstract

Experimental results of action of  $\gamma$ -radiation, accelerated electron beam, perftoran, surface-active substances, efer and impulse electrical field on erythrocyte biological membrane.

E.K. Козлова, А.П. Черняев, А.М. Черныш, П.Ю. Алексеева, П.В.

**Электропорация – эффективный метод экспресс-диагностики повреждений биологических мембран в результате воздействия физико-химических факторов на эритроциты**

Препринт НИИЯФ МГУ-2005-7/773

Аннотация

В работе представлены результаты экспериментального исследования действия  $\gamma$ -излучения, пучков ускоренных электронов, перфторуглеродных соединений, поверхностно-активных веществ, эфира и импульсного электрического поля на биологические мембраны эритроцитов.

© НИИЯФ МГУ, 2005

## Оглавление

Введение.....	3
Материалы и методы.....	6
<i>Методика экспериментов по исследованию воздействия импульсного электрического поля на суспензию эритроцитов.....</i>	<i>6</i>
<i>Методика экспериментов по исследованию воздействия ионизирующего излучения на суспензию эритроцитов.....</i>	<i>10</i>
Результаты экспериментов.....	11
<i>Исследование состояние мембран эритроцитов в суспензии в течение нескольких дней после ее приготовления.....</i>	<i>11</i>
<i>Исследование результатов воздействия <math>\gamma</math>-излучения (<math>^{226}\text{Ra}</math>) с помощью калиброванного импульсного электрического поля на мембраны эритроцитов.....</i>	<i>12</i>
<i>Комбинированное действие двух электрических импульсов на суспензию эритроцитов.....</i>	<i>17</i>
<i>Исследование воздействия перфторана (ПФ), поверхностно-активных веществ (ПАВ) на суспензию эритроцитов с помощью калиброванной электропорации биологических мембран.....</i>	<i>19</i>
Модель.....	22
Вывод.....	35
Приложение.....	36
Список литературы.....	38

## Введение

В результате воздействия физико-химических факторов на биологические клетки эффекты нарушения мембран в ряде случаев проявляются через несколько часов и даже через многие сутки [1]. Такие повреждения называются замаскированными. Однако необратимые процессы на микроуровне могут возникать сразу же после воздействия. И только через латентный период эти изменения проявятся на уровне клеточных и тканевых процессов. Поэтому разработка методов экспресс-диагностики замаскированных повреждений мембран биологических клеток является одной из актуальных задач [2,3].

В настоящей работе исследовали действие  $\gamma$ -излучения, пучков ускоренных электронов, перфторуглеродных соединений, поверхностно-активных веществ, эфира на биологические мембраны эритроцитов. Приведены результаты диагностики повреждения биологических мембран этими факторами в первые 1 - 100 мин, а также в течение нескольких суток после воздействия с использованием калиброванного импульсного электрического поля.

Импульсное электрическое поле (ИЭП), действуя на биологические мембраны, может при определенных условиях вызывать в них образование сквозных пор. Такой процесс называют электропорацией. Мембраны подвергаются электропорации для ввода в клетку лекарственных веществ, различных генов [4-8]. Электропорации подвергаются как мембраны клеток, так и искусственные мембраны.

Воздействию импульсного электрического поля подвергаются различные клетки – эритроциты, клетки мышцы, растительные клетки, бактерии. Особое внимание уделяется раковым клеткам. Исследуют возможности комплексного воздействия на клетки: радиационного облучения, электропорации и введения в клетку химических агентов. При этом изучают выживаемость клеток и эффекты мутации. Показано, что эффект замедления роста опухоли неодинаков при разном сочетании этих факторов: суммарный биологический эффект не является суммой эффектов этих воздействий по отдельности. В медицинской практике мембраны кардиомиоцитов подвергаются электропорации при электрической дефибрилляции сердца [16-20]. В результате электрического пробоя возникают различные биофизические явления:

изменение функционирования клеток и даже их гибель. Особый интерес представляет асимметрия электропорации мембраны клетки со стороны катода и анода [20-24].

Сочетание импульсного электрического поля с физико-химическим воздействием на биологическую мембрану приводит к изменению результатов электропорации. Экспериментальные факты свидетельствуют о том, что на результат электропорации влияют не только электрические параметры воздействия (напряженность электрического поля, длительность импульса), но и другие факторы, которые могут изменить порог электропорации. В работах [9,10] показано изменение порога электропорации плоского синтетического липидного бислоя под воздействием поверхностно-активных веществ. Poloxamer 188 увеличивал статистически значимый порог электропорации, а octaethyleneglycol-mono-n-dodecyl-ether (C12E8) уменьшал его на 10 - 40%. В работе [9] сообщается, что alpha-tocopherol влияет на электрические свойства плоской бислоистой мембраны и уменьшает порог электропорации. Порог электропорации уменьшается при комбинированном действии импульсного электрического поля и пучка ускоренных электронов [11-13]. В работах приведены результаты выживаемости клеток при поглощении ими молекул calcein, макромолекул propidium iodide, trypan blue во время импульсного электрического воздействия. Импульс выступает в данном случае как посредник. Добавление макромолекул после импульсного воздействия не приводило к их транспорту в цитоплазму. В клинической практике в качестве кровезаменителей все шире применяют перфторуглеродные соединения, например перфторан. Эти соединения также вносят изменения в структуру мембран и меняют характеристики электропорации [14,15]. Поэтому изучение действия перфторана на модифицированную электрическим полем мембрану эритроцитов является актуальной теоретической и практической задачей.

Одной из острых проблем современной медицины остаётся необходимость экстренного прекращения фибрилляции желудочков сердца. Несмотря на интенсивные поиски новых методов, в мире существует лишь один эффективный метод – электрическая дефибрилляция сердца. Высоковольтный импульс электрического поля образует в мембранах кардиомиоцитов сквозные поры, и как следствие, прекращение фибрилляции сердечной мышцы [16-18]. Эффективность электропорации

зависит не только от напряжённости электрического поля, но и от формы дефибриллирующего импульса. Клинические и экспериментальные исследования показывают, что эффективность биполярного импульса Gurvich выше эффективности однополярного импульса Edmark, хотя эти различия не всегда однозначны. В 10 – 20 % наблюдалась обратная зависимость [8]. В настоящее время разрабатываются рекомендации по использованию диапазона энергий бифазных импульсов в клинике [10,20].

Несмотря на многочисленные исследования, экспериментальный материал по действию монополярных и биполярных импульсов на биологические мембраны остаётся недостаточным. Как следствие этого, нет единого понимания механизмов электропорации при действии импульсов различной формы. Порог дефибрилляции, а следовательно, и электропорации, для бифазного импульса меньше, чем для монофазного. При дефибрилляции в ряде случаев пациенту приходится применять воздействие несколькими электрическими импульсами. Этот процесс также можно рассматривать как комбинированное воздействие. В работах [18-20] показано, что увеличение количества импульсов (время между импульсами 1 с) уменьшало эффективный порог гибели клеток.

Многообразие биофизических явлений при электропорации и ее практическая значимость определяет научный интерес к изучению механизмов электрического пробоя мембран. На сегодняшний день обсуждаются в основном два подхода к описанию явления электропорации: энергетический и кинетический. Первый рассматривает энергетические и силовые соотношения в поре. Второй основан на решении уравнения Смолуховского относительно числа пор в мембране. Как правило, математический анализ проводят с учетом обоих подходов [19-22]. Наиболее полной и обоснованной является математическая модель, представленная в работах [21,22]. Эта модель, учитывает микропараметры исходной мембраны. Она позволяет написать дифференциальное уравнение и свести процесс электропорации к количественному результату, а именно к количеству пор, образуемых в мембране.

В настоящей работе с помощью электропорации было исследовано состояние мембран эритроцитов после воздействия как отдельных физико-химических факторов, так и их комбинации:

- 1)  $\gamma$ -излучение,
- 2) перфторан различной концентрации,
- 3)  $\gamma$ -излучение, перфторан,
- 4) поверхностно-активные вещества,
- 5) эфир,
- 6) импульсное электрическое поле различной полярности,
- 7) перфторан, импульсное электрическое поле различной полярности,
- 8) поверхностно-активное вещество, импульсное электрическое поле различной полярности.

Всего проведено более 1000 опытов по комбинированному действию физико-химических факторов и импульсного электрического поля на суспензию эритроцитов. Результаты всех опытов были обработаны с помощью стандартных методов математической статистики.

## Материалы и методы

### ***Методика экспериментов по исследованию воздействия импульсного электрического поля на суспензию эритроцитов***

Исходная суспензия эритроцитов крови человека приготавливалась непосредственно перед проведением опытов в пропорции 0,05 мл крови в 1 мл 0,9 % раствора хлористого натрия. В 1 мл исходной суспензии примерно 230 млн. эритроцитов. Оптическая плотность слоя раствора 5 мм равнялась 1. Опыты проводили через 1 час после приготовления суспензии. Во всех опытах суспензию термостатировали при температуре 20 °С. Перед проведением каждого этапа эксперимента суспензию перемешивали. Таким образом, за время эксперимента все значимые характеристики суспензии крови тщательно контролировались. Подробно методика приготовления суспензии и режимы электропорации описаны в работах [11,13].

Эффект от воздействия внешними факторами оценивали по скорости уменьшения численности эритроцитов в результате гемолиза. Информацию о количестве эритроцитов, находящихся в данный момент времени в суспензии, получали, измеряя оптическую плотность раствора  $D$  с помощью фотоэлектроколориметра. При длине волны света 760 нм,

пропускание света через раствор определяется в основном рассеянием на эритроцитах. Тени эритроцитов, образующиеся после гибели клетки и выхода гемоглобина наружу свет не рассеивают. Поэтому уменьшение количества эритроцитов в результате их гемолиза  $n(t)$  приводит к уменьшению оптической плотности суспензии  $D(t)$ , так как при малой концентрации раствора наблюдается линейная зависимость  $D(t) \sim n(t)$ . Зависимость  $D(t)$  будем называть кинетической кривой. На всех этапах эксперимента одновременно контролировали оптическую плотность контрольной суспензии.

Как правило, измеряют кривые выживаемости, то есть зависимость доли выживших клеток от величины напряженности электрического поля. Показано, что происходит смещение кривых выживаемости, если добавляют, химические добавки или применяют несколько импульсов. Зная кривую выживаемости и зная, через какое время после воздействия она получена, можно оценить среднюю скорость гибели клеток для каждой напряженности электрического поля.

В наших экспериментах использовали и другой метод. Кинетические кривые измеряли непосредственно после воздействия калиброванного импульса электрического поля на клетки. С помощью кинетической кривой оценивали мгновенную скорость ( $V(t) = dN/dt$ ) и среднюю скорость ( $V_{cp} = \Delta N/\Delta t$ ) уменьшения числа эритроцитов,  $N$  – количество клеток в данный момент времени  $t$ ,  $\Delta N$  – изменение числа клеток за промежуток времени  $\Delta t$ , по которому происходит усреднение.

Известно, что характеристики суспензии, а также действие различных физических факторов на неё существенно зависят от температуры раствора. Поэтому было проведено 140 различных опытов для определения оптимальной методики эксперимента и изучения температурной зависимости полученных результатов.

Температура влияет на скорость гемолиза эритроцитов, при увеличении температуры скорость гибели выделенных из организма клеток будет возрастать. При воздействии импульсного электрического поля наблюдалась противоположная картина. Электропорацию электрическим импульсом проводили при различных температурах (от 10 до 37 °C). При этом температура создания суспензии равнялась температуре, при которой производилось воздействие импульсным электрическим полем, и температуре хранения суспензии.



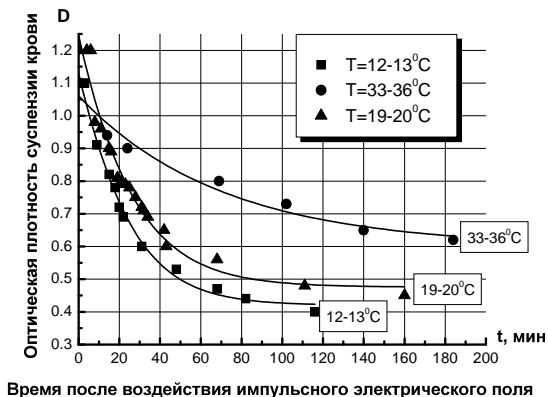
На рис. 1а представлены кинетические кривые уменьшения числа эритроцитов после воздействия ИЭП для разных значений рабочей температуры (12 – 13, 19 – 20, 33 – 36 °С). Наблюдалось увеличение скорости гибели клеток при снижении рабочей температуры. Кривая зависимости скорости изменения числа эритроцитов от температуры на отрезке 10 – 37 °С имеет сигмоидальный характер (рис. 1б). От 15 до 25 °С скорость гибели клеток резко уменьшалась, а при температуре выше 25 °С, скорость изменялась незначительно. То-есть электропорация мембраны эритроцитов при меньшей температуре суспензии вызывалась меньшими значениями напряженности поля.

