

تأثیر اندازه و شکل سلول بر آستانه میدان الکتریکی و ولتاژ غشایی بحرانی در الکتروتراواسازی

لیلا توحیدی^۱، سید محمد فیروزآبادی^{۲*}، حسین مزدارانی^۳، تادی کوتنیک^۴، گرازد پوسپهار^۵، دامیان میکلاوچویچ^۶

۱- دانشجوی دکتری فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

۲- دانشیار گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

۳- استاد گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

۴- دانشیار گروه مهندسی بیوالکتریک، دانشگاه لوبلیانا، اسلونی

۵- دانشجوی پسادکتری گروه مهندسی بیوالکتریک، دانشگاه لوبلیانا، اسلونی

۶- استاد گروه مهندسی بیوالکتریک، دانشگاه لوبلیانا، اسلونی

تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۸۷/۸/۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۹/۵

چکیده

مقدمه: الکتروپوریشن یا الکترو تراواسازی یک روش برای افزایش تراوایی غشاء سلول توسط میدان الکتریکی خارجی است. این افزایش تراوایی در صورتی آشکار می شود که ولتاژ غشایی القایی با شدت میدان الکتریکی آستانه متناسب است، از یک مقدار بحرانی که بزرگتر شود. در این تحقیق، تغییرات شدت میدان الکتریکی آستانه و نیز ولتاژ غشایی بحرانی منجر به الکتروپوریشن مشاهده پذیر در سلولهای کروی و سلولهای چسبیده با شکل نامنظم، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها: سلولهای کروی با اندازه های مختلف و سلولهای چسبیده با شکلهای متنوع انتخاب شدند. سلولهای انتخاب شده تحت تأثیر چهار پالس الکتریکی با پهنای یکسان ۱۰۰ میکروثانیه و دامنه افزایشی قرار گرفتند. رخداد الکتروپوریشن با افزایش فلورسانس ناشی از عبور یون کلسیم به داخل سلول، آشکار شده و شدت میدان الکتریکی آستانه برای هر سلول ثبت شد. شکل سه بعدی سلولهای مورد استفاده، از تصاویر سطوح مقطع بدست آمدند. شبیه سازی با روش المان محدود برای بدست آوردن ولتاژ غشایی بحرانی الکتروپوریشن برای سلولهای مختلف انجام شد.

نتایج: مقادیر شدت میدان الکتریکی آستانه و نیز ولتاژ غشایی بحرانی برای سلولهای کروی بر حسب شعاع آنها بدست آمد. برای بررسی اثر شکل و جهتگیری سلولها بر شدت آستانه و ولتاژ بحرانی، سلولهای مورد مطالعه بر حسب شکل به سه دسته مجزا تقسیم شدند. مقادیر مورد نظر برای تمام سلولهای هر گروه بدست آمد و نتایج بدست آمده برای هر گروه با یکدیگر مقایسه شدند.

بحث و نتیجه گیری: اندازه، شکل و جهتگیری سلولها روی ولتاژ غشایی بحرانی تأثیر می گذارند و تمام این عوامل به نوبه خود شدت میدان الکتریکی آستانه برای ایجاد تراوایی و در نتیجه بازده الکتروپوریشن را تغییر می دهند. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۵، شماره ۲، پیاپی (۲۱،۲۰)، پاییز و زمستان ۸۷: ۱۴-۱)

واژگان کلیدی: الکتروپوریشن، شکل سلول، سایز سلول، ولتاژ غشایی بحرانی، شدت میدان الکتریکی آستانه

* نویسنده مسؤول: سیدمحمد فیروزآبادی

آدرس: تهران، گروه مهندسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران

pourmir@modares.ac.ir

تلفن: ۸۲۸۳۸۲۱ - (۲۱) ۹۸ +، نمابر: ۸۸۰۱۳۳۰۳۰ - (۲۱) ۹۸ +

www.SID.ir

۱- مقدمه

بنابراین در بسیاری از کاربردهای الکتروپوریشن، مثل الکتروکموترابی، که برای نتیجه بخشی روش، تمام سلولهای مورد نظر باید الکتروپوریت شوند، تعیین صحیح مقدار ITVC بسیار حائز اهمیت است. از طرفی در اثر استفاده از پالسهای با شدت بسیار زیاد و یا با پهنای بزرگ، این تکنیک می تواند ممکن است تخریب سلولی برگشت ناپذیر ایجاد کند که در الکتروکموترابی می تواند باعث بروز اثرهای جانبی مثل تخریب سلولهای سالم و یا ایجاد زخم شود [۱۸] و در الکتروژن تراپی باعث کاهش انتقال موثر ژن به داخل سلول گردد. بنابراین قبل از شروع درمان، باید بهینه سازی پروتکل های پالس برای کاربردهای درمانی الکتروپوریشن صورت بگیرد.

از آنجا که شکل نامنظم و متنوع سلولهای بافت، چسبندگی و ارتباط آنها با یکدیگر و تاثیر متقابل آنها بر هم، پیچیدگیهایی را در محاسبات، شبیه سازیها و آزمایشهای تجربی به وجود می آورد، اکثر تحقیقات و مطالعات انجام شده در این زمینه، روی سوسپانسیونهای رقیق سلولهای کروی که در آنها اثر متقابل سلولها بر یکدیگر قابل چشم پوشی است، انجام شده است [۱۶ و ۱۹]. به منظور تعیین ولتاژ القایی غشایی برای سلولهای کروی تحت تاثیر میدان، استفاده از روشهای تحلیلی امکان پذیر است. این نتایج تحلیلی، اعتبارسنجی نیز شده و مطابقت خوبی با نتایج آزمایشگاهی نشان داده اند [۲۰]. بدست آوردن نتایج تحلیلی برای شکلهای سلولی بیضی گون و استوانه ای بسیار پیچیده تر بوده و برای شکلهای بازهم پیچیده تر (مثل سلولهای بافت)، یافتن جواب تحلیلی تقریباً غیر ممکن است. در این موارد، یافتن ولتاژ القایی غشایی و شدت پالس آستانه، تنها با شبیه سازی [۱۵، ۲۱، ۲۲] و یا با مطالعات تجربی امکان پذیر [۲۰، ۲۳، ۲۴] می شود. گرچه تعیین پروتکلی برای انجام الکتروپوریشن موثر سلولهای بافت، دشوارتر از الکتروپوریشن سلولهای سوسپانسیونی است، ولی

