

УДК 51-76: 519.657: 537.312: 57.013

Шигимага В. А.<sup>1</sup>, Мегель Ю. Е.<sup>2</sup>, Коваленко С. В.<sup>3</sup>, Коваленко С. Н.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Д-р техн. наук, ст. научн. сотр., доцент кафедри технічних систем і технологій животноводства ім. Б. П. Шабельника Харківського національного технічного університету сільського господарства ім. Петра Василенко, Харків, Україна

<sup>2</sup>Д-р техн. наук, професор, завідувач кафедри кібернетики Харківського національного технічного університету сільського господарства ім. Петра Василенко, Харків, Україна

<sup>3</sup>Канд. техн. наук, доцент кафедри системного аналізу і інформаційно-аналітичних технологій Національного технічного університету «ХПИ», Харків, Україна

<sup>4</sup>Канд. техн. наук, доцент, доцент кафедри кібернетики Харківського національного технічного університету сільського господарства ім. Петра Василенко, Харків, Україна

## МОДЕЛИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ПАРАМЕТРОВ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ МЕМБРАНЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ В ИМПУЛЬСНОМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ С ИЗМЕНЯЕМОЙ НАПРЯЖЕННОСТЬЮ

**Актуальность.** В работе с помощью методов нелинейной аппроксимации решена задача построения моделей электропорации мембран биологических клеток по экспериментальным зависимостям их удельной электропроводности от напряженности импульсного электрического поля.

**Цель работы** – построение моделей, адекватно описывающих экспериментально полученные нелинейные эффекты проводимости клетки, включая обратимую электропорацию, необратимый электропробой или локальный обратимый электропробой мембран при слиянии двух контактирующих клеток.

**Методы.** В качестве функций, моделирующих экспериментальные данные, выбраны полиномы 8–10 степеней, а критериями оценки параметров электропорации определены координаты локальных экстремумов их кривизны и точек перегиба, которые характеризуют конкретное состояние мембраны клетки при данной напряженности поля. Задача аппроксимации решалась методом наименьших квадратов. Вычисление оценки коэффициентов полиномов производилось методом Гаусса – реализованы прямой и обратный ход. Имеется возможность отыскивать экстремумы полученных полиномов высоких степеней, задавая погрешность вычислений. Для подбора степени полинома использована среднеквадратическая ошибка аппроксимации. Вычислив первые и вторые производные проводимости, рассчитывается текущая кривизна полинома. Полученные предложенными методами значения кривизны позволяют определить точки перегиба кривой для определения электропробоя мембраны клетки.

**Результаты.** Разработано прикладное программное обеспечение, с помощью которого построены полиномиальные модели проводимости биологической клетки в изменяемом по напряженности импульсном электрическом поле и проведен их количественный математический анализ. Все указанные расчеты подтверждаются графиками, часть из которых можно просмотреть в увеличенном масштабе.

**Выводы.** Вычислены параметры электропорации мембраны биологической клетки, полученные путем анализа функции кривизны полиномиальных моделей. Разработанные аналитические методы и программное обеспечение для определения параметров электропорации позволяют рекомендовать их для использования на практике при вычислении числовых значений напряженности поля и проводимости, при которых обеспечиваются конкретные режимы электропорации мембраны биологической клетки.

**Ключевые слова:** импульсное электрическое поле, напряженность, электропорация, мембрана, биологическая клетка, моделирование, алгоритм, аппроксимация, полином.

### НОМЕНКЛАТУРА

$G_{\text{кл}}$  – проводимость клетки;  
 $G_{\text{уд}}$  – удельная проводимость;  
 $G_{\text{эл}}$  – проводимость клетки и среды между микроэлектродом;  
 $G'$  – первая производная полинома;  
 $G''$  – вторая производная полинома;  
 $E$  – напряженность поля;  
 $F_k$  – геометрический параметр микроэлектрода;  
 $K$  – текущая кривизна полинома;  
 $K'$  – первая производная кривизны;  
 $L$  – расстояние между микроэлектродами;  
 $R$  – номинал резистора;  
 $S$  – среднеквадратическая ошибка аппроксимирующего полинома;  
 $S_{(p)}$  – среднеквадратическая ошибка аппроксимирующего полинома степени  $p$ ;

$U_R$  – падение напряжения на последовательном резисторе;

$U_{\text{вх}}$  – напряжение генератора импульсов на входе микроэлектродной ячейки;

$a$  – оцениваемые коэффициенты полинома;

$d$  – диаметр одного из микроэлектродов;

$p$  – степень аппроксимирующего полинома;

$n$  – количество значений в наборах  $E$  и  $G$ .

### ВВЕДЕНИЕ

Импульсное электрическое поле (ИЭП) широко применяется в новейших биотехнологиях для электроманипуляции с биологическими клетками, которая лежит в основе современных методов клеточной и геномной инженерии [1–3]. Основным из методов электроманипуляции является электропорация – адекватное действие на транспортную функцию мембраны клетки путем временного повышения ее проницаемости за счет образования электропор в ИЭП, которое формируется специальной

аппаратурой в жидкой среде с клетками [2–4]. Применение метода электропорации требует обоснования определенных электрических режимов обработки в ИЭП живых биологических клеток так, чтобы они остались функциональными для дальнейшего использования, в частности, в репродукции животных. Значения параметров этих режимов определяются, в первую очередь, электрическими характеристиками мембраны, клетки и жидкой среды. Эти характеристики можно получить в ходе измерений проводимости биологической клетки методом и аппаратурой импульсной кондуктометрии в изменяемом по напряженности ИЭП (ИНИЭП) [5]. Изменяемая напряженность поля обеспечивает различную степень электропорации мембраны и поэтому дает возможность обосновать и рассчитать все необходимые режимы воздействия на клетку по ее изменяющейся проводимости. Это позволяет в рамках единого аппаратно-методического процесса импульсной кондуктометрии не только реализовать известные, но и в перспективе разрабатывать новые приложения электропорации в биотехнологии репродукции животных и биомедицине.

Объект исследования в данной статье – управляемая мембранная проницаемость ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши при электропорации клетки в импульсном электрическом поле с изменяемой напряженностью.