Если суспензию крови создавали при температуре 36 °С и подвергали воздействию импульсного электрического поля при 36 °С, то скорость гибели клеток была меньше в 1,3 - 1,5 раз по сравнению с тем, если суспензию создавали при температуре 12 °С и подвергали воздействию поля при 36 °С. Это означает, что клетки повреждались уже при выделении эритроцитов из организма и помещении их в физиологический раствор. Повреждение это тем больше, чем больше перепад между температурой крови в организме и температурой физиологического раствора, в который попадают эритроциты.

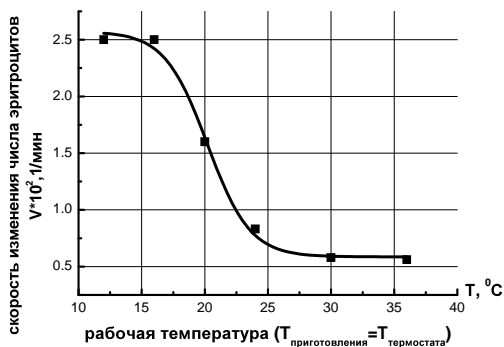
Таким образом, температура и скорость её уменьшения определяли механическое состояние мембраны перед воздействием на нее импульсным электрическим полем. При увеличении скорости охлаждения в самой мембране могут возникать термические напряжения, так как температура снаружи и внутри клетки не успевает выравняться из-за малой теплопроводности, что приводит к возникновению механических дефектов.

Важно отметить, что изменения в структуре мембраны, возникающие вследствие температурных напряжений в отсутствие электрического воздействия, не проявляется в течение нескольких дней. Результаты повреждения остаются скрытыми, потенциальными, а воздействие импульсного электрического поля проявляет эти повреждения.

*Рис.1. Влияние температуры на скорость уменьшения численности эритроцитов при воздействии на них импульсного электрического поля (ИЭП).*



а) Кинетические кривые уменьшения числа эритроцитов после воздействия ИЭП для разных значений рабочей температуры  $T$  (при этом температура приготовления суспензии  $T_0$  равняется температуре термостата  $T_{\text{термостата}}$ , в котором хранилась суспензия, и при которой суспензию подвергали электропорации электрическим импульсом),



б) Зависимость скорости изменения числа эритроцитов  $V$  от рабочей температуры  $T$  при воздействии на суспензию крови ИЭП (температура приготовления суспензии  $T_0$  равна температуре термостата  $T_{\text{термостата}}$ , воздействие ИЭП осуществлялось при температуре термостата).

Изменения температуры происходят не только при создании суспензии, но и при воздействии на нее импульсного электрического поля. При воздействии одним электрическим

импульсом температура в суспензии повышалась в среднем на 8 °С, таким образом, относительная величина нагрева при низких температурах была больше, а это также приводило к более сильному повреждению мембран эритроцитов.

После выделения из организма эритроцитов изменяются их биохимические и биофизические свойства эритроцитов, изменяется форма, нарушаются ионные токи, образуются продукты перекисного окисления. Экспериментально были измерены кривые “старения” суспензии, а именно зависимость скорости изменения числа эритроцитов от времени выдержки (промежуток времени от создания суспензии до воздействия на нее импульсного электрического поля) для разных значений рабочей температуры. В первые 60 минут в суспензии происходят переходные процессы, затем наблюдается стационарный участок, который и был выбран для проведения экспериментов.

В результате методических опытов были выбраны рабочие параметры проведения экспериментов: опыты проводили через 1 час после приготовления суспензии при температуре 20 °С. Во всех опытах суспензию термостатировали. Перед проведением каждого этапа эксперимента суспензию перемешивали. За время эксперимента контрольная суспензия не меняла исходные характеристики.

Для исследования состояния мембран эритроцитов был выбран импульс электрического поля, создающий в суспензии электрическое поле с напряженностью  $E = 1700$  В/см [11,13]. Этот импульс был назван калиброванным.

### ***Методика экспериментов по исследованию воздействия ионизирующего излучения на суспензию эритроцитов***

В качестве воздействия ионизирующего излучения на живые клетки организма с помощью метода последующей электропорации калиброванным импульсом электрического поля рассматривалось действие  $\gamma$ -излучения источника  $^{226}\text{Ra}$  на мембраны эритроцитов. Для облучения суспензии эритроцитов источником  $^{226}\text{Ra}$  в центр металлического контейнера помещали колбу с радионуклидом, пробирки с суспензией размещали на расстоянии 30 мм от источника. В экспериментах использовали излучение двух источников  $^{226}\text{Ra}$  активностью 2,04 и 9,25 мКи, время облучения варьировалось от 5 мин до 24 часов. Дозу

варьировали от 5 до 100 Р. Образцы подвергали действию  $\gamma$ -излучения, после этого пробирки с облученной и контрольной суспензией оставляли на сутки. Затем на суспензию воздействовали импульсным электрическим полем и измеряли кинетически кривые (зависимость оптической плотности суспензии  $D$  от времени). Опыты проводились для трех диапазонов температур суспензии крови: 14 – 15 °С, 17 – 18 °С и 20 – 21 °С.

Общая схема комбинированного воздействия ионизирующего излучения и импульсного электрического поля представлена на рис. 2.

## Результаты экспериментов

### ***Исследование состояние мембран эритроцитов в суспензии в течение нескольких дней после ее приготовления***

В течение нескольких дней после создания суспензии, с помощью калиброванной электропорации, было исследовано состояние мембран эритроцитов. На рис. 3а приведены значения оптической плотности суспензии до электропорации в течение 12 дней после приготовления суспензии. На рис. 3б приведены относительные скорости уменьшения числа эритроцитов в результате электропорации. Из рисунков следует, что несмотря на то, что оптическая плотность суспензии не изменялась в течение 7 – 8 дней (количество эритроцитов в суспензии оставалось практически тем же) (рис.3а), изменения в мембране происходили, что можно было зафиксировать с помощью метода электропорации. Скорость гемолиза эритроцитов, подверженных электропорации в разные дни после облучения, была неодинаковая. Так, на 2 - 3 сутки после приготовления суспензии скорость уменьшения числа эритроцитов была больше соответствующей скорости в первые сутки (точка А) в 5 – 6 раз (точки В – В'). Это может быть связано с необратимыми процессами перекисного окисления в мембране [26]. Однако на 5 сутки скорость уменьшения числа эритроцитов в результате электропорации была меньше, чем в первые сутки. Это явление может быть связано с уменьшением поверхностного заряда эритроцитов при хранении суспензии [1]. Если суспензию подвергали электропорации на 6 – 10 сутки после ее приготовления, то скорость уменьшения числа эритроцитов снова

становилась больше, чем в 1 сутки (т.  $D - D'$ ). Точка  $D$  соответствует точке  $E$  на кривой  $D(t)$  (рис. 3а), когда оптическая плотность контрольной суспензии становилась меньше 1. Далее скорость уменьшения числа клеток необратимо увеличивалась.

***Исследование результатов воздействия  $\gamma$ -излучения ( $^{226}\text{Ra}$ ) с помощью калиброванного импульсного электрического поля на мембраны эритроцитов***

В зависимости от дозы облучения наблюдали эффекты замедления и ускорения кинетики гемолиза эритроцитов. На рис. 4 представлены кинетические кривые для эритроцитов, которые облучались в течение 3 часов (кривая 2) при температуре  $t = 19-20^\circ\text{C}$  (а) и при  $t = 14 - 15^\circ\text{C}$  (б) источником с активностью 2,04 мКи, а затем через 21 час подвергались электропорации с помощью калиброванного импульса. Для сравнения представлены кинетические кривые для соответствующих контрольных суспензий для данных температур (кривая 1). На рис. 4а кривая 2 проходит ниже кривой 1, что соответствует ускорению гемолиза. А на рис. 4б – наоборот выше, что соответствует его замедлению. Облученные эритроциты (кривая 3) без последующей электропорации вели себя подобно клеткам в контрольной суспензии, которая не подвергалась облучению и электропорации (кривая 3' на рис. 4).

На рис. 5 представлены результаты скорости изменения числа эритроцитов в результате электропорации в зависимости от времени после облучения.

Для дозы 5 Р отношение скоростей  $V_{\text{гамма}} / V_{\text{контроля}} = 1,60 \pm 0,16$  в случае электропорации через 2 часа после облучения суспензии.

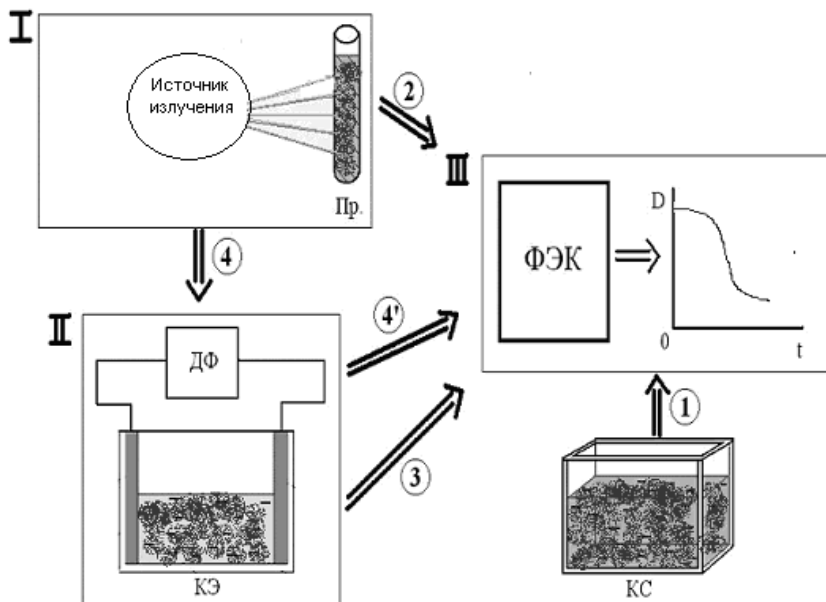


Рис. 2. Схема экспериментов. I этап – облучение суспензии  $\gamma$ -излучением ( $^{226}\text{Ra}$ ), II этап – электропорация мембраны эритроцитов, III этап – измерение оптической плотности суспензии и построение кинетических кривых. Пр – пробирка с суспензией, ДФ – дефибриллятор, ФЭК – фотозлектроколориметр, КС – контрольная суспензия, КЭ – кювета с суспензией и электродами, Ф – рассеивающая фольга. Получение кинетических кривых: 1 – контрольной суспензии, 2 – облученной суспензии, 3 – суспензии после электропорации, 4–4' – суспензии после облучения и последующей электропорации (комбинированное действие).

