

УДК 57.08:632.082



ГРАФОАНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ НЕОБРАТИМОГО ИМПУЛЬСНОГО ПРОБОЯ МЕМБРАНЫ КЛЕТКИ (часть 2)

В.А. Шигимага

Институт животноводства УААН, Харьков

Электропорация мембран живых клеток импульсным электрическим полем предполагает выбор определенных режимов их обработки. Превышение критической величины поля приводит к электропробое мембраны клетки, что определяется по ее проводимости. Аппроксимация экспериментальной зависимости проводимости клетки от напряженности поля, приложенного к мембране, выполнена полиномом нечетной степени. Значения параметров пробоя мембраны клетки получены графоаналитически как координаты точки максимальной кривизны функции полинома.

КЛЕТКА, МЕМБРАНА, ИМПУЛЬС, ПРОВОДИМОСТЬ, ПОЛИНОМ, ПАРАМЕТРЫ ЭЛЕКТРОПРОБОЯ

Введение

Электропорация как метод искусственного повышения проницаемости мембраны клетки уже давно и успешно применяется в различных областях науки и технологии: репродуктивной биологии, биофизике, медицине, животноводстве, растениеводстве и традиционно является предметом биотехнологии.

Реакция живых клеток на приложенное извне электрическое поле вызывает большой интерес исследователей уже длительное время [1–6]. В первой части статьи отмечалось, что применение этого поля требует осторожности для выбора правильных электрических режимов обработки клеток. Для этого нужно знать критические и безопасные параметры воздействия на них. В частности, наложение интенсивного электрического поля поперек мембраны клетки, как полагают, ответственно за мембранный разрыв или обратимые мембранные процессы для некоторых типов повреждений клеток ткани в случаях электрической травмы, которые не могут быть отнесены к джоулеву нагреву. Удлиненные клетки, подобные нервным, особенно уязвимы к такому повреждению [5]. В этой работе исследована простая модель цилиндрической клетки, соответствующей нервной или мышечной. Получена система дифференциальных уравнений первого порядка для мембранного электрического поля, которая объединяет произвольную временную зависимость во внешнем поле и нелинейный мембранный отклик (неомическая проводимость). Поведение этой модели исследовано для различных полей в линейных и сильно нелинейных режимах. Показано, что пиковые поля, предсказанные нелинейной моделью, приблизительно вдвое интенсивнее в условиях травмы с разрывом мембраны, чем таковые в линейном случае.

Многokратная электрическая импульсная электропорация (стимуляция) используется также при изучении нервных волокон [7]. Было исследова-

но повреждение (пробой) мембраны как функции параметров импульса и геометрии электрода, используя флуоресцентную метку на хориоаллантоидной оболочке цыпленка *in vivo* и сетчатке *in vitro*. Данные по этой модели были проверены также на свиной сетчатке *in vitro*. Для некоторых размеров электрода плотность тока при повреждении мембраны была независима от них. Порог повреждения плавно уменьшался с ростом числа импульсов, а на больших электродах при плотности тока, вычисленной по половине длительности импульса, явился характеристикой электропорации [7].

Фундаментальные исследования динамики нейронных сетей – необходимость для понимания, как работает нервная система [8]. Формирование и развитие памяти связаны с изменениями в электрической деятельности нейронов. Чтобы понять суть этих изменений, необходимо провести изучение *in vitro* на отдельных нейронах. Для этого разрабатываются специальные системы микроэлектродов, пространственно выстраивающих упорядоченные нейроны путем генерации градиентного поля в диэлектрофоретических ловушках [8, 9]. Необходимо отметить, что параметры поля при этом, безусловно, должны быть значительно ниже пробоя мембраны. Однако этот порог точно не определялся. Тем не менее, была зарегистрирована внеклеточная электрическая активность отдельного нейрона и снят ее спектр с использованием быстрого Фурье-преобразования, чтобы определить нормы всплеска деятельности индивидуальных нейронов [8].