Предмет исследования составляют математические модели аппроксимации кривых полиномами высоких порядков, методы поиска координат локальных экстремумов, их кривизны и точек перегиба, которые характеризуют конкретное состояние мембраны клетки при данной напряженности поля.

Цель исследования – с помощью методов нелинейной аппроксимации и математического анализа исследуется электропроводность биологических клеток, измеренная методом и аппаратурой импульсной кондуктометрии [5].

## 1 ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

С целью теоретического обоснования параметров воздействия на клетки ИНИЭП и режимов электропорации мембраны клетки, а также для предсказания ее поведения при воздействии поля необходимо построить соответствующие модели, адекватно описывающие экспериментально полученные нелинейные эффекты проводимости клетки. В качестве входных параметров выступают значения, измеренные с помощью импульсного кондуктометра –  $U_R, U_{вх}, L, R, F_k$ , которые являются исходными данными для вычисления зависимости проводимости клетки  $G$  от напряженности поля  $E$ . Количество измеренных состояний системы всегда ограничено, поэтому в задаче необходимо использовать аппроксимацию кривых проводимости клетки с помощью полиномов высоких порядков. Для решения задачи требуется разработать программное приложение, которое выполняет все математические расчеты и визуализирует полученные результаты.

Выходными данными системы выступают оценки параметров электропорации, являющиеся расчетными точками на экспериментальных кривых проводимости – экстремумы, точки перегиба и т. п., которые характеризуют конкретное состояние мембраны клетки при задан-

ной напряженности поля – обратимая электропорация, необратимый электропробой или локальный обратимый электропробой мембран при слиянии двух контактирующих клеток [2].

## 2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Математических моделей явления электропорации было построено множество [1–3, 5–10] и все они лишь только в той или иной степени приблизились к описанию эффектов воздействия ИЭП на мембрану реальной биологической клетки. В то же время в известных теоретических моделях проводимость клетки, как естественный индикатор процесса электропорации мембраны, мало используется в качестве параметра [8, 9], а при условии непрерывного действия на мембрану и клетку ИНИЭП почти не рассматривается совсем, за исключением небольшого числа работ [11, 12]. К этому следует добавить, что теоретических моделей электропорации мембраны репродуктивных биологических клеток в ИНИЭП существуют, по-видимому, пока только единицы [10, 13]. Для моделирования электропорации мембран в ИЭП обычно предпочитают использовать простые биологические клетки, например, безъядерные эритроциты, которым посвящена огромная масса исследований, а также совсем простые по устройству и предсказуемые по физическим свойствам искусственные билипидные мембраны (БЛМ) или абстрактные сферические клетки [1–4, 6–9, 11–14]. Намного более сложные по устройству и составу репродуктивные клетки животных (ооциты) и, особенно, многоклеточные эмбрионы очень трудны, как биообъекты, для моделирования эффектов электропорации и электропроводности с применением ИНИЭП. Учитывая то, что эти клетки являются главными биообъектами бурно развивающихся в мире репродуктивной биотехнологии и биомедицины, проблемы построения теоретических моделей, разработки на их основе методов и аппаратуры для определения и прогнозирования электрических характеристик живых клеток на разных стадиях их развития (ооциты, эмбрионы) являются актуальными.

В литературе по электропорации известны лишь единичные работы, в которых также изучался и моделировался электропробой в ИНИЭП, но искусственной БЛМ при линейном росте амплитуды импульсного напряжения на ней [11, 12]. Однако в этом исследовании проводимость, как объективный показатель процесса развития электропорации с ростом напряженности поля, не определялась, а констатировался лишь факт электропробоя БЛМ при превышении установленной критической амплитуды импульса. Кроме того, измерения проводимости и моделирование ее в процессе электропорации мембраны живой биологической клетки в ИНИЭП, а также электропробой, как конечный результат ее взаимодействия с возрастающим по напряженности полем, ранее наших работ, по-видимому, не проводились [5, 10].

Для поиска характерных параметров, определяющих состояние мембраны и ее целостность, можно построить несколько математических моделей, основанных на аппроксимации экспериментальных зависимостей различными функциями. Эти параметры обусловлены технологической необходимостью воздействия на клетки

ИЭП для реализации режимов электрослияния, стимуляции, электропробоя и др. Одна из моделей может быть построена на основе кусочно-линейной аппроксимации, при которой экспериментальная кривая проводимости условно делится на две ветви – квазилинейного роста с небольшой скоростью до пробоя и резкого экспоненциального роста после необратимого электропробоя мембраны. Значения параметров необратимого электропробоя мембраны клетки могут быть получены графоаналитически, как координаты точки пересечения двух аппроксимирующих прямых [10]. Ниже рассмотрен более сложный, но и более информативный, метод математического моделирования экспериментальных данных, который позволяет определить не только параметры электропробоя, но и обеспечивает определение всех промежуточных допробойных параметров обратимой электропорации мембраны клетки. Знание этих параметров дает перспективу интеллектуального управления транспортной функцией мембраны с целью поэтапной и мягкой «загрузки» клетки молекулами различных веществ и размеров, что, собственно, и составляет один из предметов клеточной и геной инженерии [1–3].

### 3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование и математический анализ параметров электропорации и электропробоя мембраны выполнены с использованием массивов первичных данных измерений, полученных в ходе экспериментов на модельном объекте, репродуктивных клетках мыши (ооцитах, эмбрионах) с помощью комплекса импульсной кондуктометрической аппаратуры для определения удельной электропроводности биологических клеток [10].

Измерения проводимости биологических клеток (ооцитов и эмбрионов мыши) выполнены посредством импульсного кондуктометра [5]. Схема измерения первичных электрических параметров показана на рис. 1.