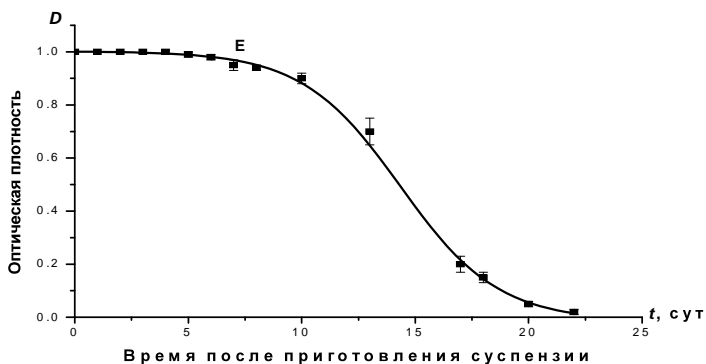


Рис.3 а

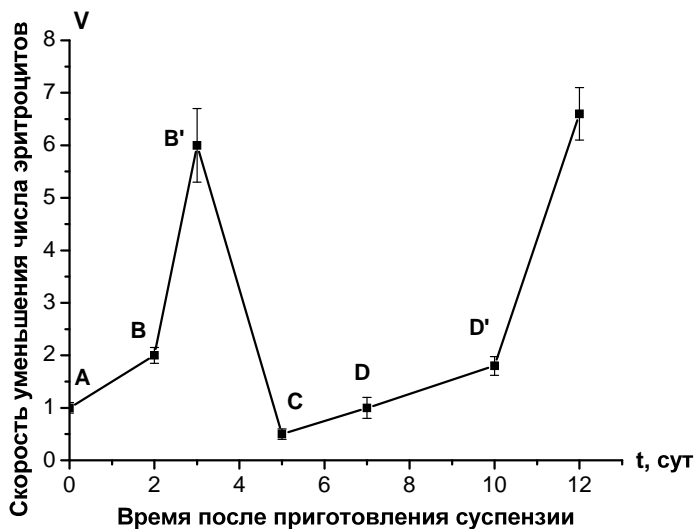


Рис.3 б

Рис.3. Изменение характеристик суспензии эритроцитов после ее приготовления: а) оптическая плотность суспензии до электропорации, б) скорость уменьшения числа клеток после электропорации; за единицу принята скорость в день приготовления суспензии.

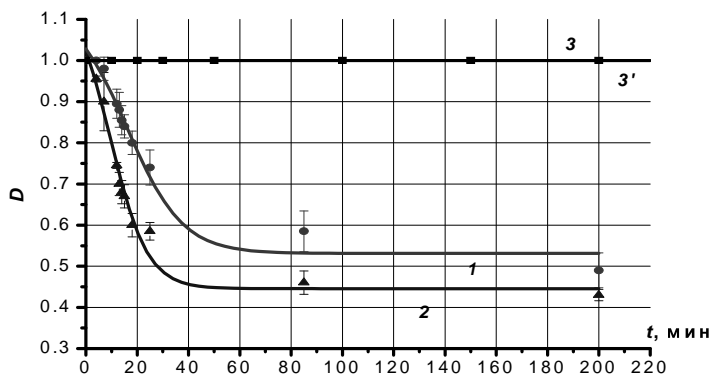


Рис. 4а

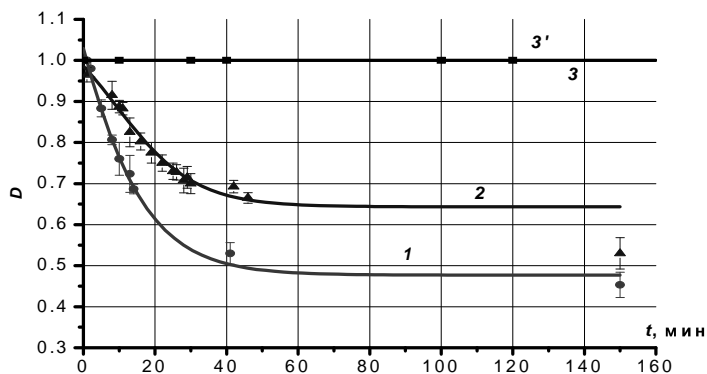


Рис. 4б

Рис. 4. Кинетические кривые  $D(t)$  ( $t$  – время после воздействия импульсным электрическим полем): а)  $T = 20 - 21$  °С, б)  $T = 14 - 15$  °С. Кривая 1 – контрольная суспензия (без облучения), кривая 2 – облученная суспензия источником  $^{226}\text{Ra}$  (активность  $A = 2,04$  мКи, доза  $3,5$  Р. Воздействие на суспензию калиброванным импульсным электрическим полем (напряженность поля в суспензии  $1700$  В/см) проводили через 21 час после облучения; кривая 3 – облученная суспензия через 21 час (без электропорации), кривая 3' – без облучения и без электропорации.



Представляется интересным изучение проблемы совместного воздействия химических агентов и ионизирующего излучения. В исходную суспензию добавляли перфторан в концентрации, которая ускоряет процесс гибели клеток после электропорации в исходном растворе в 2 раза. Полученную суспензию облучали  $\gamma$ -излучением источника  $^{226}\text{Ra}$  в течение 2 часов. Затем суспензию оставляли в хранилище на 24 часа. Далее подвергали ее калиброванному импульсному воздействию. Результаты изменения оптической плотности суспензии для источника с активностью  $A = 2,04$  мКи, доза облучения 3,5 Р, температура  $t = 14 - 15$  °С представлены на рис. 2. Активность и доза связаны между собой следующим образом:

$$D = k\gamma \frac{A}{r^2} \Delta t.$$

Из рис. 6 следует, что добавление перфторана или действие  $\gamma$ -излучения, а также их комбинация не изменяли оптическую плотность суспензии. Предварительное действие  $\gamma$ -излучения замедляло гемолиз в результате последующей электропорации. А добавление перфторана в суспензию ускоряло гемолиз в результате электропорации. То есть и  $\gamma$ -излучение, и перфторан по отдельности повлияли на результаты электропорации. Наши опыты показали, что в результате комбинированного воздействия перфторана,  $\gamma$ -излучения и импульсного электрического поля эритроциты в суспензии вели себя так, как будто на них не действовало до этого  $\gamma$ -излучение. Аналогичные эффекты наблюдались и для большей концентрации перфторана.

Неаддитивность скоростей изменения числа эритроцитов наблюдалась и при комбинированном воздействии пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля на эритроциты [3-4].

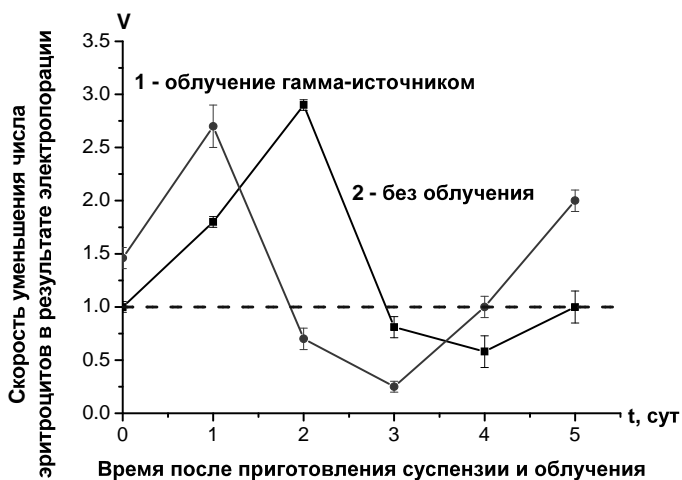


Рис. 5а

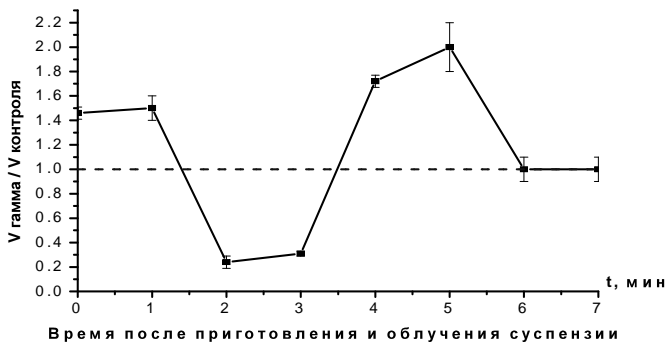


Рис. 5б

Рис. 5. Кинетика изменения состояния мембраны в течение нескольких суток после облучения. Источник  $^{226}\text{Ra}$  с активностью  $A = 9,25$  мКи, доза облучения 17 Р, температура  $t = 20$  °С: а) – скорость уменьшения числа эритроцитов для облученной(1) и необлученной (2) суспензий; за единицу принята скорость для контрольной суспензии в первый день ее приготовления, б) – отношение  $V_{\text{гамма}}/V_{\text{контроля}}$ . Оптическая плотность суспензий до электропорации во всех данных опытах равна 1.

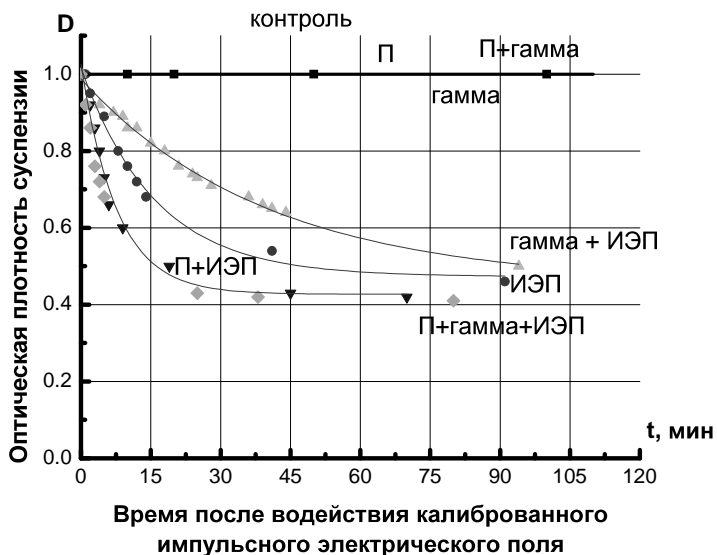


Рис. 6. Кинетические кривые для различных комбинаций перфторана (П),  $\gamma$ -излучения (гамма) и калиброванного импульсного электрического поля (ИЭП). Источник  $^{226}\text{Ra}$  с активностью  $A = 2,04 \text{ мКи}$ , доза облучения  $3,5 \text{ Р}$ , температура  $t = 14 - 15^\circ\text{C}$

### **Комбинированное действие двух электрических импульсов на суспензию эритроцитов**

Исследование воздействия двух импульсов на мембраны клеток имеет два аспекта. Второй импульс можно рассматривать в качестве «диагностического» для возникших последствий от первого импульса. Эта проблема имеет и непосредственно практическое значение, связанное с необходимостью оценки состояния клеток и ткани при дефибрилляции сердца как одним электрическим импульсом, так и несколькими [16-18]. На рис. 7а схематично представлена последовательность двух импульсов, действующих на суспензию эритроцитов.

На рис. 7б представлены результаты опытов по воздействию первого и второго электрического импульса на суспензию эритроцитов. В каждой серии опытов столбец слева показывает скорость уменьшения числа эритроцитов в результате воздействия импульса 1+. Эта скорость принята за единицу. Показано, что скорость уменьшения клеток в результате воздействия второго импульса выше, чем первого, причем, в результате воздействия импульса 2- выше, чем 2+. Средние скорости значительно различаются (для доверительной вероятности 0,95) и составляют:

$$V_{1+} = 1,01 \pm 0,12; \quad V_{2+} = 1,61 \pm 0,96; \quad V_{2-} = 2,66 \pm 1,35.$$

Комбинация первого и второго импульсов приводит к нелинейным явлениям. Количественный анализ наблюдаемых опытных данных приведен в "обсуждении". Приведено решение обратной задачи определения изменения порога электропорации мембраны после воздействия первого импульса. Показано, что порог электрического пробоя в результате воздействия первого импульса снижается на  $7 \pm 5 \%$ .