الکتروپوریشن یا تراوسازی الکتریکی یک روش الکتریکی به منظور منفذ سازی در غشاء سلول است که منجر به افزایش گذرا و برگشت پذیر تراوایی غشاء نسبت به موادی که در حالت طبیعی غیر قابل نفوذ به داخل سلول هستند می شود [۱]. این تکنیک، یک روش مناسب برای دستکاری ژن و سیتوسول توسط انتقال یونها و یا مولکولهای خارجی مثل داروها، هورمونها، پروتئینها، پلاسمیدها و DNA به داخل سلولها است. به همین دلیل، الکتروپوریشن سلولهای بافت، اهمیت روز افزونی مخصوصاً در کاربردهای کلینیکی مثل درمان سرطان (الکتروکموترابی) [۲ و ۳]، ژن درمانی (الکتروژن تراپی) [۴ و ۵]، ایمونولوژی [۶]، و بیولوژی سلولی [۷] پیدا کرده است. به موازات بررسی و گسترش کاربردهای تجربی این روش، تحقیقاتی نیز برای فهم بیشتر این پدیده، انجام می گیرد [۸ و ۹ و ۱۰]. در این روش، سلولها تحت تاثیر پالسهای الکتریکی با پهنای کم و شدت زیاد قرار می گیرد. اعمال این پالسهای الکتریکی به دلیل رسانایی کم غشاء سلول نسبت به محیط داخل و خارج سلولی، موجب القاء یک اختلاف پتانسیل الکتریکی در دو طرف غشاء می شود که ولتاژ غشایی (ITV) نامیده می شود. به شدت میدان الکتریکی، سایز و شکل سلول بستگی دارد و در نقاط مختلف غشاء مقادیر متفاوتی دارد [۱۲ و ۱۱ و ۱]. آزمایشها نشان می دهد که برای ایجاد یک انتقال موثر و قابل مشاهده به داخل سلول توسط الکتروپوریشن، شدت میدان الکتریکی باید از یک مقدار آستانه، بزرگتر باشد [۱۳ و ۱۴ و ۱۵] و در این صورت ولتاژ غشایی سلول از یک ولتاژ القایی بحرانی^۱ (ITV_c)، که مقدار آن به نوع سلول بستگی دارد [۱۶ و ۱۷]، بیشتر شود.

1- Critical Induced Transmembrane Voltage

Archive of SID

۲- مواد و روشها

۱-۲ قسمت تجربی

۱-۱-۲ آماده سازی سلولها

سلولهای تخمدان همستر چینی^۱ ("سی اچ او") (تهیه شده از بانک سلولی ملی اسلونی^۲) در محیط کشت "هم-اف-۱۲"^۳ که حاوی ۸٪ سرم جنین گاوی^۴، ۰/۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر آل-گلوتامین^۵ (هر سه تهیه شده از شرکت سیگما-آلدريش^۶ آلمان)، ۲۰۰ واحد بر میلی لیتر کریستیسیلین^۷ و ۱۶ میکرو گرم بر میلی گرم جتتامیسین است، کشت داده شد و در انکوباتور دی اکسید کربن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. تعداد 2×10^4 سلول CHO در چنبرهای لب-تک II^۸ از شرکت آمریکایی نالگی نونک^۹ در محیط "هم-اف-۱۲"، کشت داده و انکوبه شد. آزمایش روی سلولهای کروی، ۲ الی ۳ ساعت بعد از کشت که سلولها بطور بسیار جزئی به کف ظرف چسبیده اند و هنوز شکل کروی خود را حفظ کرده بودند، انجام گرفت. آزمایشها برای سلولهای چسبیده، ۲۲ الی ۲۴ ساعت بعد از کشت در چنبرها صورت گرفت که سلولها به طور کامل به کف ظرف چسبیده و شکل نامنظم پیدا کرده باشد. در این تحقیق، سلولهایی مورد بررسی قرار گرفتند که بصورت منفرد رشد کرده باشند و به سلولهای مجاور نچسبیده باشند. با توجه به تعداد نسبتا کم سلولهای کشت شده در هر چنبر و زمان انکوبه کردن سلولها، چنبر سلولهایی به راحتی قابل دستیابی هستند.

آماده سازی سلولها برای شروع آزمایشهای اصلی در ۳ مرحله پیاپی انجام شد:

انتخاب پارامترهای درمانی به منظور بزرگتر شدن ولتاژ القایی غشایی تمام سلولهای تومور از ولتاژ القایی بحرانی [۱۴]. به منظور نزدیکتر شدن به چنبر پروتکلی، مناسب به نظر می رسد که از مدل ساده تر بافت، مثل سوسپانسیونهای بسیار چگال و یا سلولهای چسبنده تک لایه ای که شکل نامنظمی دارند، استفاده شود [۱۹ و ۲۵].

تا بحال مطالعه جامعی در مورد ITVC صورت نگرفته است. در برخی مطالعات مربوط به الکتروپوریشن، بسته به نوع سلول، مقدار ITVC برای تعداد پالسهای یکسان با پهنای مساوی، ثابت فرض شده است [۲۵ و ۲۰]. در مطالعاتی دیگر، ITVC بطور تجربی توسط تعیین کمترین میدان الکتریکی لازم برای مشاهده الکتروپوریشن در یک جمعیت سلولی بدست آمده است [۲۶ و ۱۶]. ولی از آنجاییکه این جمعیت سلولی، شامل سلولهای با سایز مختلف است و با توجه به اینکه ولتاژ غشایی حادث شده به سایز سلول بستگی دارد، سلولهای بزرگتر با شدت میدان الکتریکی کوچکتری الکتروپوریت می شوند. ولیکن در تحقیقات گذشته ITVC بدست آمده توسط این تحقیقات، مربوط به بزرگترین سلول موجود در جمعیت سلولی مورد مطالعه است [۲۶ و ۱۶].

در این تحقیق، در جهت هر چه بیشتر نزدیک شدن به پاسخ سلولهای بافت به میدان الکتریکی اعمالی، سلولهای با اندازه و شکل و جهتگیریهایی مختلف در نظر گرفته شد. بستگی شدت میدان الکتریکی آستانه و ولتاژ بحرانی غشایی برای رخداد الکتروپوریشن در سلولهای کروی و چسبیده با شکل نامنظم مورد بررسی قرار گرفت. اثر اندازه، شکل و جهتگیری سلول بر شدت میدان الکتریکی آستانه و ولتاژ بحرانی غشایی در این تحقیق بررسی شده است.

- 1- Chinese Hamster Ovary (CHO-K1)
- 2- National cell bank of Slovenia
- 3- HAM-F12
- 4- FCS
- 5- L-glutamine
- 6- Sigma-Aldrich, Steinheim
- 7- Crysticillin
- 8- Lab-Tek II chambers
- 9- Nalge Nunc International, USA

الف) اضافه کردن "فورا-۲ای ام"^۱

"فورا-۲" یک ماده فلورسانس نسبت سنج^۲ حساس به یون کلسیم است [۲۷] (تحریک در ۳۴۰/۳۸۰ نانومتر و تابش در ۵۴۰ نانومتر)، که در این آزمایش برای آشکارسازی الکتروپوریشن از آن استفاده شد. بدین منظور، سلولها با "اس ام ای ام"^۳ (تهیه شده از کمپانی گیپکو^۴) که عاری از کلسیم است، شسته شد و سپس برای ۳۰ دقیقه در محلول "اس ام ای ام" که حاوی "فورا-۲ای ام"^۱ ۱/۵ میکرو مولار و اسید پلورونیک^۵ ۲۰۰ میکرو مولار (هر دو تهیه شده از شرکت مولکولار پروب^۶، هلند) است، در دمای ۲۱ درجه سانتیگراد قرار گرفت و سپس مجدداً با "اس ام ای ام"^۳ شستشو شد. در این مدت، "فورا-۲ای ام"^۱ به دلیل وجود عامل ای ام از غشاء وارد سلول می شود و در این انتقال تبدیل به "فورا-۲" می شود که در صورت حضور کلسیم در محیط، با آن برهمکنش داده و تغییر بارزی در فلورسانس آن ظاهر می شود.