Проводимость биологической клетки, находящейся между микроэлектродами импульсного кондуктометра определяется по следующим формулам [5]:

$$G_{эл} = \frac{U_R}{R(U_{вх} - U_R)}. \quad (1)$$

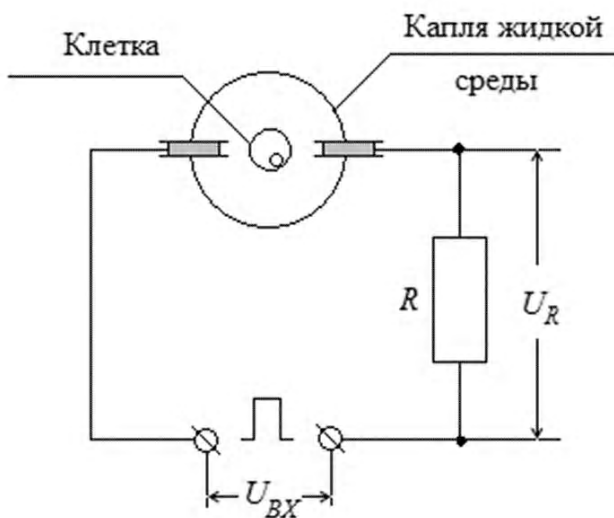


Рисунок 1 – Первичные измеряемые электрические параметры

Для вычисления удельной проводимости  $G_{уд}$  полученное значение (1) необходимо умножить на геометрический параметр микроэлектродов  $Fk$  (2). Для получения собственной удельной проводимости клетки  $G_{уд}$ , находящейся в жидкой среде, из общей проводимости вычитают удельную проводимость среды, предварительно измеренную в капле без клетки (3).

$$Fk = \frac{12 \left( 1 + \sqrt{1 + \frac{4L^2}{d^2}} \right)}{\pi \left[ 3 \frac{d^2}{L} \left( 1 + \sqrt{1 + \frac{4L^2}{d^2}} \right) + 4L \right]}. \quad (2)$$

$$G_{кл} = G_{уд} - G_{ср}. \quad (3)$$

Далее наносят значения проводимости клетки на график  $G_{кл} = f(E)$  в зависимости от напряженности поля  $E$ , которую вычисляют по формуле:

$$E = \frac{U_{вх} - U_R}{L}. \quad (4)$$

### 4 ЭКСПЕРИМЕНТЫ

Построение графиков по экспериментальным точкам выполнено с помощью табличного процессора Microsoft Excel. Необходимость разработки собственного программного обеспечения связано с отысканием коэффициентов полиномов высоких степеней, тогда как стандартные пакеты, обычно, ограничиваются шестой степенью.

В основу полиномиальной модели положен усовершенствованный способ определения параметров электропробоя мембраны клетки [10]. Суть усовершенствования состоит в нелинейной аппроксимации экспериментальной зависимости проводимости клетки от напряженности поля путем моделирования кривой проводимости полиномом высокой степени. Для решения задачи был использован метод наименьших квадратов, предполагающий решение системы линейных алгебраических уравнений (5) относительно наборов значений  $E$  и  $G$ .

$$\begin{cases} a_0 n + a_1 \sum_{i=1}^n E_i + a_2 \sum_{i=1}^n E_i^2 + \dots + a_p \sum_{i=1}^n E_i^p = \sum_{i=1}^n G_i, \\ a_0 \sum_{i=1}^n E_i + a_1 \sum_{i=1}^n E_i^2 + a_2 \sum_{i=1}^n E_i^3 + \dots + a_p \sum_{i=1}^n E_i^{p+1} = \sum_{i=1}^n G_i E_i, \\ \dots \\ a_0 \sum_{i=1}^n E_i^p + a_1 \sum_{i=1}^n E_i^{p+1} + a_2 \sum_{i=1}^n E_i^{p+2} + \dots + a_p \sum_{i=1}^n E_i^{2p} = \sum_{i=1}^n G_i E_i^p. \end{cases} \quad (5)$$

Решение системы (5) осуществили с помощью метода Гаусса, реализовав прямой и обратный ход этого метода [15]. Реализация данного метода позволила вычислять коэффициенты полинома до  $n-1$  степени включительно. К преимуществам метода можно отнести его быстрдействие и использование не значительных ре-

сурсов компьютера. Для исходных данных, заданных в табл. 1 рассчитаем коэффициенты полинома аппроксимации девятой степени.

Полученный полином имеет вид (6) и представлен на рис. 2.

$$G = 21,92 - 38,08E + 116,95E^2 - 190,51E^3 + 181,76E^4 - 93,08E^5 + 18,98E^6 + 2,34E^7 - 1,58E^8 + 0,18E^9. \quad (6)$$

Далее, по известной формуле дифференциальной геометрии определена кривизна полученного полинома, как функция напряженности поля:

$$K = \frac{G''}{\left[1 + (G')^2\right]^{3/2}} = f(E). \quad (7)$$

Таблица 1 – Исходные данные

n	E	G	n	E	G	n	E	G
1	0,23	11,38	6	1,42	19,43	11	2,60	27,25
2	0,47	17,38	7	1,65	21,18	12	2,84	32,40
3	0,71	16,70	8	1,89	20,96	13	3,07	32,03
4	0,94	19,43	9	2,13	21,25	14	3,31	31,72
5	1,18	20,24	10	2,36	21,06	15	3,50	35,32

Затем проведен математический анализ функции кривизны полинома  $K = f(E)$  на наличие максимума, т. е. выполнено необходимое условие экстремума, которое требует равенство нулю первой производной этой функции:

$$K' = f'(E) = 0. \quad (8)$$

Координаты точки, соответствующей необратимому электропробой мембраны, получены с помощью вычисленного максимального значения кривизны кривой. Полученное значение  $K$  для представленного полинома равно 20,3374 – что соответствует значениям  $E = 2,00$  кВ/см и  $G(E) = 20,39$  мкСм/см.

**5 РЕЗУЛЬТАТЫ**

На рис. 3 представлены экспериментальные зависимости удельной проводимости ооцитов и 2-клеточного эмбриона мыши от ИНИЭП, полученные с помощью метода и аппаратуры импульсной кондуктометрии. Морфологически (визуально, с помощью световой микроскопии) все клетки перед измерениями проводимости отнесены к хорошему качеству.