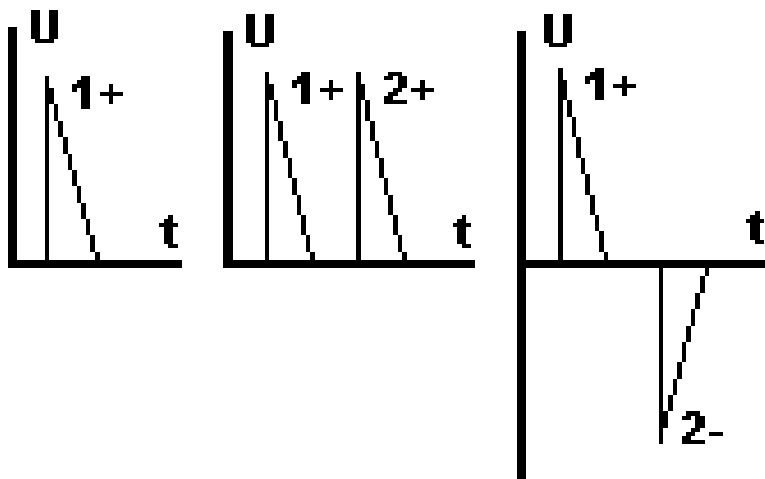


Рис. 7а

## Средняя скорость изменения числа

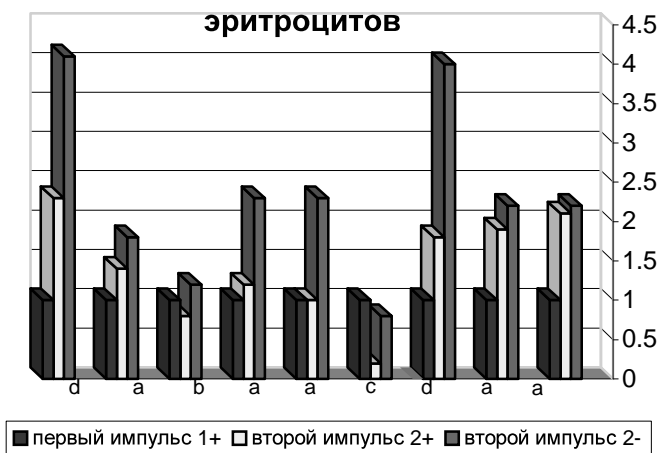


Рис. 7б

Рис. 7. Действие двух импульсов электрического поля на суспензию эритроцитов: а) -схематичное представление одиночного импульса (1+), двух импульсов одной полярности (1+, 2+) и двух импульсов разной полярности (1+, 2-). Цифрой 1 обозначен первый импульс, цифрой 2 – второй импульс, б)-результаты экспериментов. Приведена выборка (19 серий) скоростей уменьшения численности эритроцитов в результате воздействия импульса 1+ (столбец слева), импульса 2+ (столбец в середине), импульса 2- (столбец справа). За единицу принята скорость уменьшения числа эритроцитов в результате воздействия импульса 1+, усреднение проводили за время 10 мин после воздействия импульсного электрического поля

**Исследование воздействия перфторана (ПФ), поверхностно-активных веществ (ПАВ) на суспензию эритроцитов с помощью калиброванной электропорации биологических мембран**

Эксперименты по исследованию особенностей воздействия перфторана на биологические мембраны проводились совместно с сотрудниками НИИ общей реаниматологии (директор института член-корр. РАМН Мороз В.В.).

На рис. 8 представлены результаты опытов, при добавлении ПФ в суспензию за 20 мин до воздействия на нее импульсного электрического поля. Приведены кинетические кривые действия ПФ (концентрация 100 мкл/мл суспензии и 10 мкл/мл суспензии – кривая 1), импульсного ЭП 1+, энергия импульса 230 Дж (кривая 2) и их комбинированного воздействия (кривые 3 и 4).

Из приведённых данных следует, что в первые 5 - 20 минут скорость при комбинированном воздействии ПФ и ЭП  $V_{П+E}$  была не равна сумме скоростей уменьшения численности эритроцитов при воздействии этих двух факторов по отдельности: ПФ  $V_{П}$  и импульсного ЭП  $V_{E}$ . Так при концентрации 100 мкл/мл (кривая 4) выполнялось неравенство:  $V_{П+E} > V_{П} + V_{E}$ . Увеличение скорости происходило в 4 - 6 раз по сравнению с гемолизом в результате воздействия импульсного ЭП. При концентрациях более 20 мкл/мл ПФ уменьшал пороговый потенциал электрического пробоя. Так при концентрации ПФ 20 мкл/мл порог уменьшался на 6%.

Для малых концентраций 10 мкл/мл суспензии наблюдали обратную зависимость. Происходило уменьшение скорости гемолиза при комбинированном воздействии (кривая 3):  $V_{П+E} < V_{П} + V_{E}$ . Замедляющий эффект составлял (12 - 25) %. В диапазоне концентраций 2 - 15 мкл/мл ПФ увеличивал пороговый потенциал электрического пробоя. При действии двух импульсов на систему “суспензия эритроцитов - ПФ” эффективность первого и второго импульсов определялась концентрацией ПФ (рис. 3). При концентрации  $C = 0$  эффективность импульса 2+ в данных опытах была всегда больше эффективности импульса 1+. Для импульса 2- эффективность воздействия была выше эффективности импульса 1+ и статистически преимущественно выше импульса 2+.

При малой концентрации  $C = 10$  мкл/мл эффективность импульса 2+ импульса выше, чем эффективность импульса 1+, а

эффективность импульса 2- практически была равна эффективности импульса 1+. При средних концентрациях  $C = 25$  мкл/мл (область концентраций, где эффект замедления скорости гибели клеток в результате добавления ПФ сменяется эффектом ускорения) эффективность импульса 2+ и 2- ниже, чем эффективность импульса 1+.

При больших концентрациях  $C = 100$  мкл/мл во всех опытах эффективность воздействия импульсов 2+ и 2- была меньше, чем для импульса 1+.

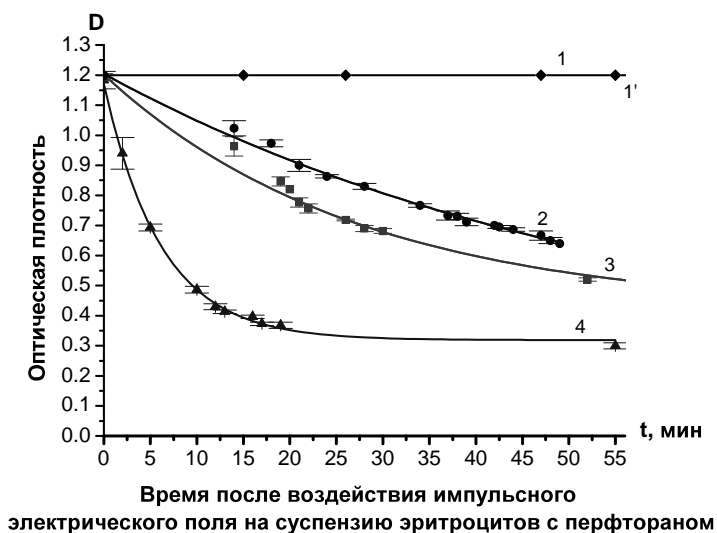


Рис. 8. Кинетические кривые уменьшения численности эритроцитов при воздействии на суспензию крови: 1 - перфторана в концентрации 10, 100 мкл /мл суспензии, 2 - импульсного электрического поля (энергия импульса 230 Дж), 3 - комбинированного воздействия перфторана в концентрации 10 мкл /мл суспензии и импульсного электрического поля (энергия импульса 230 Дж), 4 - комбинированного воздействия перфторана в концентрации 100 мкл /мл суспензии и импульсного электрического поля (энергия импульса 230 Дж).

Замедляющий эффект ПФ был сильнее для воздействия двух импульсов, чем для одного. На рис. 9 приведены данные

относительного изменения скорости уменьшения числа эритроцитов в зависимости от концентрации для одного и для двух импульсов. В области малых концентраций ПФ замедлял гемолиз эритроцитов в результате электрического пробоя мембраны, то есть незначительно уменьшает пороговый потенциал. При концентрации 10 мкл/мл для импульса 1+ замедляющий эффект составил около 10 – 12 %, для двух импульсов 1+, 2+ составил около 30% и для импульсов 1+, 2- около 45 %. Различие относительных скоростей для разных импульсов было статистически значимым.

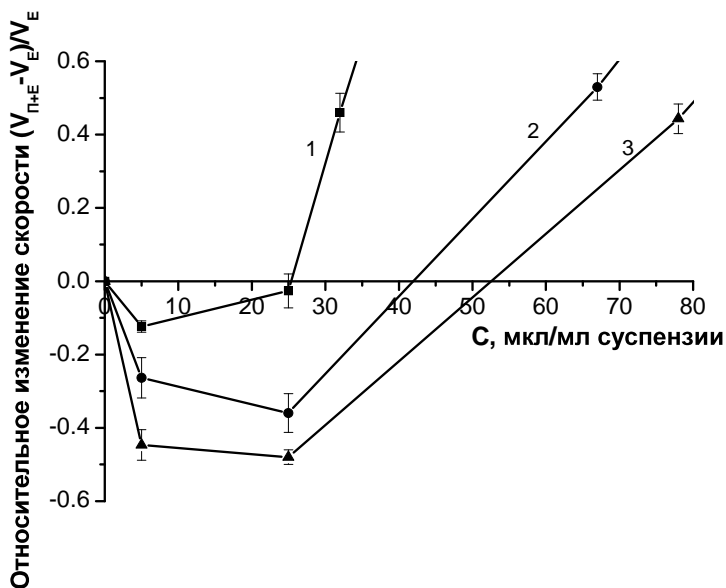


Рис. 9. Зависимость относительного изменения скорости  $(V_{П+Е} - V_E) / V_E$  от концентрации добавленного перфторана для импульса 1+ (кривая 1), для импульсов 1+, 2+ (кривая 2) и для импульсов 1+, 2- (кривая 3).

Эти данные свидетельствуют о неодинаковом изменении эффективного порога электропорации в системе “суспензия



эритроцитов – ПФ” при различном сочетании полярностей импульсов.

Пороговый потенциал электрического пробоя изменялся и при добавлении ПАВ, в частности раствора натриевых солей жирных кислот, в суспензию эритроцитов (рис.10). Для всех указанных импульсов наблюдалось уменьшение порога. Причем, наиболее сильно уменьшение порога происходило для воздействия импульса 2+. Эффективность воздействия импульса 2+ была в 30 - 60 раз, а импульса 2- лишь в 4-20 раз выше, чем для импульса 1+. Здесь наблюдался эффект, обратный случаю воздействию двух импульсов на суспензию без химических добавок (рис. 10).

Средние скорости составляют:

$$V_{1+} = 1,05 \pm 0,22; \quad V_{2+} = 50,87 \pm 13,63; \quad V_{2-} = 11,87 \pm 7,19.$$

За 1 принята скорость уменьшения числа эритроцитов в результате воздействия импульса 1+, усреднение проводили за время 10 мин после воздействия.

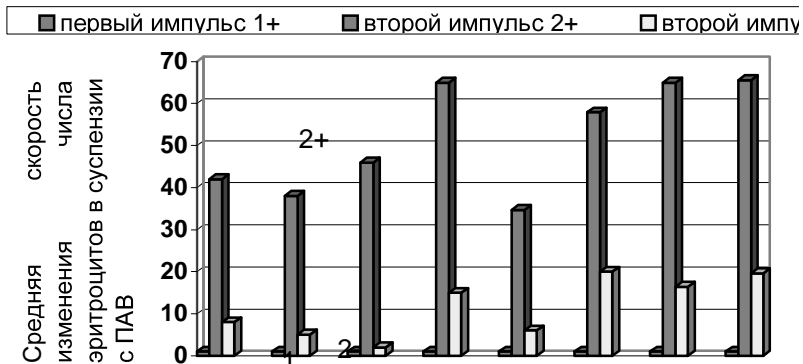


Рис. 10. Статистические данные средних скоростей изменения числа эритроцитов при воздействии импульсного электрического поля (первый и второй импульс) на суспензию эритроцитов с поверхностно-активным веществом (натриевые соли жирных кислот). В каждой серии приведены скорости в результате воздействия импульсов 1+ (слева), 2+ (в середине) и 2- (справа) на суспензию эритроцитов с ПАВ. За единицу принята эффективность воздействия импульсом 1+, усреднение проводили за время 10 мин после воздействия.

Аналогичные эффекты наблюдались при добавлении эфира в суспензию эритроцитов.

## Модель

Экспериментальные данные, показывают, что скорость уменьшения числа клеток при комбинированном воздействии импульсного электрического поля и ряда физико-химических факторов не является суммой скоростей в результате воздействия данных факторов по отдельности. Этот факт может быть положен в основу теоретического анализа возможности применения импульсного электрического поля для диагностики скрытых повреждения биологических мембран. В результате воздействия физико-химических факторов изменяются условия электрического пробоя. Количество пор и их радиус определяются наведенным трансмембранным потенциалом  $\varphi$  и пороговым потенциалом электрического пробоя  $\varphi_{пор}$ .

Наведенная на клетку разность потенциалов  $\varphi_{кл}$  зависит от напряженности электрического поля в растворе  $E$  и радиуса клетки  $r$  [22]:

$$\varphi_{кл} = 1,5Er \cos \theta, \quad (1)$$

где  $\theta$  – угол между вектором  $E$  и радиус-вектором точки наблюдения на сфере.