ب) اضافه کردن "دی-۸-انپس"^۷

"دی-۸-انپس" یک ماده فلورسانس است که وقتی به غشاء متصل می شود، لبه های سلول را قابل رویت می کند (تحریک در ۴۹۰ نانومتر و تابش در ۶۰۵ نانومتر) و می تواند به عنوان نشانگر غشاء سلول در طی این آزمایش استفاده شود. بدین منظور، سلولها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول "اس ام ای ام"^۳ شامل "دی-۸-انپس"^۷ ۱۰ میکرومولار، در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس با "اس ام ای ام"^۳ خالص شستشو شد تا این ماده از محیط اطراف سلول شسته شود.

ج) اضافه کردن کلسیم به محیط سلولها قبل از اعمال پالس

برای آشکارسازی الکتروپوریشن سلولها، از تغییر فلورسانس "فورا-۲" در اثر پیوند با یون کلسیم استفاده شد. بدین منظور، "اس ام ای ام"^۳ با "هم-اف-۱۲" که حاوی ۱/۰۵ میلی مولار یون کلسیم است، جایگزین شد. یونهای کلسیم غیر قابل نفوذ به داخل سلول هستند، بنابراین اگر یونهای کلسیم در هنگام اعمال پالس در محیط داخل سلولی وجود نداشته باشد ولی در محیط خارج سلولی موجود باشد، در صورت ایجاد منافذ در غشاء سلول (الکتروپوریشن)، یون کلسیم وارد سیتوسول شده و نشانگر "فورا-۲" می تواند این تغییر را آشکار کند.

۲-۱-۲ تصویر برداری از سلولها

برای بدست آوردن شکل واقعی سلولهای تحت تابش، تصاویر فلورسانس سطح مقطعهای سلول با شیفت فوکوس میکروسکوپ فلورسانسی (آکسیپورت^۸ ۲۰۰، چشمی ۶۳× با ایمرشن روغن، از کارخانه زیس^۹، آلمان) در پله های عمودی ۲ میکرومتری که از پایین تا بالای سلول را جاروب می کرد، توسط دوربین CCD نوع ویزیکم^{۱۰} ۱۲۸۰ و نرم افزار تمامورف ۵^{۱۱}، (هر دو از ویزیترون^{۱۲} آلمان)، تهیه شدند. این تصاویر در حافظه رایانه ذخیره شد. پس از آزمایش، این تصاویر پردازش و شکل واقعی سلولها حاصل شد (شکل ۳ الف).

۲-۱-۳ اعمال پالس الکتریکی و آشکارسازی

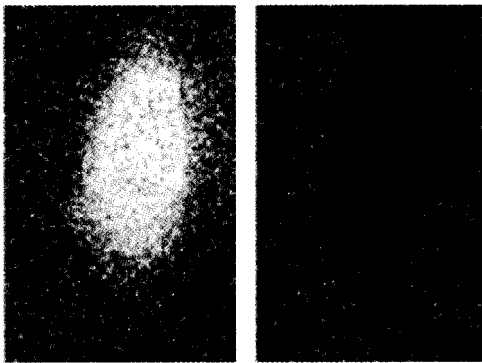
الکتروپوریشن در آزمایشهای تجربی

برای اعمال پالس الکتریکی به سلولها، از یک جفت الکتروود پلاتین/ایریدیم (Pt/Ir) به قطر ۰/۸ میلیمتر، چسبیده به کف ظرف و به فاصله ۴ میلیمتر از هم مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱ الف). در این تحقیق فرض شده که میدان الکتریکی

- 1- Fura2-AM
- 2- Ratio-metric
- 3- Spinner's Minimum Essential Medium (SMEM)
- 4- Gibco, USA
- 5- pluronic acid
- 6- Molecular probes, Leiden
- 7- di-8-ANEPPS

- 8- AxioVert
- 9- Zeiss
- 10- VisiCam
- 11- MetaMorph 5.0
- 12- Visitron

تحریکی ۳۴۰ و ۳۸۰ نانومتر گردید. به دلیل نسبی سنجی بودن "فورا۲"، این روش حساسیت لازم برای آشکارسازی مقادیر بسیار کم کلسیم (حتی در حدود ۱۰۰ نانومولار) را دارد. تغییرات فلورسانس مشاهده شده در اثر رخداد الکتروپوریشن، برای سلول نمونه مورد نظر در شکل ۳ الف، در شکل ۲ مشاهده می شود.



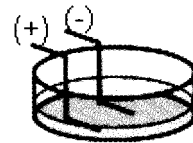
(ب)

(الف)

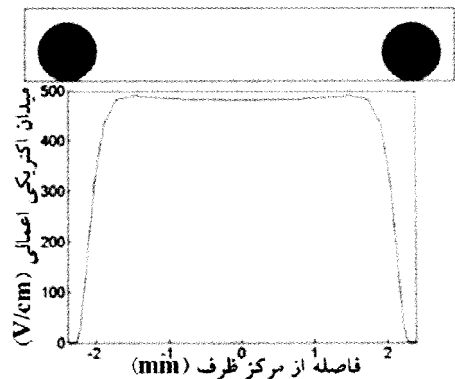
شکل ۲- آشکارسازی الکتروپوریشن با استفاده از فورا، برای سلول مورد بررسی در شکل ۱، الف) قبل از اعمال پالس ب) بعد از اعمال پالس و رخداد الکتروپوریشن

برای یافتن میدان الکتریکی آستانه برای الکتروپوریشن هر سلول، از پالسهای متوالی با پهنای ثابت ۱۰۰ میکروثانیه و با دامنه افزایشی پله ای (۵۰ ولت بر سانتی متر برای هر دو پالس متوالی) استفاده شد. اگر سلولی با اولین پالس اعمال شده، الکتروپوریت شد، آن شدت میدان نمی تواند به عنوان شدت آستانه در نظر گرفته شود چون این امکان وجود داشته است که سلول با شدت کمتری نیز الکتروپوریت شود. در ضمن، فاصله زمانی بین پالسهای متوالی، ۴ دقیقه در نظر گرفته شد تا سلول در هنگام دریافت پالس بعدی، تقریباً به حالت نرمال خود برگشته باشد. تعداد پالس اعمالی به نمونه سلولی کمتر یا مساوی ۴ پالس بود تا سلولها از حالت فیزیولوژی اولیه خود فاصله نگیرند. در آزمایشهای انجام شده، سعی شد که یک محدوده وسیع از اندازه، شکل و جهتگیری سلولها مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور، اولین مقدار شدت میدان الکتریکی اعمالی بسته به نمونه

حاصل بین این دو الکتروود یکنواخت است. برای بررسی صحت این فرضیه معادله لاپلاس با اعمال شرایط مرزی مسئله توسط شبیه سازی، با استفاده از نرم افزار کمسول ۳/۳^۱ حل گردید. با توجه به توزیع بدست آمده (شکل ۱ ب)، توزیع میدان الکتریکی در فاصله میان دو الکتروود می تواند همگن فرض شود و این فرضیه که سلولهای این ناحیه تحت تاثیر میدان الکتریکی یکسان هستند، فرض صحیحی است.