Однако после измерений оказалось, что клетка 3 показала пониженные значения проводимости и небольшой ее наклон к оси напряженности. Электропробой мембраны в ней не наблюдался совсем. Напротив, клет-

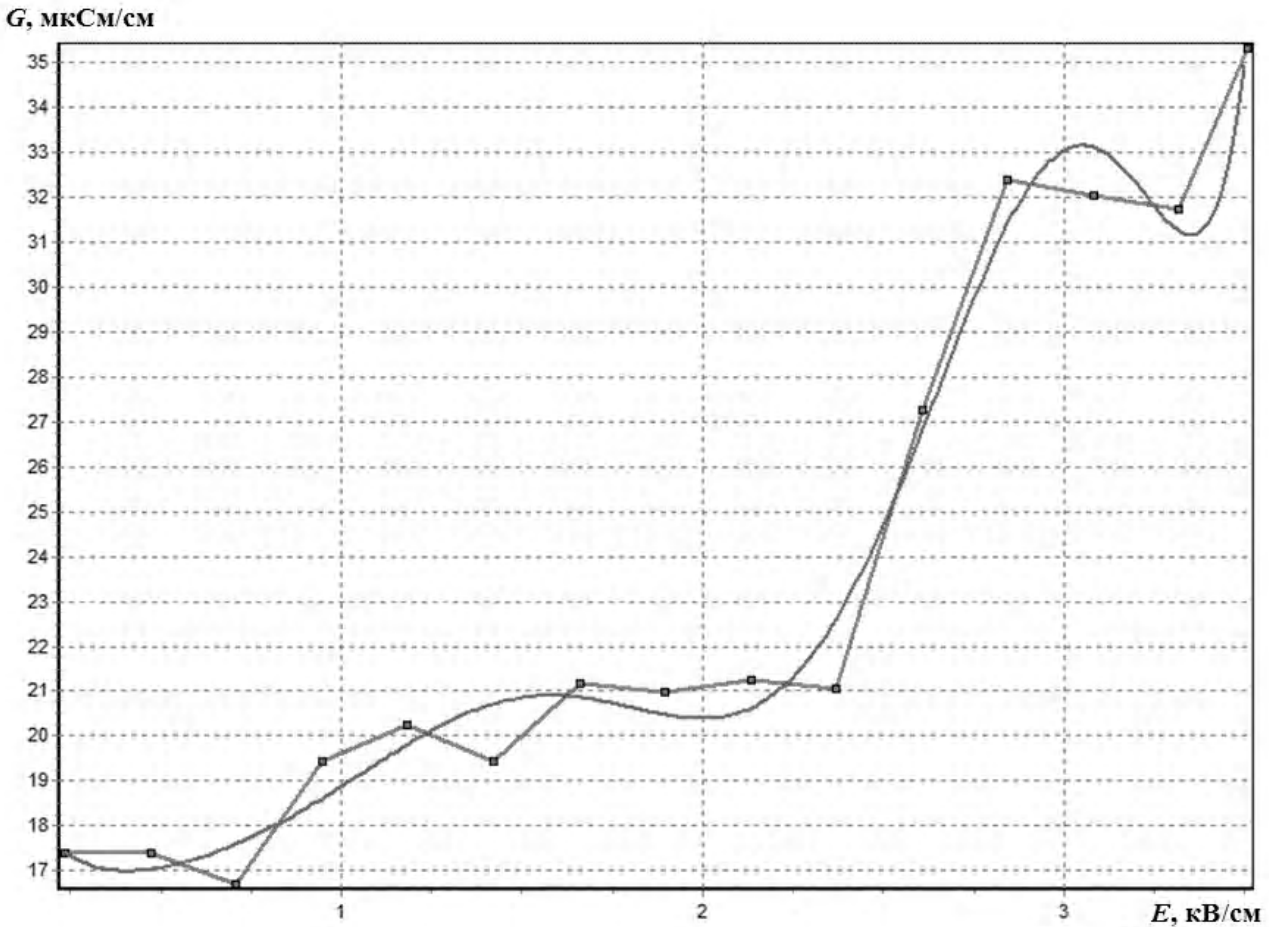


Рисунок 2 – Графики исходных данных и аппроксимирующего полинома девятой степени

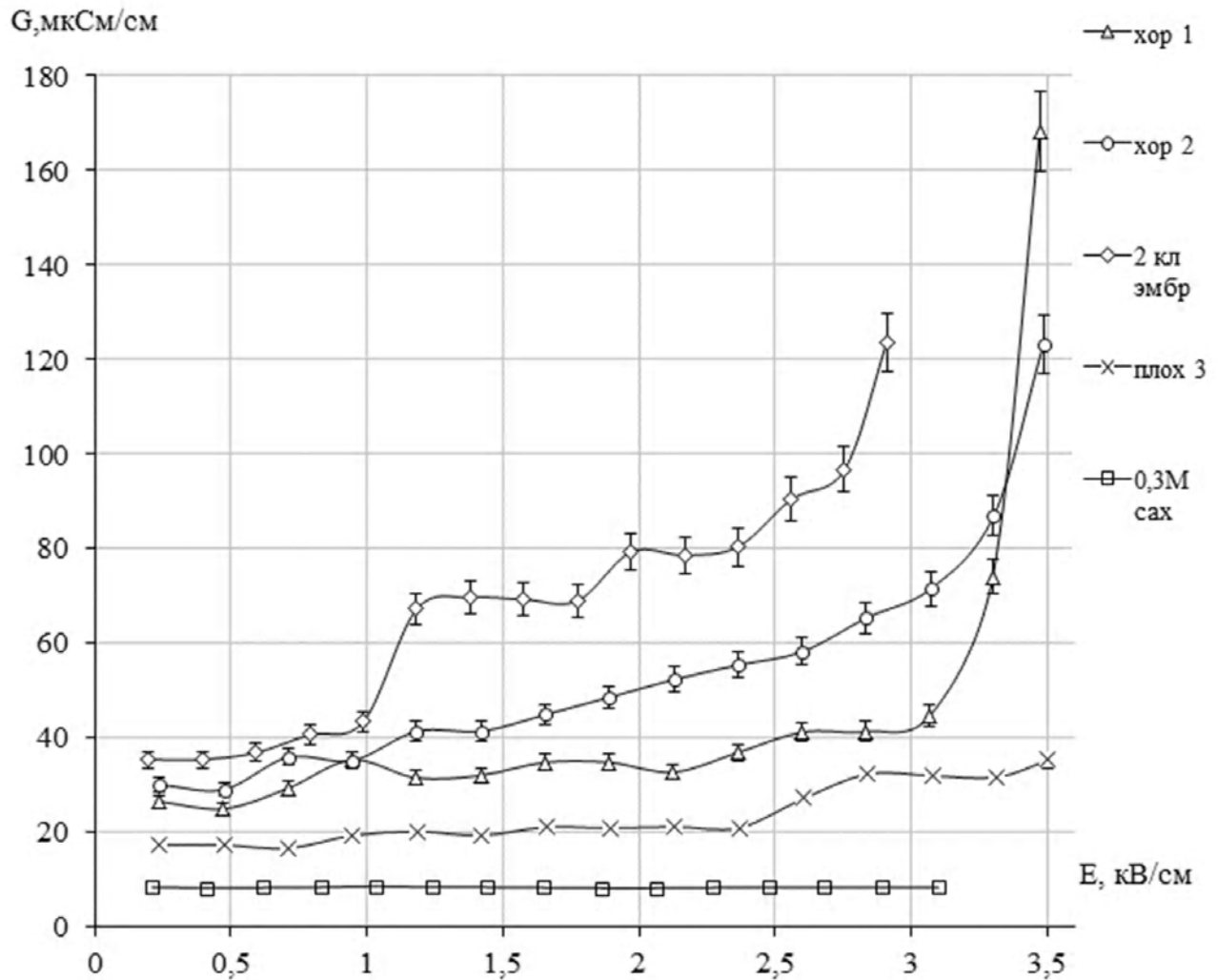


Рисунок 3 – Экспериментальные зависимости удельной проводимости ооцитов мыши разного качества (1,2 – хорошие, 3 – плохой), 2-клеточного эмбриона (4) и 0,3М сахарозы от ИНИЭП

ки 1 и 2 показали наличие электропробоя при напряженности 3–3,3 кВ/см, а также обратимую электропорацию при более низких напряженностях. Ранее нами было установлено, что проводимость может быть использована, как диагностический параметр для оценки качества репродуктивных клеток [16]. Поэтому, согласно данным измерений проводимости, клетки 1 и 2 отнесены к хорошему качеству, а клетка 3 – к плохому. Причем, клетку 2 можно дополнительно классифицировать, как более молодую, поскольку у нее начальная проводимость и наклон к оси напряженности выше, что означает более высокий уровень ионного гомеостаза цитоплазмы. Двухклеточный эмбрион, согласно данным проводимости был хорошего качества, о чем свидетельствует обратимый электропробой мембран контактирующих бластомеров при напряженности около 1,1 кВ/см. На графике для сравнения приведена также зависимость проводимости раствора 0,3 М сахарозы, в котором выполнялись измерения.

Рассмотрим принцип построения математической модели, которая позволяет провести количественный анализ электропорации мембраны по эксперименталь-

ным зависимостям проводимости клеток в ИНИЭП для определения параметров аппаратуры электроманипуляции. Для моделирования и последующего анализа всех экстремумов кривизны и точек перегиба этих зависимостей (от промежуточных, означающих разную степень обратимой электропорации, до главного, означающего необратимый электропробой мембраны) целесообразно применить нелинейную аппроксимацию всей кривой проводимости полиномом высокой степени [10]. На рис. 4 показан интерфейс разработанного программного обеспечения, которое позволяет проводить исследования экспериментальных данных проводимости клеток.

К таким исследованиям отнесены:

- вычисление коэффициентов аппроксимирующего полинома высокой степени (на рис. 4 приведен полином девятой степени);
- определение среднеквадратической ошибки между фактическими данными и значениями аппроксимирующего полинома;