Непосредственно на мембране разность потенциалов  $\varphi$  будет определяться соотношением электрического сопротивления мембраны  $R_m$  и сопротивлением раствора клетки  $R_p$ .

При этом необходимо учитывать, что перед 1-ым импульсом электрического поля сопротивление мембраны  $R_m$  определяется свойствами исходной мембраны и в наших опытах оно максимально. Для 2-ого импульса (+ или -)  $R_m$  уменьшается за счет появления пор в результате действия импульса 1+. Величина  $R_m$  для второго импульса будет зависеть от количества и радиуса образовавшихся до него пор.

Кроме того, под действием физико-химических факторов (химические агенты, ионизирующее излучение, импульсное ЭП) может измениться порог электрического пробоя  $\varphi_{пор}$ . Как правило, действие этих факторов уменьшает порог (до 20 %). Но в ряде случаев при малой концентрации веществ происходит

незначительное увеличение порога [10]. Изменение порога будет зависеть от энергии импульса и от свойств мембраны.

Выделим поверхность мембраны единичной площади. Разобьем эту площадь на  $N$  одинаковых областей. В каждой области может образоваться пора.  $N$  велико. Образование поры в каждой такой области зависит от собственных свойств этой области. Реальная биологическая мембрана эритроцита уже изначально неоднородна по своим электрохимическим свойствам. Белки, разные сорта липидов, границы межмолекулярных разделов, наличие ионных каналов, аквапор, асимметрия липидов на внутренних и внешних сторонах клетки, наличие дефектов в мембранах многие другие факторы являются причиной этих неоднородностей. Поэтому надо учесть, что в различных участках мембраны потенциалы электрического пробоя могут быть разными. Собственные свойства определяют два параметра электропорации: пороговый потенциал электрического пробоя и радиус поры.

Предполагается, что существуют, по крайней мере, две стадии формирования пор при электропорации: возникновение поры и последующее увеличение ее размеров. Для возникновения пор требуется, чтобы трансмембранный потенциал превысил пороговый потенциал электрического пробоя в данной области мембраны. Другими словами, трансмембранный потенциал определяет на клеточном уровне топологию мембранной поверхности, где может возникнуть электропорация. Увеличение радиуса образовавшейся поры зависит от состояния мембраны и от длительности электрического импульса. В области, где пороговый потенциал меньше, радиус образовавшейся поры будет больше.

Набор элементарных макроскопических областей мембраны  $N$  можно рассматривать как ансамбль Гиббса [25]. Выделим в фазовом пространстве состояний объем  $d\varphi_{пор}$  около точки  $\varphi_{пор}$ . В данный момент времени в этом объеме заключены точки, характеризующие состояния  $dN$  систем ансамбля из их полного числа  $N$ . Тогда предел отношения:

$$\lim_{N \rightarrow \infty} (dN / N) = f_N(\varphi_{пор}, t) d\varphi_{пор} \quad \text{определяет плотность}$$

распределения (функцию статистического распределения) микроскопических состояний систем ансамбля в момент  $t$ . Условие нормировки функции распределения имеет вид

$$\int f_N(\varphi_{пор}, t) d\varphi_{пор} = 1 \quad (\text{интеграл берется по всему фазовому}$$

пространству). Индекс  $N$  у функции  $f_N$  указывает на то, что рассматривается макроскопическая система, состоящая из  $N$  одинаковых областей. В дальнейшем индекс  $N$  будем опускать.

Допустим, что  $\varphi_{пор}$  подчиняется нормальному закону распределения. Тогда для плотности распределения:

$$f(\varphi_{пор}) = 1/(\sigma\sqrt{2\pi}) \exp(-(\varphi_{пор} - \varphi_{пор\text{ ср}})^2/2\sigma^2), \quad (2)$$

где  $\varphi_{пор\text{ ср}}$  – среднее по ансамблю областей  $N$  значение порогового потенциала,  $\sigma$  - среднее квадратическое отклонение. Пороговый потенциал в каждом участке мембраны определяется ее состоянием и ее микропараметрами [22].

При наведенном трансмембранном потенциале  $\varphi$  поры будут образовываться в тех областях, где  $\varphi_{пор} < \varphi$ . Отношение количества участков с порами (результат электропорации) к общему числу участков:

$$F(\varphi_{пор}) = 1/(\sigma\sqrt{2\pi}) \int_{-\infty}^{\varphi_{пор}} \exp(-(\varphi_{пор} - \varphi_{пор\text{ ср}})^2/2\sigma^2) d\varphi_{пор} \quad (3)$$

здесь предел интегрирования  $\varphi_{пор} = \varphi$ .

Доля участков  $dN/N$  с пороговым напряжением от  $\varphi_{пор}$  -  $d\varphi_{пор}$  до  $\varphi_{пор}$ :

$$dN/N = 1/(\sigma\sqrt{2\pi}) \exp(-(\varphi_{пор} - \varphi_{пор\text{ ср}})^2/2\sigma^2) d\varphi_{пор}.$$

Тогда количество пор, способных образоваться при этих условиях:

$$dN = N/(\sigma\sqrt{2\pi}) \exp(-(\varphi_{пор} - \varphi_{пор\text{ ср}})^2/2\sigma^2) d\varphi_{пор}. \quad (4)$$

Величина  $N$  - максимальное число пор, которые могут уместиться на рассматриваемой поверхности мембраны площадью  $1\text{ м}^2$ , при условии, что радиус поры минимален.

Для вычисления площади всех образованных пор необходимо знать их радиусы. Радиус поры можно записать как:

$$r = k / \varphi_{пор}^2. \quad (5)$$

На рис. 11 представлен график для (5) в диапазоне  $\varphi_{пор}$  от 0,2 до 0,7 В.

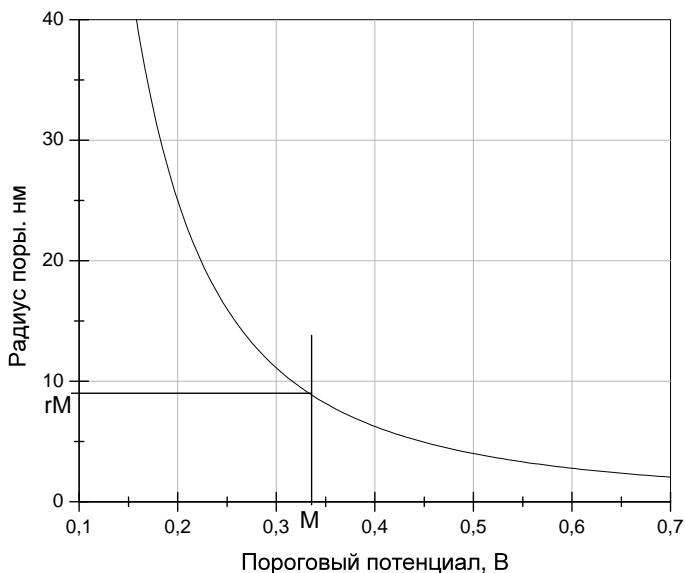


Рис. 11. Зависимость радиуса поры  $r$  ( $\varphi_{пор}$ ).

Найдем площадь  $dS$  пор, вычисляемых по формуле (4):

$$dS = N / (\sigma \sqrt{2\pi}) \exp(-(\varphi_{пор} - \varphi_{пор\text{ ср}})^2 / 2\sigma^2) (k / \varphi_{пор}^2)^2 d\varphi_{пор}. \quad (6)$$

Графически зависимость (6) в диапазоне  $\varphi_{пор}$  от 0,2 до 0,55 В представлена на рис. 6.

Тогда площадь всех пор, образованных на одном квадратном метре поверхности:

$$S / S_0 = N / (\sigma \sqrt{2\pi}) \int_{-\infty}^{\varphi_{пор}} \exp(-(\varphi_{пор} - \varphi_{пор\text{ ср}})^2 / 2\sigma^2) (k / \varphi_{пор}^2)^2 d\varphi_{пор}. \quad (7)$$

Для расчета суммарной площади образовавшихся пор необходимо вычислить интеграл (7). Но до какого предела интегрировать? Другими словами, как вычислить наведенный потенциал  $\varphi$ ? Рассмотрим эквивалентную электрическую схему клетки для активных сопротивлений участков мембраны и

цитоплазмы. Схема будет включать в себя сопротивление мембраны  $R_m$  с параллельно включенными сопротивлениями пор, образованных в результате электропорации на поверхности клетки со стороны анода. Такая же цепь будет на противоположной поверхности клетки со стороны катода. Между ними последовательно включено сопротивление цитоплазмы  $R_p$ . (Считается, что на полюсах клетки пор нет (1)).

Тогда трансмембранный потенциал вычисляется по формуле:

$$\varphi = \varphi_{кл} / (2 + (L\rho_m / l\rho_p) (1 + (\rho_m / \rho_p) S / S_0)), \quad (8)$$

где  $\varphi_{кл}$  – наведенный на клетку потенциал (1),  $\rho_m$  – удельное сопротивление мембраны,  $\rho_p$  – удельное сопротивление раствора,  $L$  – диаметр клетки,  $l$  – толщина мембраны,  $S_0$  – площадь половины поверхности клетки,  $S$  – площадь всех пор на данной поверхности.

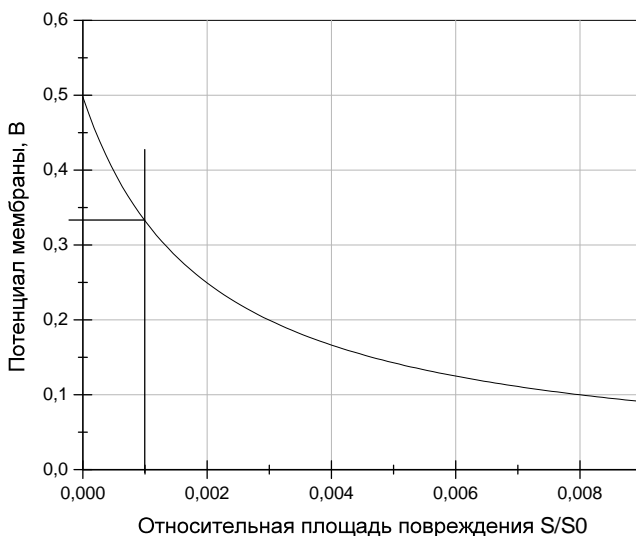
Считаем, что для первого импульса  $S = 0$ . Тогда для параметров  $L/l = 10^3$ ,  $\rho_m/\rho_p = 10^5$  получаем, что  $\varphi \approx \varphi_{кл} / 2$ .

В результате действия первого импульса образуются поры, то есть изменится наведенный трансмембранный потенциал  $\varphi'$ , в зависимости от площади пор, образованных первым импульсом, рис. 12.

Предыстория состояния мембраны перед вторым импульсом не такая, как перед первым. Мембрана уже находится в другом состоянии, при этом может уменьшиться средний порог пробоя  $\varphi'_{пор\ ср}$ , что должно быть учтено в формуле (7). Относительное изменение среднего порога можно описать функцией трансмембранного потенциала  $\varphi$ :

$$\Delta\varphi_{пор\ ср} / \varphi_{пор\ ср} = q\varphi^2. \quad (9)$$

Коэффициент  $q$  зависит от свойств мембраны. На рис. 14а представлены кривые изменения порогового напряжения в зависимости от трансмембранного потенциала для трех значений  $q$ . На рис. 13 приведены соответствующие кривые для разных пороговых напряжений. Кривая 2 соответствует уменьшению порога на 9,28%. Принимая во внимание измененные значения  $\varphi'$  (8) и  $\varphi'_{пор\ ср}$  (9), можно по формуле (7) найти площадь пор, образованных от второго импульса.



*Рис. 12. Зависимость  $\varphi (S/S_0)$ . Если в результате первого импульса относительная площадь повреждения равна  $S/S_0 = 0,001$ , то потенциал мембраны будет равен лишь  $\varphi = 0,33$  В, несмотря на то, что наведенный на клетку потенциал в данном случае равен  $\varphi_{кл} = 1$  В.*

Рассмотрим эффект изменения скорости уменьшения численности эритроцитов при изменении симметрии электрического воздействия, то есть для импульсов 2+ и 2-, Поверхностный заряд эритроцита около  $0,03$  Кл/м<sup>2</sup> [24]. В этом случае на разных сторонах клетки трансмембранный потенциал изменится на величину  $\pm \zeta$ .