(الف)



(ب)

شکل ۱- الف) نحوه قرار گیری الکتروود در چنبر سلولها برای انجام الکتروپوریشن. ب) قسمت بالا، سطح مقطع الکتروودها در کف ظرف و قسمت پایین، توزیع میدان الکتریکی حاصل بین دو الکتروود وقتی که اختلاف پتانسیل ۲۰۰ ولت به الکتروودها اعمال شود را نشان می دهد.

پالسهای الکتریکی توسط دستگاه کلینپوریتور^۲ (آی جی ای ای^۳ ایتالیا) اعمال گردید. الکتروپوریشن منجر به نفوذ یونهای کلسیم به داخل سلول شد و در اثر ایجاد پیوند با "فورا۲" باعث تغییر طیف تابشی در ۵۴۰ نانومتر برای دو طول موج

1- COMSOL 3.3

2 Cliniporator

3 IGEA

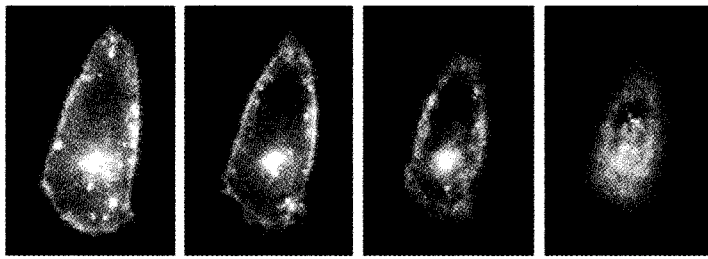
تبدیل (شکل ۳ ب) و لبه های سلول در تصاویر حاصل، مشخص گردیدند. سپس با یک برنامه نویسی در محیط مت-لب ۷/۲ و کمسول ۳/۳ (از شرکت کامسول آمریکا)، لبه های مشخص شده سلول به ۳۰ تا ۳۵ قسمت تقسیم و با دستورهای مناسب و با لحاظ کردن فاصله بین سطح مقطعهای متوالی (۲ میکرومتر)، به هم متصل گردیده و تصویر سه بعدی هر سلول به طور مجزا بدست آمد. مراحل ذکر شده در شکل ۳ مشاهده می شود. برای سلولهای کروی، بزرگترین شعاع سطح مقطعهای حاصل برای هر سلول، به عنوان شعاع سلول کروی در نظر گرفته شد.

مورد نظر، با توجه به مشخصات هندسی سلول و نیز آزمایشهای پایلوت، بین ۱۵۰ تا ۶۰۰ ولت بر سانی متر انتخاب شد. این مراحل برای سلول با شکل نامنظم با تنوع هندسی و برای سلولهای کروی با تمام شعاعهای ممکن برای این نوع سلول تکرار گردید. تعداد سلولهای کروی و نیز چسبیده بررسی شده در این تحقیق، هر کدام ۶۶ نمونه بود.

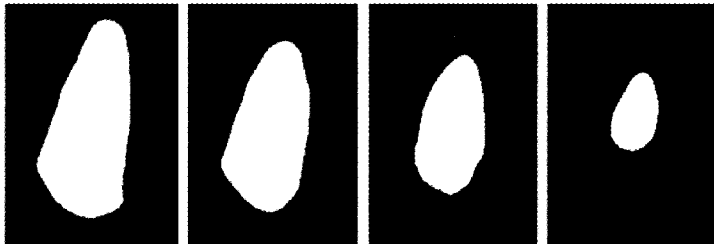
۲-۲- قسمت شبیه سازی

۲-۲-۱ ساخت مدل هندسی سلول

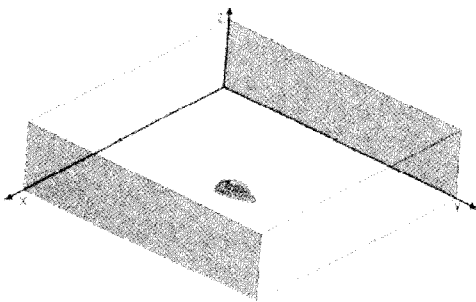
برای ساخت مدل هندسی سلولها، از تصاویر بدست آمده در بخش ۲-۱-۲ استفاده شد. این تصاویر که ۸ بیتی هستند، توسط نرم افزار کورل ۱۱ به تصاویر ۱ بیتی (سیاه و سفید)



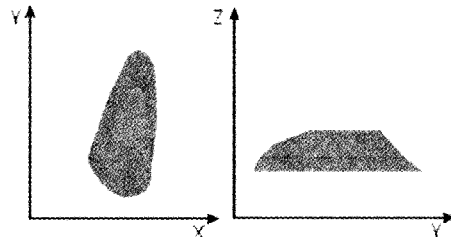
(الف)



(ب)



(د)



(ج)

شکل ۲- (الف) چهار سطح مقطع یک سلول "سی اچ او" از پایین تا بالای سلول، به فاصله ۲ میکرومتر (ب) تعیین مرزهای سلول برای هر سطح مقطع (ج) نمای بالایی و جانبی سلول مورد نظر (د) محل قرار گیری سلول مدل سازی شده، چنبر و الکترودها (سطوح خاکستری رنگ)

معادله لاپلاس برای ولتاژ القایی غشایی توسط معادله زیر به دست می آید:

$$ITV = \phi_o - \phi_i = f_s ER \cos \theta \quad (1)$$

که در آن ITV نشان دهنده ولتاژ القایی غشایی، ϕ_o و ϕ_i به ترتیب، نمایانگر پتانسیل سطح خارجی و داخلی غشاء، E میدان الکتریکی خارجی، R شعاع سلول و θ زاویه بین جهت میدان الکتریکی و خطی است که مرکز سلول را به نقطه مورد نظر وصل می کند. f_s تابعی است که حاوی اطلاعات ابعادی و الکتریکی سلول و محیط اطراف آن می باشد و توسط رابطه زیر بیان می شود:

$$f_s = \frac{3 \sigma_e [3dR^2 \sigma_i + (3d^2R - d^3)(\sigma_m - \sigma_i)]}{2 R^3 (\sigma_m + 2\sigma_e)(\sigma_m + \frac{1}{2}\sigma_i) - (R-d)^3 (\sigma_e - \sigma_m)(\sigma_i - \sigma_m)} \quad (1)$$

که در آن E_T شدت میدان الکتریکی آستانه و ITV_c ولتاژ غشایی بحرانی می باشد.

بنابراین با استفاده از شعاعهای اندازه گیری شده برای سلولهای کروی و نیز ولتاژ بحرانی گزارش شده برای سلولهای "سی اچ او" [۲۳]، شدت آستانه الکتروپوریشن برای این سلولها بطور تحلیلی با استفاده از رابطه (۴) بدست آمد (شکل ۵) و با نتایج تجربی حاصل از بخش ۲-۱-۳ مقایسه شد.