- расчет кривизны кривой и поиск его наибольшего значения;

– вычисление экстремумов и точек перегиба, которые означают конкретный режим электропорации мембраны клетки для полученного аппроксимирующего полинома;

– построение аппроксимирующей прямой и поиск точки пересечения с графиком исходных данных на ограниченном участке.

Применяя полученную полиномиальную модель, координаты точек обратной электропорации и необратимого электропробоя мембраны клеток можно найти, анализируя функцию кривизны аппроксимирующего полинома на всей кривой проводимости. Условие экстремумов функции кривизны (8), которое после дифференцирования уравнения (7) и упрощений приобретает вид:

$$\frac{d^3G}{dE^3} \left[ 1 + \left( \frac{dG}{dE} \right)^2 \right] - 3 \left( \frac{d^2G}{dE^2} \right)^2 \frac{dG}{dE} = 0. \quad (9)$$

Решая соответствующее степенное уравнение, которое получаем после подстановки аппроксимирующего полинома в дифференциальное уравнение (9), находим координаты (напряженности) всех точек кривизны, причем, максимальная кривизна соответствует необратимому пробую, а все промежуточные – это различные степени электропорации мембраны.

На практике целесообразно использовать приближенные методы расчета для поиска экстремумов функции  $G(E)$ . В указанных точках первая производная меняет знак, а, следовательно, можно отыскать корень заданной функции с помощью численных методов [15, 17]. Воспользуемся простым методом дихотомии, который на заранее локализованных интервалах отыскивает экстремум с заданной точностью. Определение того, что минимум или максимум мы отыскали, зависит от знака значения второй производной.

Для объективного анализа полученных данных была проведена аппроксимация экспериментальных кривых проводимости (рис. 3) различными полиномами и их

математическая обработка с целью получения числовых значений напряженности и проводимости клеток на характерных участках. В табл. 2 представлены результаты расчета параметров электропорации и необратимого электропробоя мембраны ооцитов мыши по экстремумам кривизны аппроксимирующих полиномов степеней 8–10. Расчет точек перегиба, в которых значение кривизны (7) равно 0, проведен с помощью численных методов отыскания корней функции. Применение метода дихотомии позволило получить, в частности для 2-клеточного эмбриона, следующие значения, представленные в табл. 3. В качестве аппроксимирующих также были взяты полиномы 8–10 степеней.

