

Modeli dvojne poroznosti in njihova raba pri elektroporaciji bioloških tkiv

Samo Mahnič-Kalamiza

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška c. 25, 1000 Ljubljana, Slovenija
E-pošta: samo.mahnic-kalamiza@fe.uni-lj.si

Povzetek. Članek povzema teoretično izgradnjo modela dvojne poroznosti in njegovo uporabo na primeru elektroporacije bioloških tkiv. Modeli dvojne oz. v splošnem mnogotere poroznosti so dobro poznani s področja raziskav obnašanja prsti, poroznih kamnin in vodonosnikov; skratka povsod, kjer je treba popisati zakonitosti premikanja (pronicanja) tekočine skozi porozni material zaradi razlike tlakov tekočine. Manj znano pa je, da je, matematično in fizikalno gledano, tovrstne modele mogoče uspešno aplicirati tudi na drugih področjih, in sicer povsod, kjer nas zanima prenos snovi ali toplote, opravka pa imamo s heterogenim materialom, ki se ga da (v približku) opisati kot material več poroznosti. Tipičen primer s področja elektrotehnike so porozne kovinske pene, pomembne kot sestavni del gorivnih celic. Na enega od takšnih primerov pa naletimo tudi na področju biomedicinske tehnike – problem prenosa snovi in toplote v elektroporiranem tkivu. Tkivo, sestavljeno iz celic in medceličnega prostora, se namreč obnaša kot material dveh spremenljivih poroznosti – eno od teh narekujejo lastnosti zunajceličnega prostora, drugo pa lastnosti membrane. Članek poda teoretično razlago, kako s stališča masnega transporta na elektroporirano tkivo lahko gledamo kot na porozni material, ter se na kratko dotakne tudi problema prevajanja toplote skozi elektroporirano tkivo; z drugimi besedami, prek analogije v modelih poskušamo ugotoviti, ali ima elektroporacija celične membrane znatne posledice na sposobnost tkiva, da prevaja toploto.

Ključne besede: dvojna poroznost, matematično modeliranje, difuzija, iztiskanje tekočine, prenos snovi in toplote

Dual-porosity models and their use in biological tissue electroporation

The paper reviews the theoretical aspects of dual-porosity models and their use in plant and animal tissue electroporation. Models of a multiple porosity are mostly used in the research of soils, porous rocks, and aquifers to mathematically determine the transport (seepage) of a liquid or gaseous medium through their porous structures driven by the law of the pressure differential. There are, however, several other fields dealing with multiple porosity, where such models could be efficiently applied. Two such fields are electrical and biomedical engineering. In the former, the models could be used for study of porous metallic foams, applied in high-efficiency energy storage (fuel cells), and in the latter to solve the issue of mass and heat transfer in electroporated tissue. Biological tissue (composed of cells and the extracellular space), behaves more or less as a material of a variable porosity governed by the properties of the extracellular space, and of the membrane. The paper provides a theoretical background to viewing biological tissue as a material of a variable porosity and investigates the possibility of using dual-porosity models to understand to what extent electroporation of the cell membrane affects the thermal conductivity of biological tissue.

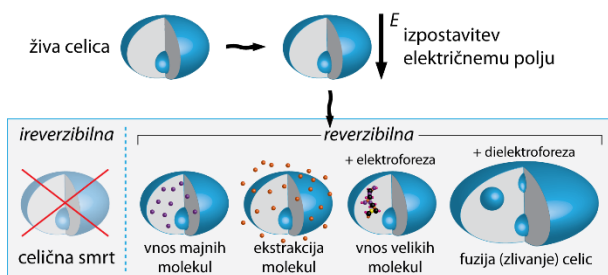
Keywords: double porosity, mathematical modelling, diffusion, liquid expression, heat and mass transfer

1 UVOD

Kot je bilo pokazano s poskusi na lipidnih dvoslojih, celicah in bioloških tkivih, lahko električno polje dovoljše jakosti povzroči znatno povečanje prevodnosti in propustnosti lipidne membrane [1]. Učinek je znan kot *elektroporacija*, tudi kot *elektropermeabilizacija*, in ker je dosežen s pomočjo izpostavitve električnim pulzom, na nekaterih raziskovalnih področjih tudi kot *obdelava s pulzirajočim električnim poljem* (angl. *Pulsed Electric Field treatment* oz. s kratico *PEF*). Elektroporacijo opišemo kot ustvarjanje vodnih poti, tako imenovanih por, v lipidnem dvosloju [2].