۲-۲-۳ شبیه سازی برای یافتن ولتاژ بحرانی الکتروپوریشن در سلولهای با شکل نامنظم

همانطور که در مقدمه ذکر شد، برای سلولهای با شکل نامنظم، روش تحلیلی کارایی ندارد. بنابراین در این تحقیق، برای این سلولها از شبیه سازی استفاده شد و معادله لاپلاس با استفاده از روش المان محدود توسط نرم افزار کمسول ۳.۳ (شرکت کمسول، آمریکا)، بخش محیطهای رسانا AC/DC، حل شد. بدین منظور، سلول مورد نظر که شکل هندسی آن مطابق بخش ۲-۲-۱ ساخته شده، در کف یک چنبر مجازی به شکل مکعب مستطیل به ابعاد $200 \times 200 \times 50$ میکرومتر قرار گرفت. به دو وجه

۲-۲-۲ معادلات و مدل ریاضی برای یافتن آستانه الکتروپوریشن در سلولهای کروی

از دید نظری، وقتی یک سلول تحت تاثیر میدان الکتریکی خارجی قرار می گیرد، از آنجاییکه رسانندگی غشاء چندین مرتبه بزرگی از رسانندگی محیط داخل و خارج سلولی کمتر است، تمرکز میدان الکتریکی در ناحیه غشاء بسیار بیشتر است. اختلاف پتانسیل القاء شده در دو طرف غشاء با حل معادله لاپلاس بدست می آید [۲۸]. برای حالت ساده یک سلول کروی که تحت تاثیر میدان الکتریکی ثابت قرار گیرد، جواب

در این رابطه، σ_o و σ_m ، σ_i به ترتیب رسانندگیهای سیتوپلاسم، غشاء سلول و محیط خارجی سلول می باشد و d ضخامت غشاء سلول است.

تحت شرایط فیزیولوژیک، رسانندگی غشاء بسیار کمتر از رسانندگی محیط خارج و داخل سلولی می باشد، بنابراین بسیار نزدیک به $1/5$ خواهد بود و خواهیم داشت:

$$ITV = \frac{3}{2} ER \cos \theta \quad (3)$$

وقتی شدت میدان الکتریکی اعمالی از شدت آستانه بزرگتر شود، در قسمتهایی از غشاء که ولتاژ غشایی القایی از ولتاژ بحرانی غشاء سلول بزرگتر شود، تراوایی غشاء افزایش می یابد [۱۴]. فرمول (۳) نشان می دهد که ولتاژ غشایی القایی به اندازه سلول بستگی دارد. با توجه به فرمول (۳)، روشن است اولین نقاطی که به ولتاژ بحرانی می رسند، قطبهای کره ($\theta = 0$ و $\theta = \pi$) هستند. پس شدت میدان آستانه برای الکتروپوریت شدن سلول، از رابطه زیر بدست می آید:

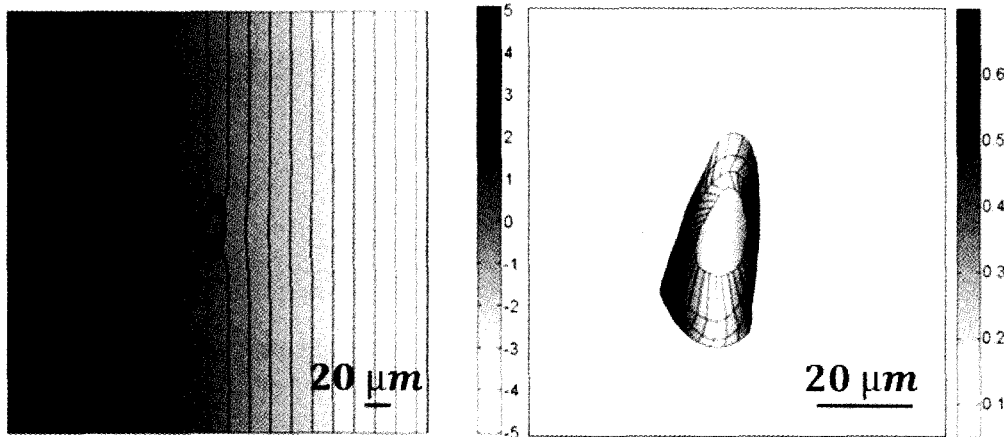
$$E_T = \frac{2}{3} \frac{ITV_c}{R} \quad (2)$$

1- Induced Transmembrane Voltage

2- COMSOL 3.3

با استفاده از شرایط مرزی وارد مسئله می شود که جزئیات این مدل در مرجع [۲۵] یافت می شود. در ضمن به دلیل مهمتر بودن نتایج حاصل برای ناحیه غشاء در این تحقیق، مشهای ناحیه غشاء کوچکتر در نظر گرفته شد. تعداد کل المانهای مش در هر شبیه سازی، در حدود ۲۰۰۰۰ المان بود. حاصل این شبیه سازی، یافتن توزیع پتانسیل الکتریکی در تمام فضای مدل است. ولتاژ غشایی در تمام طول غشاء، از تفاضل پتانسیل خارج و داخل سلول در هر نقطه از غشاء بدست می آید. میزان ولتاژ بحرانی غشاء، بیشترین مقدار ولتاژ غشایی بدست آمده در سرتاسر آن می باشد (شکل ۴).

روبروی چنبر ولتاژی منسوب می شود تا میدان الکتریکی حاصل در محل سلول با شدت میدان اعمالی آستانه (E_T) که در حالت تجربی بخش ۲-۱-۳ بدست آمد، یکسان شود (شکل ۳ د). رسانندگیهای سیتوپلاسم و غشاء به ترتیب 0.3 و 5×10^{-7} زیمنس بر متر و ضخامت غشاء برابر ۵ نانومتر در نظر گرفته شد [۱۱ و ۱۲]. رسانندگی محیط خارج سلولی نیز بر اساس اندازه گیری با رسانایی سنج، ۱ زیمنس بر متر در نظر گرفته شد. از آنجائیکه ضخامت غشاء سلول از ابعاد سلول بسیار کوچکتر است، در مش بندی و حل المان محدود در ناحیه غشاء مشکلاتی ایجاد می شود. به منظور اجتناب از این مشکلات در حل مسئله، غشاء



(ب)

(الف)

شکل ۴- الف) توزیع پتانسیل الکتریکی محاسبه شده در داخل و خارج سلول برای پایین ترین سطح مقطع سلول مورد نظر در شکل ۱. ب) اندازه ولتاژ غشایی محاسبه شده. منحنیهای موجود در شکلهای نشان دهنده سطوح هم پتانسیل است.