**6 ОБСУЖДЕНИЕ**

В разработанном программном приложении имеется возможность выбирать степень аппроксимирующего полинома  $p$  до  $n-1$  включительно. Однако, с возрастанием степени полинома, увеличивается количество ложных экстремумов. Это связано с приближением полинома к узловым точкам исходных данных. Для ограничения разности вводится средняя квадратическая ошибка:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (E_i - \hat{E}_i)^2}{n-p}}. \quad (10)$$

Из формулы (10) следует, что, начиная с некоторого значения величины  $p$ , значение ошибки аппроксимации будет увеличиваться. Для всех проведенных расчетов таким граничным значением степени полинома оказалось  $p = 10$  – после данного значения величина  $S$  начала увеличиваться (для некоторых объектов очень резко). Например, для 2-клеточного эмбриона  $S_{(p=8)} = 5,247$ ;  $S_{(p=9)} = 5,027$ ;  $S_{(p=10)} = 4,502$  и  $S_{(p=11)} = 23,250$ . Поэтому в расчетах было принято решение ограничиться степенями полинома 8–10.

Таблица 2 – Результаты применения аппроксимирующих полиномов

Параметр		Напряженность, E кВ/см			Проводимость, G, мкСм/см			Усредненные значения	
		Степень полинома, p			Степень полинома, p				
клетка	процесс	8	9	10	8	9	10	E кВ/см	G, мкСм/см
ооцит 1	обратимая электропорация пробой	0,38	0,41	0,60	16,88	16,99	15,69	0,46	16,52
		–	–	1,34	–	–	19,62	1,34	19,62
		2,01	1,99	2,19	20,36	20,39	20,52	2,06	20,42
		3,34	3,35	3,22	31,23	31,17	30,84	3,30	31,08
ооцит 2	обратимая электропорация пробой	0,35	0,35	0,42	22,32	22,27	24,46	0,37	23,03
		1,22	1,21	1,34	32,84	32,82	32,38	1,26	32,68
		–	–	2,09	–	–	34,46	2,09	34,46
		–	–	2,97	–	–	42,69	2,97	42,69
2 клет. эмбрион	слияние	–	0,26	0,27	–	34,03	21,35	0,26	27,69
		0,57	0,60	0,74	34,72	36,41	35,33	0,64	35,29
		–	1,73	1,58	–	71,35	68,95	1,65	70,15

Таблица 3 – Значения напряженности поля, соответствующие точкам перегиба

Степень полинома	Точки перегиба, для $K=0$							
	$E_1$	$E_2$	$E_3$	$E_4$	$E_5$	$E_6$	$E_7$	$E_8$
$p=8$	0,41	–	0,99	–	1,71	2,26	2,49	–
$p=9$	0,33	0,55	1,05	–	1,64	2,11	2,45	–
$p=10$	0,33	0,60	0,99	1,48	1,86	2,19	2,54	2,72

Из табл. 2 следует, что электропробой мембран ооцитов 1 и 2 произошел при напряженности поля  $E=3,30$  кВ/см и  $E=2,97$  кВ/см соответственно, а меньшие значения напряженности для этих клеток означают различные стадии обратимой электропорации.

Из табл. 3 следует, что для 2-клеточного эмбриона электропробой мембраны произошел при напряженности поля  $E \geq 2,5$  кВ/см, а меньшие значения напряженности для этой клетки означают соответственно слияние двух blastomeres при  $E=1,05$  кВ/см и различные стадии обратимой электропорации ( $E=0,55; 1,64$  и  $2,11$  кВ/см).

Перспектива нелинейного подхода к моделированию и анализу проводимости биологических клеток в ИНИЭП состоит в следующем. Открывается возможность разработки аппаратуры автоматической дифференциальной кондуктометрии, при которой проводимость клетки прямо в процессе измерения аппроксимируется полиномами и вычисляются точки их кривизны и/или перегиба, т.е. значения напряженности всех точек электропорации мембраны от обратимых до необратимого электропробоя. Первые (обратимые) могут применяться для различных электроманипуляций с живой клеткой. Второй (необратимый) – для точечного лизиса клеток с утраченным механизмом природного апоптоза, например, онкологических.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны аналитические методы и программное обеспечение для определения параметров электропорации мембраны биологической клетки, основанные на аппроксимации полиномиальными моделями экспериментальной зависимости проводимости клетки от напряженности ИНИЭП.

2. Вычислены параметры электропробоя и электропорации, полученные путем анализа функции кривизны полиномиальных моделей. Найденные параметры электропорации можно использовать в качестве режимов воздействия ИНИЭП на биологические клетки. Эти режимы необходимы и достаточны для аппаратной реализации методов электроманипуляции, основанных на явлении электропорации клеточной мембраны.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Колесниковой А.А., к. б. н., ст. н. с. Института животноводства НААН (г. Харьков), за помощь при манипуляциях с биологическими клетками.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Handbook of Electroporation / Ed. D. Miklavcic. – Springer International Publishing Switzerland, 2017. – 2316 p.