Для нормальной функции центральной нервной системы критическое значение имеет поддержание объема мозговой клетки [10]. В обзоре рассматривается, как проходит регулирование объема клетки, прежде всего, в ответ на изменение осмолярности жидкости тела. Мозговые клетки противостоят тенденции набухать или сжиматься путем соответствующей настройки их внутреннего

осмотического потенциала [10]. Каким же образом клетка регулирует свой объем? Это достигается за счет сброса или ввода неорганических ионов и низкомолекулярных органических веществ, что почти наверняка происходит за счет управляемого гуморально изменения проницаемости мембраны. Отсюда следует замечательная возможность внешнего управления проницаемостью нервных клеток, а значит и некоторыми функциями мозга, посредством обратимой электропорации.

Известно, что высокая напряженность внешнего поля может индуцировать также высокий потенциал снаружи мембраны клетки [1, 2]. При электропорации потенциалы мембраны снаружи и внутри выравниваются, мембранный потенциал становится постоянным из-за перехода ее от состояния изолирования к высокой проводимости и проницаемости [11]. При этом, как полагают, создаются поры, через которые различные молекулы могут транспортироваться внутрь и наружу клетки [6, 11]. За расширением пор или созданием многих мелких пор поперек некоторой части мембранной поверхности может последовать разрыв мембраны. В неоднородных электрических полях трудно предсказать электропорлируемую мембранную область [11]. Поэтому в этой работе индуцированный мембранный потенциал и мембранная область, где этот потенциал превышает пробойный уровень, исследованы путем моделирования. Результаты экспериментов, в которых был обнаружен коллапс нейронных клеток, были сопоставлены с вычисленной напряженностью поля, чтобы исследовать мембранный пробой или разрыв. Обнаружено, что в неоднородном поле разрыв мембраны зависит от ее положения, особенно при более высоких пробойных уровнях. Это указывает на то, что размер мембранного участка, который подвергается электропорации, определяет его разрыв [11].

Ранее предпринимались попытки оценить требуемое напряжение между электродами для адекватного воздействия на клетки мозга, например, при электрошоковой терапии [3]. Показано, что это напряжение в 2–3 раза больше, чем потенциалы мембраны, при которых происходит их электрический пробой. В работе теоретически обоснована связь напряжения между электродами с мембранным потенциалом отдельных нейронов. Оказалось, что для некоторых нейронов вычисленные значения превышают уровень пробоя. Исследование показало, что электрический пробой действительно имеет место при электрошоке. Предположено, что электрический пробой мог бы отчасти объяснить сам электрошок и некоторые его побочные эффекты [3].

Проводились также исследования повреждающего действия электрического поля на клетки через нетепловые механизмы [4]. Предположено, что

для многих видов электрической травмы местное электрическое поле имеет достаточную величину, чтобы вызвать электрический пробой мембран и лизис клетки. Для иллюстрации значения размера клетки и ее ориентации относительно силовых линий поля проанализирована геометрически простая модель вытянутой клетки. Теоретически показано, что большие (удлиненные) клетки, например, нервные, более уязвимы к электрическому пробую [4].

Измерение сопротивления (проводимости) — важный метод для оценки электрических контактов между культивируемыми клетками и подложкой с внедренными микроэлектродами [12]. Это подходит для любого типа клеток, будь то нейроны или нет. Однако правила перевода измеренного сопротивления в параметры успешной стимуляции, то есть установление потенциала действия, не известны. Поэтому предложен метод для обнаружения активных мембранных токов по внеклеточному току стимуляции. Метод базируется на предсказании линейной части отклика на приложенный стимулирующий импульс тока, используя модель импеданса нейрон-электродного контакта. Требуемые параметры модели импеданса получены путем его спектроскопии или непосредственно из измеренных откликов. Обнаружены активные мембранные токи в нелинейном отклике, полученные вычитанием предсказанного линейного отклика из измеренного [12]. Здесь также, безусловно, внешняя импульсная стимуляция должна быть значительно ниже порога пробоя мембраны, что легко предварительно определить по измеряемому току, но в этой работе такое измерение, по видимому, не проводилось.