Glede na čas trajanja izpostavitve celice električnemu polju, lokalno porazdelitev električne poljske jakosti (ta je omejujoči dejavnik za največjo možno dovedeno električno energijo, ki jo potencialno lahko membrani preda zunanje električno polje) ter hitrost in sposobnost celice, da popravi poškodbe v membrani, razpoznamo tri mogoče izide izpostavitve celice električnemu polju. Če je poljska jakost premajhna in/ali čas izpostavljenosti prekratek, do elektroporacije ne pride in propustnost celične membrane ter sposobnost preživetja celice ostaneta nespremenjeni. Če električna poljska jakost preseže t. i. reverzibilni prag in je izpostavljenost celične membrane polju dovolj dolgo trajajoča, pride do t. i.

reverzibilne elektroporacije; membrana je permeabilizirana in ostane v stanju povečane propustnosti za neko obdobje, a se po določenem času propustnost membrane zniža na vrednost pred elektroporacijo. V procesu celjenja membrane se pore v membrani zapro in celična membrana ponovno vzpostavi normalno, tj. selektivno propustnost, kar pa je mogoče le, če so pogoji v okolju ugodni za preživetje in življenje ter delovanje celice. Če je poljska jakost ali količina dovedene energije prevelika, pa pride do ireverzibilne elektroporacije, kar ima za posledico izgubo celične homeostaze (in morda tudi popoln razpad plazemske membrane), in to dejansko povzroči celično smrt [3]–[6].



Slika 1: Različne uporabe elektroporacije z mogočimi izidi.

Tako reverzibilna kot ireverzibilna elektroporacija sta našli svoje mesto uporabe na področjih, kot so biomedicina, živilska tehnologija, biotehnologija, in v okoljskih znanostih. V biomedicini se reverzibilna elektroporacija uporablja za vnos citotoksičnih zdravil v tumorske celice v procesu, znanem kot elektrokemoterapija, za vnos genov v mišično tkivo in transdermalni vnos zdravil (tj. prek kože), fuzijo celic ter vnos proteinov v celično membrano, medtem ko se ireverzibilna elektroporacija uporablja kot metoda ablacije tkiva, vključno z mehкими tkivi pri zdravljenju raka in srčnomišičnim tkivom za zdravljenje atrijske fibrilacije [7], [8].

Na področju živilske tehnologije in biotehnologije kaže elektroporacija obetavne rezultate pri ekstrakciji sokov in drugih dragocenih snovi iz rastlinskih tkiv in mikroorganizmov, kot so mikroalge, kot metoda pospeševanja dehidracije tkiv in kot dodaten korak obdelave pri nizkotemperaturni konzervaciji in sterilizaciji živil. Reverzibilna elektroporacija pa lahko pomaga pri ustvarjanju novih metod krioprezervacije bioloških tkiv in stimulaciji rastlinskega metabolizma [9]–[14].

Pri vseh naštetih rabah je pomemben aspekt zmožnost razumeti in ovrednotiti transport snovi v povezavi z elektroporacijo bioloških tkiv, saj pri večini aplikacij elektroporacije z njeno rabo poskušamo najti nov ali izboljšati obstoječ način, kako v celico vnesti snov (topljenca/-e ali raztopino) ali pa iz nje pridobiti znotrajcelične sokove ali druge snovi. Zmožnost popolnega razumevanja transportnih procesov snovi ima pomembne posledice, na primer za morebitno izboljšanje selektivnega pridobivanja snovi iz rastlinskih celic, kar

znižuje stroške poznejšega prečiščevanja, ali pa denimo za izboljšanje vnosa zdravil v ciljna tkiva, kar prinaša nove ali bolj učinkovite metode zdravljenja in spopadanja z boleznimi [15], [16].