2. Pakhomov A. G. Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine / A. G. Pakhomov, D. Miklavcic, M. S. Markov. – NY. : CRC Press, 2010. – 528 p.
3. Weaver J. C. Electroporation / J. C. Weaver, Yu. Chizmadzhev // Biological and Medical Aspects of Electromagnetic Fields. – NY. : CRC Press, 2007. – P. 293–321.
4. An Engineered Membrane to Measure Electroporation: Effect of Tethers and Bioelectronic Interface / [W. Hoiles, V. Krishnamurthy, C. G. Cranfield, B. Cornell] // Biophysical Journal. – 2014. – Vol. 107(6). – P. 1339–1351.
5. Shigimaga V. A. Pulsed conductometer for biological cells and liquid media / V. A. Shigimaga // Measurement Techniques. – N.Y. : Springer, 2013. – Vol. 55, No. 11. – P. 1294–1300.
6. Electroporation of archael lipid membranes using MD simulations / [A. Polak, M. Tarek, M. Tomsic et al] // Bioelectrochem. – 2014. – No. 100. – P. 18–26.
7. Miklavcic D. Network for Development of Electroporation-Based Technologies and Treatments / D. Miklavcic // Journal of Membrane Biology. – 2012. – Vol. 245. – P. 91–598.
8. Morshed B. I. Deriving an electric circuit equivalent model of cell membrane pores in electroporation / B. I. Morshed, M. Shams, T. Mussivand // Biophysical Reviews and Letters – 2013. – Vol. 8, No. 1. – P. 21–32.
9. Electric fields within cells as a function of membrane resistivity – a model study / [B. J. Mossop, R. C. Barr, D. A. Zaharoff, F. Yuan] // IEEE Transactions on NanoBioscience. – 2004. – Vol. 3, No. 3. – P. 225–231.
10. Шигимага В. О. Біотехнічний комплекс імпульсної кондуктометрії і електроманіпуляції з клітинами тварин : автореф. дис. на здобуття д-ра техн. наук : спец. 05.11.17 «Біологічні та медичні прилади і системи» / В. О. Шигимага. – Харків, 2014. – 36 с.
11. Kramar P. Determination of the lipid bilayer breakdown voltage by means of linear rising signal / P. Kramar, D. Miklavcic, A. M. Lebar // Bioelectrochemistry. – 2007. – Vol. 70, No. 1. – P. 23–27.
12. Electroporation of Planar Lipid Bilayers and Membranes / [M. Pavlin, T. Kotnik, D. Miklavcic, P. Kramar et al] // Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes. – 2008. – Vol. 6. – P. 165–226.
13. Equivalent Pulse Parameters for Electroporation / [G. Pucihar, J. Krmelj, M. Rebersek et al] // IEEE Transactions on Biomedical Engineering. – 2011. – Vol. 58, No. 11. – P. 3279–3288.
14. Analytical Computation of Electric Field for Onset of Electroporation / [A. K. Dubey, R. Kumar, M. Banerjee, B. Basu] // Journal of Computational and Theoretical Nanoscience. – 2012. – Vol. 9, No. 1. – P. 137–143.
15. Operations Research / [Y. E. Megel, A. P. Rudenko, S. M. Kovalenko et al]. – Kharkiv : «Miskdruk», 2015. – 388 p.
16. Электрическая проводимость как диагностический параметр оценки качества ооцитов и эмбрионов млекопитающих в биотехнологических операциях / [Е. И. Смольянинова, В. А. Шигимага, О. А. Стриха и др.] // Биофизика живой клетки. – 2014. – Т. 10. – С. 193–195.
17. Operations Research, Calculus of Variations and Optimal Control. Part II / [M. Tarulli, G. Venkov, Y. Megel et al]. – Sofia : Technical University. – Sofia, 2016. – 188 p.

Статья поступила в редакцию 29.03.2017.

После доработки 17.04.2017.

Шигимага В. О.<sup>1</sup>, Мегель Ю. Є.<sup>2</sup>, Коваленко С. В.<sup>3</sup>, Коваленко С. М.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Д-р техн. наук, ст. науковий співр., доцент кафедри технічних систем і технологій тваринництва ім. Б. П. Шабельника Харківського національного технічного університету сільського господарства ім. П. Василенка, Харків, Україна

<sup>2</sup>Д-р техн. наук, професор, завідувач кафедри кібернетики Харківського національного технічного університету сільського господарства ім. П. Василенка, Харків, Україна

<sup>3</sup>Канд. техн. наук, доцент кафедри системного аналізу та інформаційно-аналітичних технологій Національного технічного університету «ХПІ», Харків, Україна

<sup>4</sup>Канд. техн. наук, доцент, доцент кафедри кібернетики Харківського національного технічного університету сільського господарства ім. П. Василенка, Харків, Україна

## МОДЕЛЮВАННЯ ТА АНАЛІЗ ПАРАМЕТРІВ ЕЛЕКТРОПОРАЦІЇ МЕМБРАНИ БІОЛОГІЧНОЇ КЛІТИНИ В ІМПУЛЬСНОМУ ЕЛЕКТРИЧНОМУ ПОЛІ З НАПРУЖЕНІСТЮ, ЩО ЗМІНЮЄТЬСЯ

**Актуальність.** В роботі за допомогою методів нелінійної апроксимації розв'язана задача побудови моделей електропорації мембран біологічних клітин за експериментальними залежностями їх питомої електропровідності від напруженості імпульсного електричного поля.

**Мета роботи** – побудова моделей, що адекватно описують експериментально отримані нелінійні ефекти провідності клітини, включаючи зворотню електропорацію, незворотній електропробій або локальний зворотній електропробій мембран при злитті двох контактуючих клітин.

**Метод.** В якості функцій, що моделюють експериментальні, обрані поліноми 8–10 степеня, а критеріями оцінки параметрів електропорації визначені координати локальних екстремумів їх кривизни і точок перегину, які характеризують конкретний стан мембрани клітини при даній напруженості поля. Задача апроксимації розв'язувалась методом найменших квадратів. Обчислення оцінки коефіцієнтів поліномів здійснене методом Гауса – реалізовані прямий і зворотний хід. Є можливість відшукувати екстремуми отриманих поліномів високих степенів, задаючи похибку обчислень. Для підбору степеня полінома використана середньоквадратична помилка апроксимації. Обчисливши перші і другі похідні провідності, розраховується поточна кривизна полінома. Значення кривизни полінома, що отримані запропонованими методами, дозволяють визначити точки перегину кривої для визначення електропробою мембрани клітини.

**Результати.** Розроблено прикладне програмне забезпечення, за допомогою якого побудовані поліноміальні моделі провідності біологічної клітини в імпульсному електричному полі з напруженістю, що змінюється, та проведено їх кількісний математичний аналіз. Всі указані розрахунки підтверджуються графіками, частину з яких можна переглянути у збільшеному масштабі.

**Висновки.** Обчислено параметри електропорації мембрани біологічної клітини, що отримані шляхом аналізу функції кривизни поліноміальних моделей. Розроблені аналітичні методи і програмне забезпечення для визначення параметрів електропорації дозволяють рекомендувати їх для використання на практиці при обчисленні числових значень напруженості поля і провідності, при яких забезпечуються конкретні режими електропорації мембрани біологічної клітини.

**Ключові слова:** імпульсне електричне поле, напруженість, електропорація, мембрана, біологічна клітина, моделювання, алгоритм, апроксимація, поліном.