Интересно применение электропорации в качестве метода загрузки нейронов чувствительным к кальцию красителем с целью изучения миграции этого иона в нейронной сети [13]. Описано использование метода на изолированном спинном мозге новорожденной мыши *in vitro*. Эта техника приводит к быстрой и полной маркировке нейронов для наблюдения за их деятельностью во всех глубинах спинного мозга и определяется положением и размером электродов. Электропорация прерывает местные рефлекс и функцию сети ненадолго (приблизительно на 1 ч), после чего они восстанавливаются [13]. Возможно, было бы корректнее сначала определить более безопасные параметры электропорации для ускорения восстановления жизненных функций.

Вообще говоря, жизнеспособность клетки, подвергнутой действию внешнего поля, должна быть обязательно всесторонне исследована. Мембранный потенциал, индуцированный этим полем, играет критическую роль в сохранении жизнеспособности. Мембрана может быть фактически пред-

ставлена емкостью с параллельно подключенным большим сопротивлением. При высоких индуцированных потенциалах это представление для мембраны больше не действительно. В этой точке пробой мембраны обычно и происходит [9].

Создание мелких отверстий, называемых порами — необходимая предпосылка для истечения медиатора из синаптических пузырьков. Известно, что высокая интенсивность электрического поля может создать поры в пузырьках за счет электропорации [14]. Благодаря скоплению заряженных молекул фосфатидилсерина на внутренней части мембраны, могло бы возникнуть достаточно сильное электрическое поле, способное вызвать самоэлектропорацию синаптического пузырька. В предположении плоской геометрии мембраны показано, что поля, достаточные, чтобы вызвать электропорацию, могут возникнуть в межмембранных зазорах меньше, чем 3 нм. Несмотря на то, что мембрана в целом не плоска, но в том месте, где в пузырьке возникает отверстие, она близка к этому. Обнаружено также, что поля, превышающие порог электропорации, возникают на расстоянии 2 нм или меньше, подтверждая заявление, что самоэлектропорация могла бы быть возможным механизмом для формирования поры [14].

Как следует из анализа доступной литературы, по этому направлению все еще мало аналитических методов определения параметров пробоя мембраны, поэтому и в аспектах научных исследований и в практических приложениях эта задача по-прежнему вызывает интерес. Тем более, что на сегодня пока не существует полного понимания природы электропорации и обусловленной ею дополнительной проницаемости мембраны [6], особенно в неуправляемых режимах пробоя с необратимыми последствиями для мембраны и клетки в целом [9]. Тем не менее, этот запредельный режим с успехом используется в медицине, например, для терапии опухолей мозга [15] или подавления эпилепсии [3].

В то же время есть возможность аналитического подхода к экспериментальным исследованиям электропорации от начальных этапов до необратимого пробоя мембраны по измеренным и вычисленным параметрам проводимости с целью дальнейшего их использования, например, в технологии управления нейротрансфером или нейротерапии.

Несмотря на краткость этого, далеко неполного обзора, становится очевидной необходимость разработки объективных методов определения параметров электропробоя мембраны клетки.

1. Цель и задачи исследования

В качестве ближайшего аналога (прототипа) предлагаемого метода, который описан ниже, выбран метод, описанный в первой части статьи [16].

Напомним вкратце его суть. В капле среды располагают исследуемую клетку между микроэлектродами, подают на них импульсы напряжения с возрастающей от нуля амплитудой и определяют зависимость проводимости клетки от напряженности поля. Полученную зависимость проводимости от напряженности поля аналитически аппроксимируют двумя прямыми и вычисляют координаты точки их пересечения, которые считают значениями параметров электропробоя мембраны клетки.