Результаты расчетов, выполненных согласно модели, представлены в табл.1 (Приложение I). Для расчета выбраны следующие параметры:  $N = 5 \cdot 10^{17}$  1/м<sup>2</sup>,  $L/l = 10^3$ ,  $\rho_m/\rho_p = 10^5$ ,  $\zeta = -0,05$  В,  $\varphi_{кл} = 1$  В, исходное значение  $\varphi_{пор\ ср} = 1$  В,  $\sigma = 0,13$  В,  $k = 1$  В<sup>2</sup>\*м. Со стороны поверхности клетки, повернутой к катоду, результирующий потенциал:

$$\varphi_k = -|\varphi_{кл}/2| - |\zeta|, \quad (10)$$

со стороны анода:

$$\varphi_a = |\varphi_{кл}/2| - |\zeta|. \quad (11)$$

Модель позволяет решить две задачи: 1. Сравнить результат электропорации на разных сторонах клетки при различных комбинациях импульсов. 2. Решить обратную задачу: определить изменение  $\Delta\varphi_{пор\ ср}$  на разных сторонах клетки исходя из данных эксперимента.

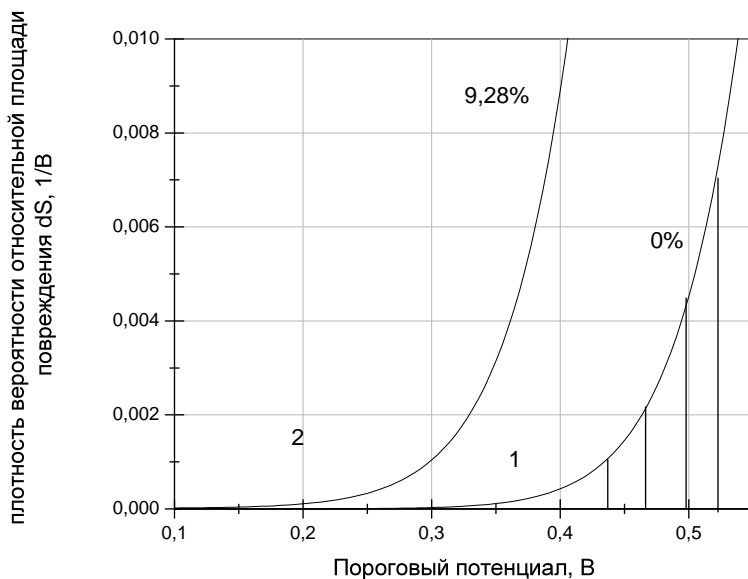


Рис. 13. Зависимость  $dS$  ( $\varphi_{пор}$ ) для двух значений изменения порогового потенциала: 1- 0%, (исходная мембрана), 2- - 9,28% (мембрана после воздействия электрического импульса). Заштрихованная область – интеграл под кривой равняется суммарной площади образованных пор на  $1\text{ м}^2$  поверхности в результате воздействия электрического импульса, когда результирующий потенциал мембраны 0,55 В.



Покажем решение первой задачи. Скорость уменьшения числа эритроцитов связана с суммарной площадью пор на всей поверхности клетки. Тогда эффективность действия импульса выражается суммарной площадью пор. Сравним эффективность действия следующих комбинаций импульсов:

$$1) 1+, 2+ \text{ и } 1+, 2-, \quad S_{1+, 2-} / S_{1+, 2+}$$

$$2) 2+ \text{ и } 1+, \quad S_{2+} / S_{1+}$$

$$3) 2- \text{ и } 1+, \quad S_{2-} / S_{1+}$$

В табл. 1, Приложение I (столбец 5) представлены значения относительной площади образовавшихся пор для разных условий воздействия. Данные табл.1 показывают, что результат действия двух импульсов 1+, 2+ и 1+,2- не одинаков. Обозначим левую поверхность «полусферы» эритроцита  $L$ , а правую  $R$ . При воздействии импульсом 1+ результирующий потенциал на поверхности  $L$  равняется +0,45 В, на поверхности  $R$  составляет -0,55 В. Относительная площадь возникших при этом пор на поверхности  $L$  примерно в 10 раз меньше, чем на поверхности  $R$ . Согласно модели, на поверхностях клетки  $L$  и  $R$  возникнут поры с разными радиусами и с соответствующим статистическим весом.

На поверхности  $L$  согласно расчетам возникнет 4 поры с радиусом 7 - 9 нм, 88 пор по 5 - 6 нм. В то же время на поверхности  $R$  образуются такие же поры и к ним еще добавятся 247 пор с радиусом 4 - 5 нм, 790 пор с радиусом менее 4 нм. Таким образом, на поверхности с большим по модулю результирующим трансмембранным потенциалом количество мелких пор будет в 500 - 700 раз больше.

После действия импульса 2+ на поверхностях  $L$  и  $R$  увеличится количество крупных пор, а количество мелких почти не изменится. После действия импульса 2- на поверхности  $L$  увеличится количество и крупных, и мелких пор. На поверхности  $R$  увеличится только количество крупных пор.

Решим обратную задачу: оценим изменение среднего порогового потенциала  $\Delta\varphi_{пор\ ср}$  на разных сторонах клетки после действия первого импульса. В табл. 1 представлены расчетные данные для  $\Delta\varphi_{пор\ ср} = -5,8\%$  (для  $\varphi = 0,45$  В) и  $\Delta\varphi_{пор\ ср} = -8,8\%$  (для  $\varphi = 0,55$  В). Аналогичные расчеты были выполнены для других значений  $\Delta\varphi_{пор\ ср}$  (табл.2). Для решения обратной задачи сравним эффективность действия импульсов в эксперименте (рис.1) и в математической модели (формулы 1 – 11, табл.2). Вариант, представленный в столбце 1 не наблюдался в наших

опытах (рис.1). Это означает, что вероятность события того, что в результате воздействия электрического импульса  $\varphi_{пор\ ср} = const$ , почти равна нулю. Также мала вероятность того, что изменение  $\varphi_{пор\ ср}$  превышает 9 % (для 0,45 В) и 14 % (для 0,55 В). Расчетные данные, представленные в столбце 4, хорошо описывают экспериментально наблюдаемые факты *a*: скорость уменьшения численности эритроцитов для импульсов 1+, 2- была в 1,2...1,5 раза выше, чем для импульсов 1+, 2+, а эффективность импульса 2- была в 1,2...2 раза выше, чем для импульса 2+. Реже встречаются варианты, представленные в столбцах 2, 3, 5, соответствующие экспериментальным данным *c, b, d*.

На рис. 14б приведена гистограмма опытных данных и соответствующая кривая нормального закона распределения. Таким образом математическое ожидание для величины  $\Delta\varphi_{пор\ ср} / \varphi_{пор\ ср}$  составляет:

$\mu = 5,05 \pm 0,06$  (%), среднее квадратическое отклонение  $\sigma = 1,87 \pm 0,09$ (%).

Считая, что  $\mu = 5,05$  % при  $\varphi = 0,45$  В, рассчитаем среднее значение  $q$ :

$$q = (\Delta\varphi_{пор\ ср} / \varphi_{пор\ ср}) / \varphi^2.$$

В результате  $q = - 24,9$  % / В<sup>2</sup>. Тогда изменение среднего порогового потенциала электрического пробоя в результате воздействия электрического импульса на мембрану:

$$\Delta\varphi_{пор\ ср} / \varphi_{пор\ ср} = - 24,9 * \varphi^2.$$

На рис. 14 а жирной линией показана данная функция.

Таким образом, решена обратная задача вычисления изменения среднего порогового потенциала мембраны в результате воздействия электрического импульса. По той же схеме можно оценить изменение порогового потенциала и при воздействии других физико-химических факторов.

Для того, чтобы проанализировать эффекты действия ПФ, других химических агентов на процесс электропорации биологической мембраны надо принять во внимание электрокинетические явления в суспензии. Если поверхностные заряды частицы ПФ и эритроцита отличаются на 20%, то разность скоростей их движения под действием импульсного электрического поля составит:

$$\Delta V = 2\varepsilon * \varepsilon_0 * E_{ср} * \zeta * 0,2 / (3 * \eta). \quad (12)$$

Для следующих параметров:  $\varepsilon = 80$ ,  $\varepsilon_0 = 8,85 * 10^{-12}$ ,  $E_{ср} = 1,7 * 10^5 * \tau_1 / \tau$ ,  $\zeta = 0,165$  В,  $\eta = 0,002$  Па\*с, время нарастания импульса  $\tau_1 = 1$  мс, длительность импульса  $\tau = 6$  мс для

эритроцита  $\zeta = -0,165$  В, величина  $\Delta V = 0,22 \cdot 10^{-3}$  м/с. За время длительности импульса частицы ПФ, находящиеся на расстоянии  $\Delta X = \Delta V \cdot t$ , окажутся у поверхности эритроцита. Величина  $\Delta X = 1320$  нм. Для концентрации ПФ 10 мкл/мл среднее расстояние между его частицами составляет около 450 нм. То есть у поверхности эритроцита окажется 2-3 слоя частиц ПФ. Это означает, что 3...5 % одной поверхности  $R$  эритроцита будет покрыто ПФ в результате воздействия электрического импульса.

Для концентрации 100 мкл/мл среднее расстояние между частицами ПФ составляет около 200 нм, то есть у поверхности эритроцита окажутся 5 - 6 слоев ПФ. В результате воздействия электрического импульса будет покрыто ПФ уже 35 – 50 % поверхности.

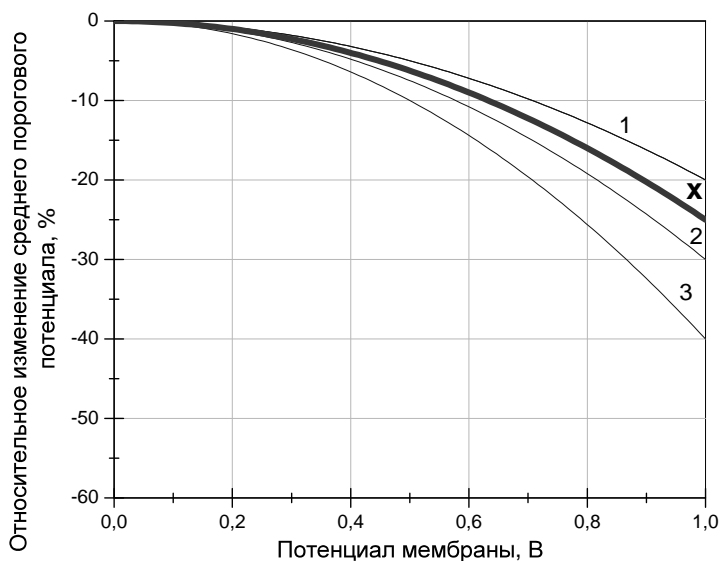


Рис. 14а

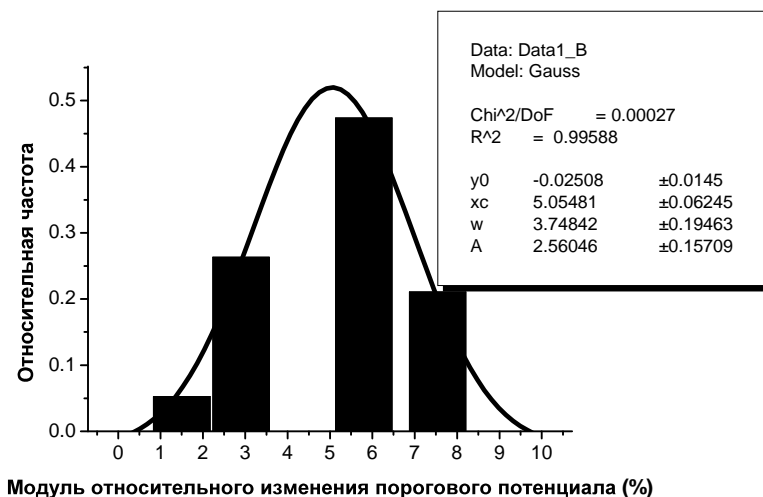


Рис. 14б

Рис. 14. Относительное изменение среднего порогового потенциала  $\Delta\varphi_{\text{порср}}/\varphi_{\text{пор ср}}$  при  $\varphi_{\text{пор ср}} = 1$  В. (а) Функциональная зависимость в зависимости от потенциала мембраны  $\varphi$  для различных  $q$  (1-  $q = 20$ , 2-  $q = 30$ , 3-  $q = 40$ ), красной жирной линией ( $x$ ) показана кривая для вычисленного значения  $q = -24,9$ . (б) Гистограмма относительных частот изменения порогового потенциала (получено при сопоставлении теоретических и экспериментальных данных для  $\varphi = 0,45$  В). Для значений  $\Delta\varphi_{\text{порср}}/\varphi_{\text{пор ср}} < 0,5\%$  и  $\Delta\varphi_{\text{порср}}/\varphi_{\text{пор ср}} > 9\%$  частота события была равна нулю (экспериментально не наблюдалось). В верхней части рисунка указаны параметры нормального закона распределения, описывающего статистические данные.