Shigimaga V. A.<sup>1</sup>, Megel Yu. Ye.<sup>2</sup>, Kovalenko S. V.<sup>3</sup>, Kovalenko S. M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dr. Sc., Senior Researcher, Associate Professor of the B. Shabelnyk Department of Technical Systems and Livestock Technologies of Kharkiv P. Vasylenko National Technical University of Agriculture, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>Dr. Sc., Professor, Head of the Department of Cybernetics of Kharkiv P. Vasylenko National Technical University of Agriculture, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup>Ph.D., Associate Professor of the Department of System Analysis and Information-Analytical Technologies of National Technical University "KPI", Kharkiv, Ukraine

<sup>4</sup>Ph.D., Associate Professor, Associate Professor of the Department of Cybernetics of Kharkiv P. Vasylenko National Technical University of Agriculture, Kharkiv, Ukraine

## MODELLING AND ANALYSIS OF ELECTROPORATION PARAMETERS OF THE MEMBRANE OF A BIOLOGICAL CELL IN A VARIED INTENSITY PULSED ELECTRIC FIELD

**Context.** The problem of constructing electroporation models for membranes of biological cells by the methods of nonlinear approximation using the experimental dependences of their specific electric conductivity on intensity pulsed electric field was solved in the paper.

**Objective** is a construction of models, which adequately describe the experimentally obtained nonlinear effects of the conductivity of the cell, including reversible electroporation, irreversible electrical breakdown or local reversible electrical breakdown of membranes at the fusion of two contacting cells.

**Method.** Polynomials of 8–10 degrees are chosen as the functions that modelling the experimental ones and the criteria for estimating the parameters of electroporation are the coordinates of the local extrema of their curvature and inflexion points that characterize the specified state of the cell membrane at current field intensity. The approximation problem was solved by the least squares method. The calculation of the estimate of the polynomials coefficients was carried out by the Gaussian elimination – the forward and reverse moves were realized. It is possible to search for extrema of the obtained polynomials of high degrees by specifying a calculation error. The root-mean-square error of the approximation is used for finding the degree of the polynomial. The current curvature of the polynomial is counted by calculating the first and second order derivatives of conductivity. The values of the curvature, which obtained via these methods, make possible to determine the inflexion points of the curve for purpose to determine breakdown of a cell membrane.

**Results.** Applied software was developed, polynomial models of the conductivity of a biological cell in a varied intensity pulsed electric field were constructed and their quantitative mathematical analysis was carried out by using this software. All these calculations are proved by graphs, some of which can be viewed on an enlarged scale.

**Conclusions.** The parameters of electroporation of a biological cell membrane obtained by analysing the curvature function of polynomial models are calculated. The developed analytical methods and software for determining the parameters of electroporation allow us to recommend them for use in practice in calculating the numerical values of the field intensity and conductivity at which specific electroporation regimes of the biological cell membrane are provided.

**Keywords:** pulse electric field, intensity, electroporation, membrane, biological cell, modelling, algorithm, approximation, polynomial.



## REFERENCES

1. Miklavcic Ed. D. Handbook of Electroporation. Springer International Publishing Switzerland, 2017, 2316 p.
2. Pakhomov A. G., Miklavčič D., Markov M. S. Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine. CRC Press, New York, 2010, 528 p.
3. Weaver J. C., Chizmadzhev Yu. Electroporation, *Biological and Medical Aspects of Electromagnetic Fields*. CRC Press, New York, 2007, pp. 293–321.
4. Hoiles W., Krishnamurthy V., Cranfield C. G., Cornell B. An Engineered Membrane to Measure Electroporation: Effect of Tethers and Bioelectronic Interface, *Biophysical Journal*, 2014, No. 107(6), pp. 1339–1351.
5. Shigimaga V. A. Pulsed conductometer for biological cells and liquid media, *Measurement Techniques*, Springer New York, LCC, New York, 2013, Vol. 55, No. 11, pp. 1294–1300.
6. Polak A, Tarek M, Tomsic M, Valant J, Ulrih N. P., Jamnik A, Kramar P, Miklavcic D. Electroporation of archaeal lipid membranes using MD simulations, *Bioelectrochem*, 2014, No. 100, pp. 18–26.
7. Miklavcic D. Network for Development of Electroporation-Based Technologies and Treatments, *Journal of Membrane Biology*, 2012, Vol. 245, pp. 591–598.
8. Morshed B. I., Shams M., Mussivand T. Deriving an electric circuit equivalent model of cell membrane pores in electroporation, *Biophysical Reviews and Letters*, 2013, Vol. 8, No. 1, pp. 21–32.
9. Mossop B. J, Barr R. C, Zaharoff D. A, Yuan F. Electric fields within cells as a function of membrane resistivity – a model study, *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 2004, Vol. 3, No. 3, pp. 225–231.
10. Shygyruga V. O. Biotekhnichniy kompleks impulsnoi konduktometrii i elektromanipuliacii z klitynamy tvaryn : avtoref. dys. na zdobuttia d-ra tekhn. nauk : spets. 05.11.17 “Biologichni ta medychni prylady i systemy”. Kharkiv, 2014, 36 p.
11. Kramar P., Miklavčič D., Lebar A. M. Determination of the lipid bilayer breakdown voltage by means of linear rising signal, *Bioelectrochemistry*, 2007, V. 70, No. 1, pp. 23–27.
12. Pavlin M., Kotnik T., Miklavčič D., Kramar P., Lebar A. Electroporation of Planar Lipid Bilayers and Membranes, *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 2008, No. 6, pp. 165–226.
13. Pucihar G., Krmelj J., Rebešek M., Napotnik T. B., Miklavčič D. Equivalent Pulse Parameters for Electroporation, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2011, V. 58, No. 11, pp. 3279–3288.
14. Dubey A. K., Kumar R., Banerjee M., Basu B. Analytical Computation of Electric Field for Onset of Electroporation, *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, 2012, Vol. 9, No. 1, pp. 137–143.
15. Megel Y. E., Rudenko A. P., Kovalenko S. M., Danilko I. V., Mikhnova O. D. Operations Research. Miskdruk, Kharkiv, 2015, 388 p.
16. Smol'yaninova E. I., Shigimaga V. A., Strixa O. A., Popivnenko L. I., Gordienko E. A. E'lektricheskaya provodimost' kak diagnosticheskij parametr ocenki kachestva oocitov i e'mbrionov mlekopitayushhix v biotekhnologicheskix operaciyax, *Biofizika zhivoj kletki*, 2014, Vol. 10, pp. 193–195.
17. Tarulli M., Venkov G. Megel Y., Kovalenko S., Rudenko A. Operations Research, Calculus of Variations and Optimal Control. Part II. Sofia, Technical University, 2016, 188 p.