Однако этот метод не обеспечивает достаточной точности вычисления параметров электропробоя мембраны. Это объясняется особенностью линейной аппроксимации двумя прямыми такой существенно нелинейной функции, как проводимость клетки в возрастающем импульсном электрическом поле. Линейная аппроксимация двумя пересекающимися прямыми двух ветвей этой функции (до и после пробоя) дает несколько смещенные координаты точки предполагаемого электропробоя, а именно, заниженное значение проводимости и завышенное — напряженности. Это происходит потому, что точка пересечения прямых при такой аппроксимации ложится ниже и правее той части кривой проводимости, где она начинает резко расти, то есть там, где ее кривизна максимальна. При малых скоростях роста проводимости клетки в области электропробоя этим смещением координат можно практически пренебречь, но при больших скоростях роста оно становится особенно заметным и уже требует учета. Кроме того, в последнем случае, вследствие отсутствия фиксации, клетка часто начинает либо поворачиваться, либо ее выталкивают из межэлектродного пространства реактивные силы, возникающие вследствие истечения компонентов цитоплазмы сквозь сильно электропорированную мембрану, то есть клетка теряет неподвижность. Тем самым нарушается геометрия эксперимента и его продолжение становится просто некорректным. Поэтому и возникла необходимость разработки более продвинутого метода.

Цель статьи — представить второй из разработанных графоаналитических методов определения параметров необратимого электропробоя мембраны клетки, реализованный с помощью более сложной математической модели, которая позволяет использовать также известные программные продукты, но получаемые при этом результаты оказываются точнее и информативнее.

В первой части статьи был рассмотрен простой метод для определения параметров электропробоя и только. В этой части предлагается более сложный метод обработки данных, который позволяет определить не только эти параметры, но и может обеспечить вычисление промежуточных допробойных параметров электропорации. Эти последние как

раз и необходимы для реализации различных практических приложений электропорации, например, загрузки клеток различными веществами с тем, чтобы они остались живыми и полностью функциональными.

2. Методика

Проводимость клеток в линейно возрастающем импульсном поле определена с помощью аппаратуры и по методике, которые подробно описаны ранее [17, 18].

Удобной моделью исследования снова послужили довольно крупные и легко доступные одиночные клетки — ооциты (яйцеклетки) мыши. Клетка размещалась в капле среды между микроэлектродами на предметном стекле микроскопа. Микроэлектроды выполнены из золотой проволоки, запаянной в стеклянный капилляр, закреплены в манипуляторах и юстированы соосно в поле зрения инвертированного микроскопа.

Построение графиков по экспериментальным точкам выполнено с помощью программного пакета Microsoft Excel 2000 v.9.0. Подгонка по ним аппроксимирующих уравнений полиномов выполнена с помощью прикладной программы TableCurve v.1.10. Координаты точки, отвечающей необратимому пробое мембраны, получены визуально на графике подогнанного полинома по максимуму кривизны в области резкого роста функции. Ниже в качестве примеров приведены рассчитанные по этому алгоритму параметры электропробоя мембран ооцитов мыши в диэлектрических растворах маннита.

3. Результаты и обсуждение

В основу разработанного метода поставлен усовершенствованный способ определения параметров электропробоя мембраны клетки [19]. Суть усовершенствования состоит в нелинейном анализе экспериментальной зависимости ее проводимости от напряженности поля, который проводят путем аппроксимации проводимости полиномом нечетной степени не ниже 5, а затем вычисляют его максимальную кривизну в точке, координаты которой и считают значениями параметров электропробоя [20].

Сущность метода поясняется графиком. На нем изображены экспериментальные точки зависимости проводимости ооцитов мыши от напряженности импульсного поля в 0,3М и 0,4М водных растворах маннита при температуре 25 °С.

На обеих зависимостях приведены также соответствующие кривые аппроксимирующих полиномов, которые в обозначенных на графике точках их максимальной кривизны дают координаты параметров электропробоя мембраны клетки при данной молярности раствора маннита.