Čeprav so elektroporacija in z njo povezani pojavi še naprej predmet intenzivnih raziskav, pa ni na voljo ustreznih podrobnejših modelov, ki bi jih bilo mogoče uporabiti pri proučevanju transporta snovi v kompleksnih strukturah, kakršna so biološka tkiva, še zlasti v povezavi z elektroporacijo. Pristop z modelom dvojne poroznosti je tako poskus vzpostavitve teoretičnega matematičnega opisa, tj. modela, za proučevanje transporta snovi v elektroporiranem tkivu.

Ker v določenih primerih rabe elektroporacije ni mogoče zanemariti spremljajočih toplotnih učinkov oziroma pojavov v tkivu (pri nekaterih rabah elektroporacije je segrevanje, povzročeno z dovajanjem električne energije, celo ena od pglavitnih komponent obdelave), članek na kratko teoretično obravnava tudi vpliv elektroporacije celične membrane na prehajanje toplote. Predstavljen je toplotni analog modelu dvojne poroznosti, ki opisuje prenos toplote v elektroporiranem tkivu, s katerim poskušamo povsem teoretično odgovoriti na vprašanje, ali ima elektroporacija celične membrane lahko neposreden in znaten učinek na toplotno prevodnost biološkega tkiva. Ena od posledic redistribucije snovi (kot npr. tekočine) v tkivu je lahko tudi spremenjena toplotna prevodnost tkiva. Raziskovanje tega medsebojnega vpliva masnega in toplotnega transporta pa bi zahtevala povezavo med modelom prenosa toplote in modeli transporta snovi, kar pa je še nedokončano raziskovalno delo, in ni predmet tega prispevka.

Model dvojne poroznosti je bil razvit na podlagi zakonov o ohranitvi mase in zakonitosti transporta snovi ter omogoča spojitev učinkov elektroporacije na membrano posamezne celice z rezultirajočim transportom prek membrane in zunajceličnim transportom snovi. Prek poenostavitve smo poiskali tudi poučno analitično rešitev modela, poleg tega je model mogoče razširiti z dodatnimi funkcijskimi odvisnostmi, ki opredeljujejo pojave elektroporacije, in nato rešiti numerično v primeru nelinearnosti oz. zapletenejših funkcijskih odvisnosti veličin.

Prispevek podaja model dvojne poroznosti v treh različnih oblikah: koncentracijski/difuzijski, tlačni in termični. Izkorišča namreč analogijo med tremi fenomenološkimi modeli transporta snovi in toplote: Fickovim, Darcyjevim ter Fourierjevim zakonom.

2 MATEMATIČNI MODEL

2.1 Trije zakoni masnega in toplotnega transporta

Prehajanje snovi s področja višje koncentracije snovi proti področju nižje koncentracije zaradi procesa difuzije opisuje Fickov zakon za difuzijo, ki poveže masni tok q_z (index z označuje koordinatno os z in indicira, da smo

problem poenostavili na eno dimenzijo) s koncentracijskim gradientom prek difuzijske konstante D (lahko bi pisali D_z v primeru anizotropnega medija). Matematično povsem analogen je Darcyjev zakon za pretok tekočine, ki povezuje pretok q_z za tok tekočine s področja višjega tlaka proti področju z nižjim tlakom z razliko teh tlakov prek kvocienta dveh konstant – hidravlične propustnosti materiala, skozi katerega pronica tekočina α , in njene dinamične viskoznosti μ .

Ravno tako lahko po analogiji tudi za primer toplotnega toka q_z zapišemo Fourierjev zakon, ki poveže toplotni tok z razliko temperatur prek koeficienta toplotne prevodnosti λ . Na desni strani enačb (glej sliko 2) je negativni predznak, ki razreši dilemo glede smeri masnega oz. toplotnega toka. Ta je namreč obratna smeri naraščanja koncentracijskega oz. tlačnega oz. temperaturnega gradienta.