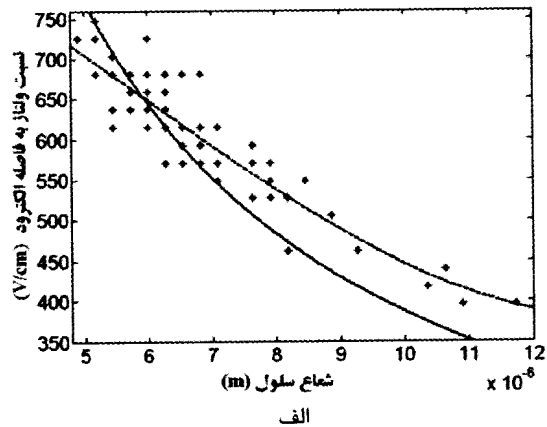
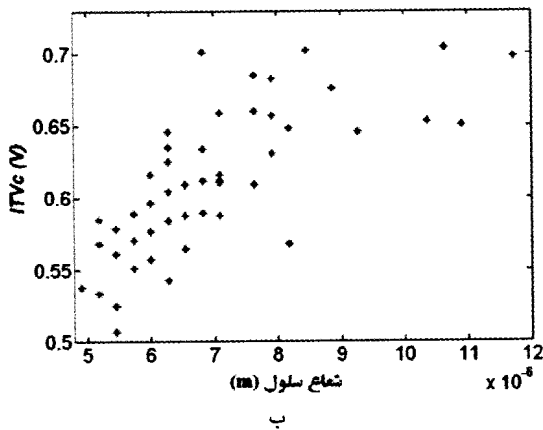
۳- نتایج

شده برای سلولهای کروی در شکل ۵ ب مشاهده می شود. از آنجائیکه سلولهای چسبیده شکلهای و جهتگیریهای متفاوتی دارند، برای بررسی تاثیر جهتگیری سلول بر E_T و $ITVC$ ، سلولهایی با شکلهای متنوع مورد مطالعه قرار گرفت. این سلولهای مورد مطالعه، بر حسب جهتگیری آنها به سه گروه مختلف دسته بندی شدند بطوریکه گروه ۱ شامل سلولهایی با سطح مقطع دایره ای شکل، گروه ۲ حاوی سلولهایی با کشیدگی در جهت تقریباً عمود بر میدان الکتریکی (با سطح

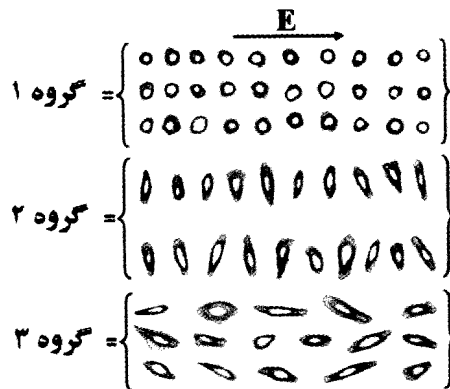
در آزمایشهای انجام شده، شدت آستانه الکتروپوریشن برای سلولهای کروی با شعاعهای مختلف بطور عملی بدست آمد. بر اساس داده های حاصل، نمودار وابستگی E_T به شعاع سلولهای کروی مطابق شکل ۵ الف رسم شد. در این شکل، دلیل کمتر بودن تعداد نقاط آزمایشی قابل رویت از تعداد سلولهای در نظر گرفته شده، همپوشانی برخی نقاط به دلیل یکسان بودن مختصات آنهاست. بازه تغییرات $ITVC$ محاسبه

نتایج به دست آمده برای E_T مربوط به سلولها با شکل و جهتگیریهایی مختلف با توجه به گروه بندی انجام شده، که از طریق آزمایشهای تجربی بدست آمد، در شکل ۷ الف مشاهده می شود. با استفاده از مقادیر E_T برای هر سلول و مدلسازی هندسی و شبیه سازی، ITVC برای هر سلول بدست آمد و بر اساس گروه بندی ذکر شده، نتایج در شکل ۷ ب آورده شده است. میانگین و انحراف معیار کمیتهای مورد نظر برای هر گروه در شکل ۷ الف و ب مشخص است.

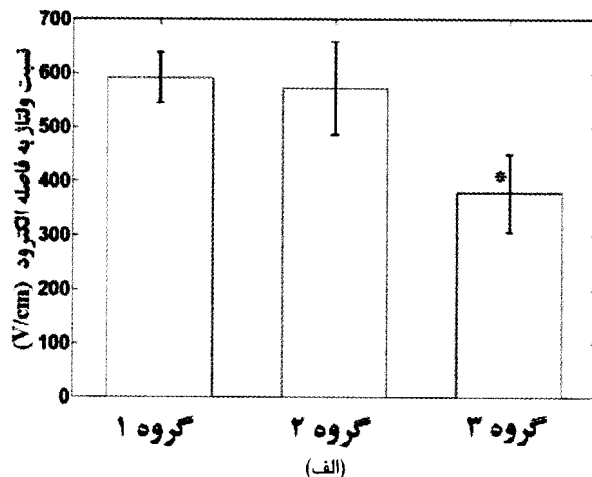
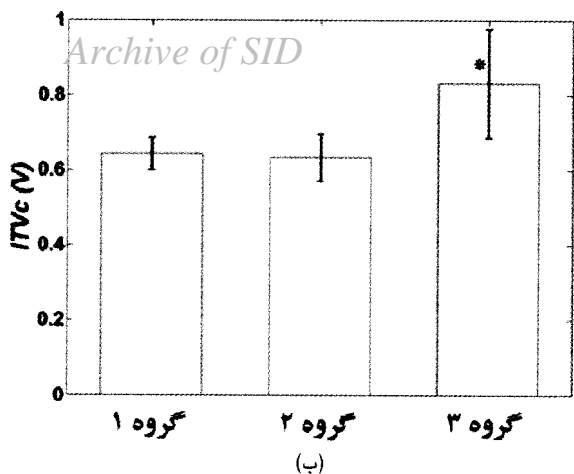
مقطع بیضی و قطر اصلی عمود بر راستای میدان الکتریکی) و گروه ۳ شامل سلولها با کشیدگی تقریباً در راستای میدان الکتریکی (با سطح مقطع تقریباً بیضی شکل و قطر اصلی در راستای میدان الکتریکی) هستند. نمای بالای شکلهای سه بعدی سلولهای مورد مطالعه در گروههای ذکر شده، در شکل ۶ مشاهده می شود. تعداد نمونه در گروههای ذکر شده به ترتیب ۳۰، ۲۰ و ۱۶ هستند.



شکل ۵- الف) اثر شعاع سلولهای کروی بر شدت میدان الکتریکی آستانه به منظور الکتروپوریشن. منحنی توپر و خط چین به ترتیب پیش بینی نظریه ریاضی و منحنی برازش شده به داده های تجربی را نشان می دهد. ب) بستگی ولتاژ غشایی بحرانی (ITVC) به شعاع سلولهای کروی.



شکل ۶- دسته بندی سلولهای با شکل نامنظم بر حسب شکل و جهتگیری سطح مقطع آن با ظرف همراه با نمای بالایی سلولها. گروه ۱ نماینده سلولهای با سطح مقطع کروی، گروه ۲ سلولها با کشیدگی عمود بر راستای میدان الکتریکی و گروه ۳ سلولها با کشیدگی در راستای میدان الکتریکی می باشد. تعداد نمونه در هر گروه به ترتیب، ۳۰، ۲۰ و ۱۶ می باشد. جهت میدان الکتریکی اعمالی در شکل مشخص شده است.



شکل ۷- میانگین و انحراف معیار (الف) شدت میدان الکتریکی آستانه و (ب) ولتاژ غشایی بحرانی برای گروه های مشخص شده در شکل ۶. (*) در شکلها نشان دهنده اختلاف معنی دار با سطح معنی داری ۰/۰۰۱ است.