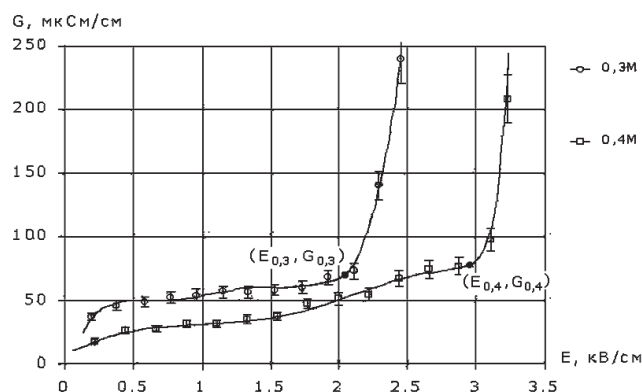


Рис. График зависимости проводимости ооцитов мыши от напряженности импульсного поля в 0,3 и 0,4М манните. Экспериментальные точки сглажены полиномами 7 и 5 степени соответственно

Метод реализуется следующим образом. Между микроэлектродами, погруженными в среду, помещают исследуемую клетку — ооцит. Микроэлектроды слегка поджимают, тем самым фиксируя клетку, и подают на них известное линейно возрастающее импульсное напряжение. По измеренным значениям напряжения и тока через клетку рассчитывают ее проводимость и строят график зависимости проводимости от напряженности. Затем, используя, например, пакет Excel, проводят аппроксимацию полученной зависимости полиномом нечетной степени не ниже 5:

$$G = a + bE + cE^2 + dE^3 + eE^4 + fE^5, \quad (1)$$

где G и E — текущие переменные — проводимость клетки и напряженность поля соответственно; a, b, c, d, e и f — свободный член и коэффициенты при степенях E соответственно.

Возможна также аппроксимация полиномом степени 7 и выше в зависимости от требуемого критерия согласия модельной функции с экспериментальными точками. Полиномы четной степени не используют, поскольку они не имеют физического смысла по причине резкого роста вблизи нуля. Далее по известной формуле дифференциальной геометрии определяют кривизну полученного полинома как функцию напряженности поля:

$$K = \frac{G''}{[1 + (G')^2]^{3/2}} = f(E), \quad (2)$$

где K — текущая кривизна полинома; G' и G'' — первая и вторая производные полинома соответственно.

Затем проводят анализ функции кривизны полинома $K = f(E)$ на наличие максимума, то есть выполняют необходимое условие, которое требует равенство нулю первой производной этой функции:

$$K' = f'(E) = 0. \quad (3)$$

Решая соответствующее степенное уравнение, получают несколько корней, из которых выбирают наибольший — абсциссу точки максимальной кривизны полинома, то есть напряженность поля, при которой случается необратимый пробой мембраны клетки. Подставляя полученное значение напряженности пробоя в исходное уравнение полинома, определяют ординату — значение проводимости клетки при пробое мембраны. Вычисленные значения координат максимума кривизны считают началом необратимого разрыва мембраны, то есть параметрами ее электропробоя. Решение уравнения (3) можно получить, например, с помощью программы MathCad, однако, проще и с не худшей точностью можно визуальнo найти точку максимума кривизны по графику $K = f(E)$. Еще проще сразу визуальнo найти эту точку и непосредственно по графику подогнанного полинома $G(E)$, как описано ниже, находясь в среде TableCurve и оправдывая название метода — графоаналитический.

Пример 1. Получена экспериментальная зависимость проводимости ооцита мыши от напряженности поля в 0,4М манните. Проведена аппроксимация этой зависимости по уравнению (1), но обратным полиномом 5 степени:

$$G^{-1} = 0,094 - 0,226E + 0,313E^2 - 0,204E^3 + 0,061E^4 - 0,007E^5,$$

где G и E — текущие переменные — проводимость клетки и напряженность поля соответственно.

Критерием согласия аппроксимирующего полинома с экспериментом взят коэффициент детерминации, составивший $R^2 = 0,994$.

Далее по графику полинома, построенному программой TableCurve, путем перемещения указателя текущих координат визуальнo подобрана точка максимальной кривизны полинома, координаты которой автоматическi отображаются указателем. Таким образом, определенные графоаналитическим методом параметры электропробоя мембраны ооцита мыши в 0,4М манните составили: напряженность поля $E_{0,4} = 2,92$ кВ/см, проводимость в момент разрыва мембраны $G_{0,4} = 76,34$ мкСм /см.