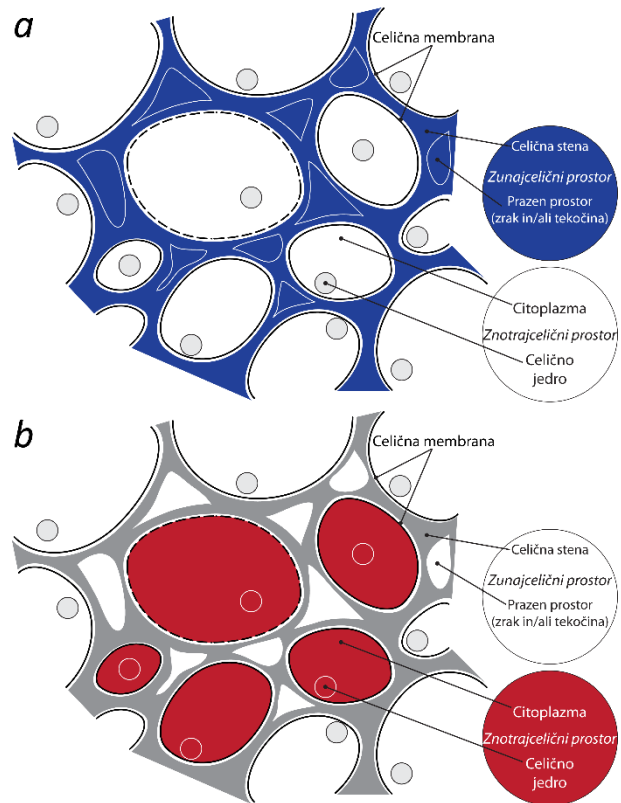


Slika 2: Trije analogni fenomenološki zakoni in možje, ki so jih zapisali ali pa so po njih poimenovani zaradi njihovih znatnih prispevkov znanosti.

Osnovna ideja modela dvojne poroznosti izhaja iz potrebe po sklopitvi učinkov elektroporacije na celično membrano s transmembranskim difuzijskim tokom (angl. *flux*) v tkivu ali filtracijsko-konsolidacijskim obnašanjem tkiva pod tlakom (iztiskanje tekočine, angl. *liquid expression* ali *consolidation*). Da bi lahko modelirali učinke elektroporacije v modelu transporta snovi v tkivu, je treba najprej vpeljati nov nivo kompleksnosti v koncept vzorčnega volumna materiala. Pri tem sledimo teoriji, razviti za pretok tekočine v poroznih materialih, kot je prst ali lomljena kamnina, kjer je koncept mnogoterih poroznosti dobro raziskan, poznan in uporabljan.

Biološko tkivo je, v primerjavi z mnogo preprostejšimi suspenzijami (topljenecv, celic, idr.), morfološko veliko bolj kompleksno in ga ni mogoče predstaviti kot homogen material ali material, sestavljen le iz trdnih snovi in tekočine (glej sliko 3). Namesto tega ga predstavimo kot sestavljenega iz vsaj dveh prostorov ali faz – znotrajceličnega in zunajceličnega prostora. Vsak prostor je nadalje sestavljen iz trdnih snovi in tekočine, v kateri so topljenci ter netopne »trdne« snovi. Stik med obema prostoroma, ki ju ločuje, je polpropustna celična membrana, katere propustnost se spreminja

zaradi elektroporacije. Ta osnovni koncept je skupen difuzijskemu in konsolidacijskemu problemu, saj zadeva modeliranje inherentne lastnosti ciljne snovne strukture materiala. Osnovni principi pa se začnejo razlikovati, ko govorimo o transportu snovi. Pristop k obravnavi transporta snovi je, kar zadeva nastop veličin, povsem različen, vendar so, matematično gledano, rešitve lahko skorajda identične, saj gre za analogne zakonitosti termodinamike neravnovesja.



Slika 3: Tako si poenostavljeno predstavljamo zunajcelični (a) in znotrajcelični (b) prostor na primeru rastlinskega tkiva (s celično steno v zunajceličnem prostoru). Poenostavitev na to raven nam omogoča vzpostavitev modela dvojne poroznosti.

Vse izpeljave in matematična izvajanja, predstavljeni v nadaljevanju, so vezani na posebej poenostavljeno geometrijo. Želimo namreč predstaviti koncept gradnje modela, za kar pretirano kompleksna geometrija ni potrebna. Poleg tega bi kompleksna geometrija onemogočila izpeljavo analitične rešitve in s tem odvzela sposobnost, da iz analize analitične rešitve problema podrobneje spoznamo naravo fizikalnega pojava.