متوسط شعاع سلولهای "سی اچ او" است با هم تطابق دارند و در سایر نقاط از هم فاصله می گیرند. دلیلی که برای این تفاوت متصور می شود، غلط بودن فرض ثابت در نظر گرفتن ITVC برای سلولها می باشد. پس با توجه به شکل ۵ الف می توان پیش بینی کرد که دلیل تفاوت دو منحنی مذکور، باید افزایش ITVC با شعاع سلول باشد. برای بررسی صحت این پیش بینی، ITVC برای هر سلول مطابق قسمت شبیه سازی مواد و روشهای این تحقیق بدست آمد که نتایج آن در شکل ۵ ب آورده شده است. همانطور که با توجه به نمودارهای شکل ۵ الف انتظار می رفت، سلولهای بزرگتر ولتاژ غشایی بحرانی بزرگتری دارند. بازه تغییرات ITVC برای سلولهای کروی موجود، بین ۵۰۰ تا ۷۴۰ میلی ولت است (شکل ۵ ب). این نتیجه در توافق با تحقیق تانسینگ و همکارانش است که بیان می کند که سلولهای با شعاع انحنای بیشتر (سلول کوچکتر)، راحت تر الکتروپوریت می شوند [۳۱].

محدوده لازم E_T برای الکتروپوریت شدن تمام سلولهای کروی در این آزمایش که چسبندگی جزئی به کف ظرف دارند، بین ۴۰۰ تا ۷۵۰ ولت بر سانتیمتر می باشد (شکل ۵ الف) و بنابراین

۴- بحث و نتیجه گیری

همانطور که در شکل ۵ الف نشان داده شده است، سلولهای کوچکتر، شدت میدان الکتریکی بزرگتری نسبت به سلولهای بزرگتر برای رخداد الکتروپوریشن نیاز دارند. منحنی برآزش داده شده به داده های تجربی بصورت خط چین در شکل ۵ الف مشخص شده است. از طرفی با توجه به معادله (۴)، E_T با شعاع سلول رابطه عکس دارد و سلولهای کوچکتر که شعاع کوچکتری دارند، شدت آستانه بزرگتری دارند. مقدار ولتاژ ITVC که در معادله (۴) ظاهر شده، بسته به نوع سلول، از ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی ولت است و مقدار ITVC گزارش شده برای سلولهای "سی اچ او" حدودا برابر ۵۸۰ میلی ولت است [۱۶]. از طرفی در بیشتر شبیه سازیها و پاسخهای تحلیلی، برای راحتی کار، این مقدار بصورت ثابت در نظر گرفته می شود [۲۳ و ۱۹ و ۲۹ و ۳۰]. با انتخاب ITVC برابر ۵۸۰ میلی ولت و استفاده از معادله (۴)، نمودار E_T بر حسب شعاع سلول، بطور تحلیلی بدست می آید که در شکل ۵ الف بصورت خط ممتد مشاهده می شود. ملاحظه می شود که ایندو منحنی خط چین و ممتد، تنها در نزدیکی ۶ میکرومتر که اندازه

گرفته اند، اندازه و شکل و جهتگیری سلولها، کاملاً بر شدت E_T و $ITVC$ تأثیر دارد. سلولهای با کشیدگی در جهت میدان، به میدان الکتریکی کوچکتری برای رخداد الکتروپوریشن نیاز دارد و این در حالیکه ولتاژ غشایی بحرانی برای این سلولها بطور معنی داری بزرگتر است. این موضوع باعث پیچیدگی بیشتر الکتروپوریشن این نوع سلولها می شود. تحقیقات بیشتری مورد نیاز است تا دلیل این تغییرات مورد بررسی قرار گیرد.

بعلاوه با توجه به شکل سلولها در گروههای انتخاب شده (شکل ۶) و نیز تفاوت معنی دار E_T و $ITVC$ فقط بین سلولهای با کشیدگی در راستای میدان الکتریکی با دو گروه دیگر (شکل ۷)، چنین به نظر می رسد که عامل موثر در تغییرات دو کمیت به دست آمده، اندازه سلول در جهت میدان است. بنابراین کشیدگی سلول در راستای میدان الکتریکی را که می توان آنرا "فاصله موثر در جهت میدان" نامید یک عامل تأثیر گذار در الکتروپوریشن است. بنابراین پیشنهاد می شود که در تحقیقات بعدی تقسیم بندی سلولها بر اساس فاصله موثر آنها در جهت میدان صورت بگیرد که انتظار می رود که در اینصورت انحراف از میانگین E_T و $ITVC$ برای دسته های جدید کمتر باشد. با در دست داشتن داده های کافی، می توان به یک فرمول تجربی بین $ITVC$ و فاصله موثر در جهت میدان و نیز شعاع انحنای سلولها دست یافت.

مشخص است که برای داشتن یک درمان موثر در الکتروکوترابی، تمام سلولهای بافت توموری باید نابود شوند چون حتی در صورت زنده ماندن تعداد کمی از سلولها، مجدداً رشد تومور از سر گرفته می شود [۱۴]، و نیز از اعمال پالسهای با شدت زیاد که باعث تخریب بافت می شود، پرهیز می گردد [۱۸]. با توجه به این نکات، برای داشتن یک درمان موفق، باید شدت میدانی به سلولهای توموری اعمال کرد که از بیشترین شدت میدان الکتریکی موجود در توزیع برای سلولهای

بیشترین مقدار E_T حدود ۱۸۷ درصد کمترین مقدار آن است. ولی با توجه به گستره کوچک تغییرات شعاع در سوسپانسیونها، این بازه تغییرات E_T برای سوسپانسیونها از این مقدار کمتر خواهد بود. یعنی تمام سلولهای سوسپانسیون در یک بازه کوچک شدت میدان الکتریکی الکتروپوریت می شوند.

شکل ۷ الف شدت میدان الکتریکی آستانه میانگین برای سلولهای چسبیده با شکل نامنظم در دسته بندی انجام شده مطابق شکل ۶ را نشان می دهد. برای مقایسه E_T در گروههای مختلف و یافتن تفاوتی معنی دار، از تست ناپارامتری من-ویتنی^۱ استفاده شد. نتیجه این تست نشان می دهد که شدت میدان الکتریکی آستانه برای سلولهای با سطح مقطع دایروی و سلولهای با کشیدگی عمود بر میدان الکتریکی، تفاوت معنی داری ندارند، در صورتیکه مقادیر E_T بدست آمده برای سلولهای با کشیدگی در راستای میدان الکتریکی تفاوت معنی داری (با سطح معنی داری ۰/۰۰۱) نسبت به دو گروه قبل نشان می دهد. این نتیجه در تطابق با نتایج تجربی بدست آمده در مطالعات قبلی است [۳۲].

نتایج شبیه سازی بر اساس پروتکل بخش ۳-۲-۲ مقدار ولتاژ غشایی بحرانی برای تک تک سلولهای با شکل نامنظم را بدست می دهد. شکل ۷ ب میانگین برای سلولهای موجود در هر گروه را نشان می دهد. تست من-ویتنی برای این داده ها نشان می دهد که در حالیکه سلولهای با سطح مقطع دایروی و سلولهای با کشیدگی عمود بر میدان الکتریکی، تفاوت معنی داری در $ITVC$ ندارند، این مقدار برای سلولهای با کشیدگی همسو با جهت میدان الکتریکی بطور معنی داری (با سطح معنی داری ۰/۰۰۱) بیشتر است. این نتیجه بدست آمده، فرض ثابت بودن $ITVC$ برای سلولهای از یک نوع را [۱۷-۱۳] رد می کند.