В зависимости от концентрации перфторан может оказывать как укрепляющее, так и разрушающее действие на мембрану без импульсного электрического воздействия (рис. 8, 9). Под действием импульсного электрического поля может измениться локальная концентрация ПФ около мембраны. Это повлияет на кинетику образования пор во время действия

первого импульса. Причем при малых концентрациях растворение перфторорганических соединений может укрепить мембрану за счет встраивания в ее дефекты. При этом повышается пороговый потенциал и уменьшается радиус пор. Таким образом, суммарная площадь пор и соответственно скорость гемолиза могут уменьшиться. При больших концентрациях встраивание ПФ в мембрану увеличивает размер образуемых пор. Это объясняет увеличение в 5 - 6 раз скорости гемолиза.

Локальное изменение концентрации ПФ в результате действия первого импульса влияет на условия действия второго. Действительно, диаметр частицы ПФ примерно в 10 раз больше толщины мембраны. Если (при больших концентрациях) перед вторым импульсом около 20-50 % поверхности мембраны эритроцита окажется закрытой ПФ, то напряженность электрического поля в этих участках снизится в 10 раз. В этих участках мембраны электропорация не возникнет. Это первая причина уменьшения эффективности действия второго импульса. Другая причина - уменьшение наведенного трансмембранного потенциала в результате образовавшихся пор от первого импульса.

При анализе эффективности электропорации комбинированного действия факторов надо учесть направленный характер движения частиц и молекул в суспензии. В результате этого лишь только половина поверхности эритроцита будет испытывать их влияние. Особенно ярко результаты неодинакового воздействия импульсов 1+, 2+ и 1+, 2- проявлялись при добавлении в суспензию эритроцитов ПАВ (рис. 10). Аналогичные результаты наблюдались и при добавлении в суспензию эфира. Если эффективность воздействия на суспензию без добавок была больше для импульсов 1+, 2-, то в случае добавления ПАВ, эфира или ПФ более эффективной была последовательность 1+, 2+.

В табл. 3 (Приложение 1) представлены результаты расчетов для малой концентрации ПФ в суспензии,  $C = 10$  мкл/мл. По эти результатам вычислим суммарную площадь пор на обеих поверхностях эритроцита при действии различных импульсов. Сравним эффективность действия импульсов на суспензию с ПФ и без него (в скобках указан эффект замедления гемолиза):

$$\begin{aligned} S_{1+, ПФ} / S_{1+} &= 0,906 && (-10\%), \\ S_{2+, ПФ} / S_{2+} &= 0,85 && (-15\%), \end{aligned}$$

$$S_{2-,ПФ}/S_{2-} = 0,796 \quad (-20\%).$$

Эти данные согласуются с экспериментальными результатами (рис. 8,9). Действительно, согласно модели закрепляющий эффект ПФ для действия двух импульсов больше, чем одного. Этот эффект для второго импульса больше, чем для первого, причем, для импульса 2- больше, чем для импульса 2+.

В рамках модели была решена и обратная задача: выяснение степени влияния ПФ на пороговый потенциал электрического пробоя. Согласно модели перед воздействием первого импульса  $\varphi_{пор ср}$  увеличивается на 0,3 %. Это может быть связано с проникновением ПФ в мембрану только лишь за счет теплового движения. Эффективность этого процесса незначительная и одинакова с обеих сторон эритроцита. При действии первого импульса «залечивающее» действие ПФ уменьшает по модулю изменение  $\varphi_{пор ср}$  на 0,8 % на поверхности  $L$ . Поверхность  $R$  покрывалась ПФ, его локальная концентрация там повышалась в 2 - 3 раза и составляла около 20 - 30 мкп/мл. Эффект закрепления почти не наблюдался (по модели лишь только на 0,3 %). Уменьшение закрепляющего эффекта при таком изменении локальной концентрации ПФ хорошо количественно согласуется с результатами экспериментов (рис. 8, 9).

В модели анализируется возможность электропорации среднестатистического эритроцита (среднего возраста). Для описания кинетических кривых надо принять во внимание разный  $\varphi_{пор ср}$  у эритроцитов различного возраста: у старых средний порог пробоя снижается, у молодых растёт. При этом в каждой статистической группе эритроцитов разного возраста  $\varphi_{пор}$  будет подчиняться нормальному закону распределения. Таким образом, предложенный подход можно применить ко всему ансамблю эритроцитов.

Мы рассматриваем сферическую клетку, хотя в реальности эритроцит имеет форму диска. В ансамбле их радиус подчиняется нормальному закону распределения. В модели считается, что за время между первым и вторым импульсом положение клетки в пространстве не изменилось. Это позволяет в наших рассуждениях зафиксировать поверхности эритроцита  $L$  и  $R$  со стороны катода и анода.

Модель позволяет учесть распределение трансмембранного потенциала по закону косинуса (1), учесть неодинаковое изменение порогового потенциала по поверхности

клетки после воздействия первого импульса и тем самым более точно рассчитать распределение пор по поверхности и их радиус.

При расчетах электрокинетических явлений важно учесть движения не только макромолекул и частиц, но и ионов, формирующих диффузионный слой. В результате действия первого импульса дзета-потенциал изменится с двух сторон клетки по-разному. Это повлияет на асимметрию результирующего потенциала при действии второго импульса. Поверхностный потенциал может также измениться под воздействием и физико-химических факторов. При анализе величины результирующего потенциала мембраны и порогового потенциала пробоя надо учитывать и дипольный потенциал мембраны. Векторный характер внешнего электрического поля и собственного поля мембраны (характеризующегося поверхностным, дипольным и трансмембранным потенциалами), может показать отдельно влияние и модуля потенциала, и его знака на процесс электропорации.

Изучение изменения порога электрического пробоя затруднено отсутствием прямых методов регистрации пор в процессе электропорации. Как правило, получают информацию об образовании пор косвенно, например, по интенсивности транспорта веществ в клетку (например, красителей). Измеряя интегральный эффект, можно получать информацию о «квазипороге» результирующего многостадийного процесса, а не непосредственно о пороге электрического пробоя. В этом случае должны быть сформулированы и решены соответствующие обратные задачи.

С помощью данной модели проведен анализ результатов действия  $\gamma$ -излучения на эритроциты. В результате действия  $\gamma$ -излучения происходит как непосредственное воздействие фотонов и вторичных электронов на мембрану на клетки, так и опосредованное воздействие продуктами радиолиза воды. В результате в мембране образуются активные центры, в которых порог электропорации будет существенно снижен. Оценки показывают, что при дозе 1 – 20 Р число центров повреждения в мембране в результате воздействия фотонов и продуктов радиолиза воды составит не более 100 на эритроцит. То-есть поврежденные участки мембраны эритроцита можно рассматривать как новый статистический ансамбль, у которого будут другими средний пороговый потенциал и среднее квадратическое отклонение.

Таким образом, в мембране возникают два статистических ансамбля. На рис. 15 приведены зависимости (1) для двух ансамблей.

В данном случае  $\varphi_{пор\ ср\ \gamma} = 0,4\ В$ ,  $\sigma_{\gamma} = 0,02\ В$ ,  $N_{\gamma} = N \cdot 10^{-5}\ м^2$ . Площадь под суммарным графиком (и соответственно скорость уменьшения числа эритроцитов) возрастет 1,5 – 2 раза. Сравнение теоретических расчетов с экспериментальными данными (рис. 2) позволяет вывод, что  $\varphi_{пор\ ср\ \gamma} = 0,4\ В$ ,  $\sigma_{\gamma} = 0,01 - 0,02\ В$ .

Возможен и другой эффект при действии  $\gamma$ -излучения. Известно, что из-за изменения связей в сиаловой кислоте в результате воздействия  $\gamma$ -излучения уменьшается поверхностный заряд эритроцитов [1]. Уменьшение поверхностного потенциала снижает эффективность действия электрического импульса на мембрану. Этим может быть объяснен тот экспериментальный факт, что уменьшение количества эритроцитов, которые подвергались воздействию  $\gamma$ -излучения, а затем электропорации, происходило со скоростью в 1,5 – 2 раза меньшей, чем у необлученных эритроцитов (рис. 5). Расчеты по формуле 1, рис. 15 показывают, что суммарная площадь пор на сторонах  $L$  и  $R$  при  $\zeta = 0$  (то есть  $\varphi_L = \varphi_R = 0,5\ В$ ) в 1,6 раз меньше, чем при  $\zeta = 0,05\ В$  (то есть  $\varphi_L = 0,45\ В$ ,  $\varphi_R = 0,55\ В$ ).

Перфторан увеличивает по модулю поверхностный заряд. Поэтому при добавлении перфторана замедление процесса из-за уменьшения поверхностного заряда не должно происходить. Это согласуется с опытными данными.

Введем коэффициент  $K_{\zeta}$ , который характеризует относительное уменьшение суммарной площади пор за счет уменьшения  $\zeta$  - потенциала.

Введем коэффициент  $K_{пор}$ , характеризующий относительное увеличение суммарной площади пор в мембране за счет уменьшения порогового потенциала в локальных участках мембраны.



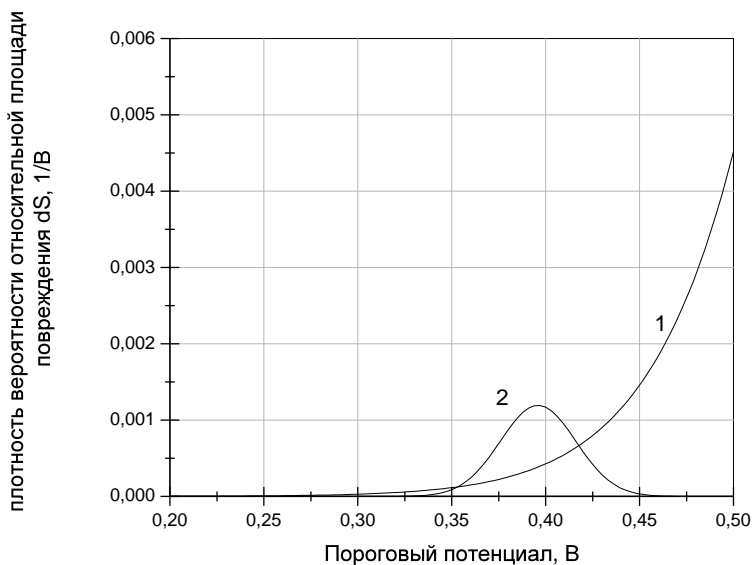


Рис. 15. Два статистических ансамбля: 1- неповрежденная поверхность, 2 – в результате воздействия  $\gamma$ -излучения.

В результате относительное изменение суммарной площади пор, возникающих в результате электропорации, облученной и контрольной суспензий, будет определяться величиной отношения этих коэффициентов:  $K = K_{\zeta} \cdot K_{пор}$ . Величина дозы, при которой замедляющий эффект переходит в ускоряющий, уменьшается при увеличении температуры.

Явления, наблюдаемые в течение нескольких суток после создания суспензии и ее облучения  $\gamma$ -излучением (рис. 3, 5) могут быть связаны с уменьшением поверхностного заряда эритроцитов, причем скорость уменьшения после облучения выше, чем для контрольной необлученной суспензии.