Пример 2. Получена экспериментальная зависимость проводимости ооцита мыши от напряженности поля в 0,3М манните. Проведена аппроксимация этой зависимости полиномом 7 степени:

$$G = -47 + 888E - 3348E^2 + 6445E^3 - 6792E^4 + 3965E^5 - 1202E^6 + 148E^7,$$

где G и E — имеют тот же смысл, что в примере 1.

Коэффициент детерминации эксперимент — модель для этого уравнения составил $R^2 = 0,997$.

Далее проведено аналогичное определение координат ($E_{0,3}, G_{0,3}$) точки максимальной кривизны полинома, которое выполнено по такому же при-

нципу, как в примере 1. Получены следующие значения параметров электропробоя мембраны ооцита мыши в 0,3М манните: напряженность поля $E_{0,3} = 2,03$ кВ/см, проводимость в момент разрыва мембраны $G_{0,3} = 67,94$ мкСм /см.

По определенным значениям параметров электропробоя хорошо видно влияние молярности среды на электрическую прочность мембраны ооцита, причем, значительно сильнее меняется напряженность пробоя мембраны клетки, чем ее проводимость.

Таким образом, эти примеры показывают, что предложенный метод позволяет корректнее, в соответствии с выбранной моделью полиномиальной аппроксимации, вычислять параметры электропробоя мембраны клетки. Кроме того, метод позволяет определять также и координаты точек промежуточных экстремумов кривизны по графику полинома, которые являются параметрами обратной электропорации.

Преимущество представленного метода состоит в том, что в отличие от прототипа он не требует предварительной условной разбивки экспериментальной нелинейной зависимости на две ветви по характеру роста (слабый и резкий рост проводимости), для того чтобы провести аппроксимацию. Применение предложенного метода возможно непосредственно к таблице экспериментальных данных без каких-либо предварительных предположений о местонахождении точки необратимого электропробоя (вслепую). К тому же, метод обеспечивает надежную фиксацию клетки путем легкого сжатия между микроэлектродами, что оказывается достаточным для компенсации выталкивающих реактивных сил, возникающих при истечении цитоплазмы в результате сильной электропорации мембраны в области пробоя. Данный метод является, по-видимому, универсальным подходом к анализу экспериментальных нелинейных кривых на предмет поиска координат точек резкого изменения скорости роста (падения) функции при равномерном росте аргумента.

При наличии современной измерительной аппаратуры, ПК и соответствующего программного обеспечения электропорацию мембраны вплоть до пробоя можно автоматическi контролировать в реальном времени путем непрерывного вычисления кривизны функции $G(E)$ с ростом напряженности поля. При этом достижение и превышение критического значения напряженности, определенное по максимуму кривизны, определяет необратимый электропробой, а все предыдущие ее значения — разную степень электропорации мембраны, то есть разную плотность пробойных отверстий в ней [2, 6, 11]. Это открывает возможность интеллектуального автоматизированного управления электропорацией мембраны клетки в зависимости от цели

эксперимента — загрузка в клетку веществ разной природы и размеров, ДНК-технологии, клеточная или тканевая терапия с высвобождением части или всей цитоплазмы (лизис) клетки и тому подобное.

Выводы

1. Предложен метод определения параметров электропробоя мембраны путем аппроксимации полиномом нечетной степени зависимости проводимости клетки от напряженности возрастающего импульсного поля и графоаналитического поиска координат точки максимальной кривизны полинома в области пробоя.

2. Метод позволяет исследовать влияние различных факторов на электрическую прочность мембраны клетки и не требует предварительной оценки массива экспериментальных точек по характеру роста проводимости.