پس بر اساس این تحقیق، برای سلولهای کروی و چسبیده از یک نوع که تحت تأثیر پالسهای با تعداد و شدت یکسان قرار

^۱ Mann-Whitney

بخشی درمان، شدت میدان اعمالی باید از بیشترین شدت آستانه برای سلولهای موجود، بزرگتر باشد. در نتیجه ریخت شناسی سلولهای بافت تومور، سایز سلولها و جهت اعمال میدان الکتریکی به سلولهای تومور حائز اهمیت زیادی در درمان است.

۵- تشکر و قدردانی

با توجه به اینکه بخشی از این تحقیق در آزمایشگاه بیوسایبرنتیک دانشگاه لوبلیانا در اسلوانی انجام شده، بدینوسیله از حمایتهای مادی و معنوی همکاران در دانشگاه لوبلیانا کمال تشکر به عمل می آید.

مختلف، بزرگتر باشد. بر اساس نتایج بدست آمده، این مقدار مسلماً به نوع، اندازه و شکل سلولها بستگی دارد و به دلیل چسبیدن سلولهای بافت به یکدیگر و تنوع گسترده شکل هندسی آنها، از نتایج بدست آمده در این تحقیق پیچیدگی بیشتری دارند. همانطور که در مقدمه ذکر شد، بیشتر پروتکل‌های درمانی موجود، بر اساس آزمایشهای انجام شده روی سلولهای سوسپانسیونی به دست آمده. این تحقیق، تفاوت بین الکتروپوریت کردن سلولهای سوسپانسیونی و چسبیده با شکل نامنظم در گسترده‌گی E_T و $ITVC$ و در نتیجه پیچیدگیهای درمان موثر را برای سلولهای توموری نشان می دهد و لزوم بهینه کردن پروتکل‌های درمانی را بیان می کند. بنابراین برای الکتروپوریت کردن سلولهای تومور و نتیجه

منابع

1. Neumann E, Kakorin S, Toensing K. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes Fundamentals of electroporation. *Bioelectrochem Bioenerg* 1999; 48:3-16.
2. Mir LM, Bases and rationale of the electrochemotherapy. *Eur J Cancer Suppl* 2006; 4:38-44.
3. Sersa G, Miklavcic D, Cemazar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *EJSO* 2008; 34(2):232-40.
4. Rols MP. Electropemabilization, a physical method for the delivery of herapeutic molecules into cells. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758(3):423-8.
5. Golzio M, Mazzolini L, Moller P, Rols MP, Teissié J. Inhibition of gene expression in mice muscle by in vivo electrically mediated siRNA delivery. *Gene Therapy* 2005;12:246-51.
6. Lukas J, Bartek J, Strauss M. Efficient transfer of antibodies into mammalian cells by electroporation. *J Immunol Methods* 1994;170: 255-9.
7. Bobanovic F, Bootman MD, Berridge MJ, Parkinson NA, Lipp P. Elementary $[Ca^{2+}]_i$ signals generated by electroporation functionally mimic those evoked by hormonal stimulation. *FASEB J* 1999; 13: 365-76.
8. Pucihar G, Kotnik T, Teissié J, Miklavčič D. Electropemabilization of dense cell suspensions. *Eur Biophys J* 2007; 36(3):173-85.
9. Shirakashi R, Sukhorukov VL, Tanasawa I, Zimmermann U. Measurement of the permeability and resealing time constant of the electroporated mammalian cell membranes *International Journal of Heat and Mass Transfer*. *ESME J* 2004; 47(21): 4517-24.

10. Teissié J, Golzio M, Rols MP. Mechanisms of Cell membrane Electroporation: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. BBA – General Subjects Special Issue: Biophys Comp Sys 2005; 1724(3): 270-80.
11. Kotnik T, Bobanovic F, Miklavcic D. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields- a theoretical analysis. Bioelectrochem Bioenerg 1997; 43 (2):285-91.
12. Kotnik T, Miklavcic D, Slivnik T. Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields – a method for theoretical analysis and its application. Bioelectrochem Bioenerg 1998; 45:3-16.
13. Kotnik T, Pucihar G, Reberšek M, Miklavcic D, Mir LM. Role of pulse shape in cell membrane electroporation. Biochim. Biophys. Acta (BBA)- Biomembranes 2003;1614(2):193-200.
14. Miklavcic D, Corovic S, Pucihar G, Pavselj N. Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy. EJC Supp 2006; 4 (11):45-51.
15. Gabriel, B, Teissié J. Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electroporated cell membrane. Biophys J 1997; 73:2630–37
16. Teissié J, Rols MP. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation. Biophys J 1993; 65:409–13.
17. Tsong TY, Neumann E, Sowers AE, Jordan CA.. Theory of electroporation. In Electroporation and Electrofusion in Cell Biology. New York, Plenum 1989; 149–64
18. Miklavcic D, Semrov D, Mekid H, Mir LM. A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy. Biochim Biophys Acta 2000; 1523:73-83.
19. Pavlin M, Pavselj N, Miklavcic D. Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system. IEEE Trans. Biomed Eng 49: 605-12, 2002
20. Hibino M, Itoh H, Kinoshita K. Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. Biophys J 1993; 64: 1789-800.
21. Susil R, Semrov D, Miklavcic D. Electric field induced transmembrane potential depends on cell density and organization. Electro. Magnetobiol 1998; 17:391–99.
22. Stewart DA, Gowrishankar TR, Weaver JC. Three dimensional transport lattice model for describing action potentials in axons stimulated by external electrodes. Bioelectrochem 2006; 69:88-93.
23. Gross D, Loew LM, Webb W. Optical imaging of cell membrane potential changes induced by applied electric fields. Biophys J 1986; 50:339–48.
24. Loew, LM Voltage sensitive dyes: Measurement of membrane potentials induced by DC and AC electric fields. Bioelectromag Suppl 1992; 1:179–89.

25. Pucihar G, Kotnik T, Valič B, Miklavčič D. Numerical Determination of Transmembrane Voltage Induced on Irregularly Shaped Cells. *Ann Biomed Eng* 2006; 34 (4):642-52.
26. Čegovnik U, Novaković S. Setting optimal parameters for in vitro electrotransfection of B16F1, SA1, LPB, SCK, L929 and CHO cells using predefined exponentially decaying electric pulses. *Bioelectrochem* 2004; 62: 73-82.
27. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J Biol Chem* 1985; 260: 3440-50.
28. Schwan HP. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv Biol Med Phys* 1957; 5:147-209.
29. Zudans I, Agarwal A, Orwar O, Weber SG. Numerical calculations of single-cell electroporation with an electrolyte-filled capillary. *Biophys J* 2007; 92:3696- 705.
30. Bier M. Resealing dynamics of a cell membrane after electroporation. *Phys Rev E* 2002; 66: 062905.
31. Tönsing K, Kakorin S, Neumann E, Liemann S, Huber R. Annexin V and vesicle membrane electroporation. *Eur Biophys J* 1997; 26:307-18.
32. Valic B, Golzio M, Pavlin M, Schatz A, Faurie C, Gabriel B, Teissie J, Rols MP, Miklavcic D. Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur Biophys J* 2003; 32: 519-28.