При анализе особенностей воздействия пучка электронов надо принимать во внимание и то, что электроны не только ионизируют вещество, но и создают локальные неоднородные

электрические поля в биологической мембране, что может создавать дополнительные активные центры в мембране, в которых пороговый потенциал электропорации будет уменьшаться. Активные центры будут способствовать развитию процессов окисления в результате воздействия ускоренных электронов. Возможно поглощение электронов в среде приводит к появлению объемного заряда, что может повлиять на электрическое состояние эритроцитов.

### **Вывод:**

На основе данных исследований можно сделать заключение, что электропорация может быть использована как эффективный метод экспресс-диагностики повреждений биологических мембран в результате воздействия физико-химических факторов на эритроциты.

Авторы выражают благодарность профессору физического факультета МГУ Б.С. Ишханову, директору НИИ общей реаниматологии чл.-корр. РАМН В.В. Морозу и вед. научн. сотр. М.С. Богушевич за обсуждение результатов работы, а также научн. сотр. НИИЯФ МГУ В.И. Смирнову, преподавателю ММА А.А. Долгополовой и студентке физического факультета МГУ М.А. Назаровой за помощь в проведении экспериментов.

Приложение 1

Таблица 1. Влияние асимметрии электрического воздействия на площадь пор в результате электропорации

1	2	3	4	5
$\varphi_{кл} / 2 \pm \zeta$ , В – поданный на мембрану потенциал, с учетом $\zeta$	$\varphi$ , В – результир ующий потенциал	$\Delta\varphi_{порер} / 1$ , % -изменение среднего порогового потенциала	$\varphi_{пор ср}$ , В	$S / S_0$ - доля площади всех пор на поверхности в результате воздействия
<b>Два импульса: 1+, 2+</b>				
<b>L</b>				
<b>поверхность</b> Первый импульс 0,45 В	0,45	0	1	$5,8 \cdot 10^{-5}$
Второй импульс 0,45 В	0,43	-5,8%	0,942	$2,6 \cdot 10^{-4}$
<b>R</b>				
<b>поверхность</b> Первый импульс 0,55 В	0,55	0	1	$5,9 \cdot 10^{-4}$
Второй импульс 0,55 В	0,43	-8,8%	0,912	$6,8 \cdot 10^{-4}$
<b>Два импульса 1+, 2-</b>				
<b>L</b>				
<b>поверхность</b> Первый импульс 0,45 В	0,45	0	1	$5,8 \cdot 10^{-5}$
Второй импульс 0,55 В	0,53	-5,8%	0,942	$2 \cdot 10^{-3}$
<b>R</b>				
<b>поверхность</b> Первый импульс 0,55 В	0,55	0	1	$5,9 \cdot 10^{-4}$
Второй импульс 0,45 В	0,33	-8,8%	0,912	$7,6 \cdot 10^{-5}$

**Таблица 2. Расчетные данные соотношения суммарных площадей пор при воздействии разными импульсами для нескольких значений изменения порогового потенциала после первого импульса. Сравнение с экспериментальными данными**

	1	2	3	4	5	6	7
$\Delta \varphi_{пор\ ср} / 1, \%$ для 0,45 В для 0,55 В	0 0	1,5 2,2	2,9 4,4	5,8 8,8	7,54 11,44	9,28, 14,08	12,18 18,48
$S_{1+, 2-} / S_{1+, 2+}$	1,43	1,6	1,72	1,77	1,57	1,19	0,98
$S_{2+} / S_{1+}$	0,1	0,21	0,29	1,435	3	7	19,7
$S_{2-} / S_{1+}$	0,6	0,935	1,41	3,25	5,3	8,6	19,36
Сравнение с экспериментальными данными на рис. 7б	<i>не набл юдаль ось</i>	<i>с</i>	<i>б</i>	<i>а</i>	<i>д</i>	<i>не наблюдалось</i>	

**Таблица 3. Влияние асимметрии электрического воздействия на площадь пор в результате электропорации при добавлении в суспензию эритроцитов ПФ С = 10 мкл/мл**

1	2	3	4	5	6
$\varphi_{кл} / 2 \pm \zeta, В$ – поданный на мембрану потенциал, с учетом $\zeta$	$\varphi, В$ – результрующий потенциал	$\Delta \varphi_{пор\ ср} / 1, \%$ – изменение среднего порогового потенциала	$\varphi_{пор\ ср}, В$	Доля открытой (без перфты) поверх	$S/S_0$ – доля площади всех пор на Поверхности в результате Воздействия
<b>Два импульса 1+, 2+</b>					
<b>L</b> поверхность Первый импульс 0,45 В Второй импульс 0,45 В	0,45  0,43	+0,3%  -5,8+0,8 = -5%	1,003  0,95	0,99  0,99	5,2*10-5  1,96*10-4

<i>R</i> поверхность					
Первый импульс	0,55	+0,3%	1,003	0,99	5,4*10 <sup>-4</sup>
0,55 В					
Второй импульс	0,43	-8,8+0,3 = -8,5%	0,915	0,97	5,96*10 <sup>-4</sup>
0,55 В					
<b><i>Два импульса 1+, 2-</i></b>					
<i>L</i> поверхность					
Первый импульс	0,45	+0,3%	1,003	0,99	5,2*10 <sup>-5</sup>
0,45 В	0,53	-5,8+0,8 = -5%	0,95	0,99	1,6*10 <sup>-3</sup>
Второй импульс					
0,55 В					
<i>R</i> поверхность					
Первый импульс	0,55	+0,3%	1,003	0,99	5,4*10 <sup>-4</sup>
0,55 В					
Второй импульс	0,33	-8,8+0,3 = -8,5%	0,915	0,97	6,6*10 <sup>-5</sup>
0,45 В					

## Список литературы

1. Zima G.V., and V.I. Dreval. 2000. The effect of ionizing radiation in a wide dosage range on the structural-functional characteristics of the protein and lipid components of erythrocyte plasma membranes. *Radiats. Biol. Radioecol.* 40:261-265.
2. Petcu, I., D. Fologea, and M. Radu 1997. Kinetics of electroinduced pores as a probe of membrane modification produced by ionizing radiation. *Bioelectrochem Bioenerg.* 2: 179 – 185.
3. Козлова Е.К., Черняев А.П., Алексеева П.Ю., Черныш А.М. Влияние ионизирующего излучения на электропорацию мембран эритроцитов. Труды V межвузовской научной школы молодых специалистов «Концентрированные потоки энергии в космической технике, электронике, экологии и медицине», НИИЯФ МГУ. 2004. С. 105 – 109.
4. Gehl, J. 2003. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol. Scand.* 177:437-447.
5. Golzio, M., J. Teissie, and M.P. Rols. 2001. Control by membrane order of voltage-induced permeabilization, loading and gene transfer in mammalian cells. *Bioelectrochemistry* 53:25-34.
6. Vanbever R. 1999. Transdermal administration of drugs by electroporation. *Bull. Mem. Acad. R Med. Belg.* 154:327-333.
7. Canatella, P.J., J.F. Karr, J.A. Petros, and M. R. Prausnitz. 2001. Quantitative study of electroporation-mediated molecular uptake and cell viability. *Biophys. J.* 80:755-764.
8. Kinoshita, K., and T. Y. Tsong. 1979. Voltage-induced conductance in human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 554:479-497.
9. Koronkiewicz S., Kalinowski S., and K. Bryl. 2001. Changes of structural and dynamic properties of model lipid membranes induced by alpha-tocopherol: implication to the membrane stabilization under external electric field. *Biochim. Biophys. Acta.* 1510:300-3
10. Tung, L., G.C. Troiano, V. Sharma, R.M. Raphael, and K.J. Stebe. 1999. Changes in electroporation thresholds of lipid

- membranes by surfactants and peptides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 888: 249-265.
11. Козлова Е.К., Черняев А.П., Шведун В.И., Черныш А.М., Фомина У.А., Шаракшанэ А.С. Особенности комбинированного действия пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля на биологические клетки.// Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2004. № 5- 6. С. 65 – 74.
  12. Neamtu, S, V.V. Morariu, I. Turcu, A.H.Popescu, and L.I. Soraescu 1999. Pore resealing inactivation in electroporated erythrocyte membrane irradiated with electrons. *Bioelectrochem. Bioenerg* V.48: 441 – 445
  13. Козлова Е.К., Черняев А.П., Черныш А.М., Шведун В.И., Фомина У.А., Шаракшанэ А.С., Ермаков А.Н. 2003. Действие пучка ускоренных электронов на динамику электропорации биологических мембран. //Медицинская физика. 17: 50 – 56.
  14. Мороз В.В., Козлова Е.К., Богушевич М.С., Алексеева П.Ю., Черныш А.М. Эффективность дефибриллирующих импульсов в модельном эксперименте. Тезисы докладов.Третий Российский Конгресс по патофизиологии (с международным участием). М. 2004.С. 201.
  15. Мороз В.В., Козлова Е.К., Богушевич М.С., Алексеева П.Ю., Черныш А.М. Действие перфторана на модифицированную мембрану эритроцитов. Материалы конференции «Реаниматология. Ее роль в современной медицине». М. 2004. С. 151 – 154.
  16. Ashihara, T., T. Yao, T. Namba, M. Ito, T. Ikeda, A. Kawase, S. Toda, T. Suzuki, M. Inagaki, M. Sugi, M. Kinoshita, and K. Nakazawa. 2001. Electroporation in a model of cardiac defibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 12:1393-1403.
  17. Tung, L., O. Tovar, M. Neunlist, S. K. Jain, and R. J. O'Neill. 1995. Effects of strong electrical shocks on cardiac muscle tissue. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 720:160-175.
  18. Walcott, G.P., C.R. Killingsworth, and R.E. Ideker. 2003. Do clinically relevant transthoracic defibrillation energies cause myocardial damage and dysfunction? *Resuscitation* 59:59-70.

19. Chernomordik, L. V., S. I. Sukharev, I. G. Abidor, and Y. A. Chizmadzhev. 1983. Breakdown of lipid bilayer membranes in an electric field. *Biochim. Biophys. Acta.* 736:203-213.
20. Chernomordik, L. V., and Y. A. Chizmadzhev. 1989. Electrical breakdown of lipid bilayer membranes: phenomenology and mechanism. In *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. E. Neumann, A. E. Sowers, and C. A. Jordan, editors. Plenum Press, New York. 83-95.
21. De Bruin, K. A., and W. Krassowska. 1998. Electroporation and shock-induced transmembrane potential in a cardiac fiber during defibrillation strength shocks. *Ann. Biomed. Eng.* 26:584-596.
22. De Bruin, K. A., and W. Krassowska. 1999. Modeling electroporation in a single cell. Effects of field strength and rest potential. *Biophys. J.* 77:1213-1224
23. Tekle, E., R. D. Astumian, and P. B. Chock. 1994. Selective and asymmetric molecular transport across electroporated cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11512-11516.
24. Georgieva, G., B. Neu, V. M. Shilov, E. Knippel, A. Budde, R. Latza, E. Donath, H. Kiesewetter and H. Baumler. 1998. Low frequency electroporation of fixed red blood cells. *Biophys. J.* 74: 2114-2120.
25. Климонтович Ю.Л. Статистическая физика. М. Наука. Физмалит.1982 г.
26. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М.: Физматлит. 2004.





Елена Карловна Козлова  
Александр Петрович Черняев  
Александр Михайлович Черныш  
Полина Юрьевна Алексеева

**ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ – ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД  
ЭКСПРЕСС–ДИАГНОСТИКИ ПОВРЕЖДЕНИЙ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН В РЕЗУЛЬТАТЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФИЗИКО-  
ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ  
НА ЭРИТРОЦИТЫ**

Препринт НИИЯФ МГУ-2005-7/773

Издательство УНЦ ДО  
ИД № 00545 от 06.12.1999

117246, Москва, ул. Обручева, 55-А, УНЦ ДО  
тлф (095) 718-65966, -7767, -7785 (комм.)  
e-mail: [izdat@abiturcenter.ru](mailto:izdat@abiturcenter.ru)  
<http://abiturcenter.ru/izdat>

Заказное. Подписано в печать 27.06.05 г. Формат 60x90/16  
Бумага офсетная № 2. Усл. Печ. л. 3,06  
Тираж 50 экз. Заказ № 837

Отпечатано в Мини-типографии УНЦ ДО  
<http://abiturcenter.ru/izdat>  
в полном соответствии с качеством  
предоставленного оригинал-макета

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.