Список литературы: 1. Zimmermann U., Neil G.A. Electromanipulation of cells. N.Y.: CRC Press, 1996. — 375 p. 2. Chang D.C., Chassy B.M., Saunders J.A., Sowers A.E. Guide to Electroporation and Electrofusion. -San Diego.: Academic Press. — 1992. — 581 p. 3. Johansson B. Electrical membrane breakdown: a possible mediator of the actions of electroconvulsive therapy // Med. Hypotheses. — 1987. — V. 24(4). — P. 313-324. 4. Lee RC, Kolodney MS. Electrical injury mechanisms: electrical breakdown of cell membranes // Plast. Reconstr. Surg. — 1987. — V. 80(5). — P. 672-679. 5. Bardos DC, Thompson CJ, Yang YS, Joyner KH. Nonlinear cell response to strong electric fields // Phys. Med. Biol. — 2000. — V. 45(7). — P. 1965-1988. 6. Teissie J, Golzio M, Rols MP. Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of?) knowledge // Biochim. Biophys. Acta. — 2005. — V. 1724(3). — P. 270-280. 7. Butterwick A, Vankov A, Huie P, Freyvert Y, Palanker D. Tissue damage by pulsed electrical stimulation // IEEE Trans. Bio-med. Eng. — 2007. — V. 54(12). — P. 2261-2267. 8. Prasad S, Zhang X, Yang M, Ni Y, Parpura V, Ozkan CS, Ozkan M. Separation of individual

neurons using dielectrophoretic alternative current fields // J. Neurosci. Methods. — 2004. — 135 (1-2). — P. 79-88. 9. Heida T. Electric field-induced effects on neuronal cell biology accompanying dielectrophoretic trapping // Adv. Anat. Em-bryol. Cell Biol. — 2003. — V. 173(III-IX). — P. 1-77. 10. Law R. O. Regulation of mammalian brain cell volume // J. Exp. Zoology. — 2005. — V. 268. — Is2. — P.90-96. 11. Heida T, Wagenaar JB, Rutten WL, Marani E. Investigating membrane breakdown of neuronal cells exposed to nonuniform electric fields by finite-element modeling and experiments // IEEE Trans. Biomed. Eng. — 2002. — V. 9(10). — P.1195-1203. 12. Buitengeweg JR, Rutten WL, Marani E, Polman SK, Ursum J. Extracellular detection of active membrane currents in the neuron-electrode interface // J. Neurosci. Methods. — 2002. — V. 115 (2). — P. 211-221. 13. Bonnot A, Mentis GZ, Skoch J, O'Donovan MJ. Electroporation loading of calcium-sensitive dyes into the CNS // J. Neurophysiol. — 2005. — V. 93(3). — P. 793-1808. 14. Luitel P, Schroeter DF, Powell JW. Self-electroporation as a model for fusion pore formation // J. Biomol. Struct. Dyn. — 2007. — V. 24(5). — P. 495-503. 15. Davalos RV, Mir IL, Rubinsky B. Tissue ablation with irreversible electroporation // Ann Biomed Eng. — 2005. — V. 33(2). — P. 223-231. 16. Шигимага В.А. Графоаналитические методы определения параметров необратимого импульсного пробоя мембраны клетки (ч. 1) // Бионика интеллекта: науч.-техн. журнал. — Харьков. — 2007. — Вып. 2 (67). — С. 84-87. 17. Шигимага В.А. Определение проводимости эмбриональных клеток животных // Проблемы бионики: Всеукр. науч.-техн. сб. — Харьков. — 2003. — Вып. 59. — С. 60-64. 18. Шигимага В.О. Апаратура для електроліття та вивчення провідності клітин // Вісник Харків. держ. техн. ун-ту с/г-ва. — Харків. — 2001. — Вип. 6. — С. 386-389. 19. Пат. кор. мод. № 24210, Україна, G01N 33/483, G01R 27/22. Спосіб визначення параметрів електропробою клітинної мембрани / Шигимага В.О. — 2007. — Бюл. № 9. 20. Пат. кор. мод. № 30272, Україна, G01N 33/483, G01R 27/22. Спосіб визначення параметрів електропробою мембрани клітини за кривизною провідності / Шигимага В.О. — 2008. — Бюл. № 4.

Поступила в редколлегию 11.04.2008