Geometrija, na katero se omejimo, je sestavljena iz cilindričnega vzorca tkiva, za katero predpostavimo, da je primarna os, vzdolž katere poteka masni ali toplotni tok os z. Koordinatni sistem pa je postavljen tako, da je os z vzporedna z osjo, ki jo predstavlja normala na obe krožni ploskvi cilindra (zgornjo in spodnjo). To pomeni, da predpostavljamo, da je razlika tlakov vzpostavljena pretežno med zgornjo in spodnjo ploskvijo cilindričnega vzorca, da masni transport snovi poteka iz vzorca proti

obema ploskvama v primeru difuzije in da sta ti dve ploskvi tudi primarni vir ohlajanja ali segrevanja vzorca v primeru prenosa toplote. Da je to lahko realistična predpostavka, mora biti izpolnjen en pogoj, in sicer, da je cilindrični vzorec precej večjega premera, kot je njegova debelina. Vse izpeljane relacije torej veljajo za širok in tanek cilindrični vzorec tkiva (glej sliko 4 in 5).

2.2 Model dvojne poroznosti za primer difuzije topljenca

Osnovne enačbe ter robni in začetni pogoji modela dvojne poroznosti za koncentracijo v zunajceličnem ter znotrajceličnem prostoru so:

$$\frac{\partial c_e}{\partial t} - D_{s,e} \frac{\partial^2 c_e}{\partial z^2} - \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} k \cdot [c_i - c_e] = 0 \quad (1)$$

$$\frac{dc_i}{dt} + k \cdot [c_i - c_e] = 0 \quad (2)$$

$$c_e(t)|_{z=h/2} = 0 \quad (3)$$

$$\left. \frac{\partial c_e(t)}{\partial z} \right|_{z=0} = 0 \quad (4)$$

$$c_e(z, 0) = c_{e0} \quad (5)$$

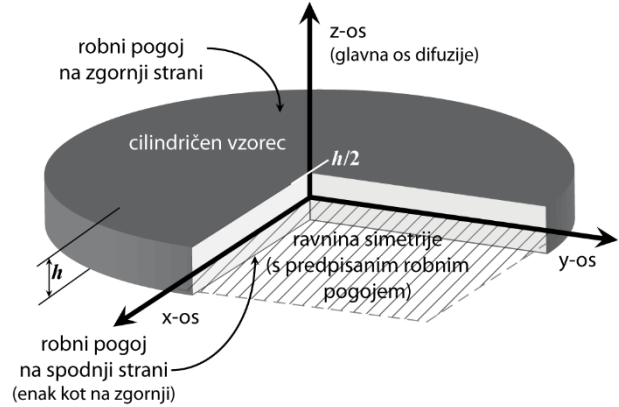
$$c_i(z, 0) = c_{i0} \quad (6)$$

V enačbah 1–6 sta c_e in c_i zunajcelična ter znotrajcelična koncentracija topljenca, $D_{s,e}$ je intrinzični difuzijski koeficient topljenca vrste s v zunajceličnem prostoru, ε je poroznost tkiva (volumetrični delež zunajceličnega prostora v tkivu, torej $\varepsilon = 1 - F$, kjer je F volumetrični delež celic) in k je koeficient transmembranskega difuzijskega pretoka topljenca, ki ga natančneje podaja enačba 7.

$$k = \frac{3D_{s,0}y_s f_p}{d_m R} \quad (7)$$

Koeficient transmembranskega difuzijskega toka (poimenovan tudi koeficient transporta snovi) k je ključni sestavni del modela, ki zajema učinke elektroporacije na celično membrano v relaciji s transmembranskim transportom snovi in kvalitativno opisuje učinke elektroporacije na propustnost celične membrane. Če je mogoče celico modelirati kot popolnoma sferičen objekt radija R in debeline membrane d_m , pri tem pa je $D_{s,0}$ difuzijski koeficient za topljenec vrste s v vodi pri dani temperaturi, y_s koeficient oviranja difuzije v pori in f_p površinski delež stabilnih por ($f_p = N_p \cdot A_p / A_0$, kjer je N_p število por na celico, A_p je povprečna površina posamezne povprečne pore in A_0 površina celice enaka $4\pi R^2$), je koeficient k mogoče izraziti z zgoraj zapisano enačbo 7. Za več podrobnosti o koeficientih y_s in k glejte [17].

Sistem integro-diferencialnih enačb (1–2), upoštevaje robne in začetne pogoje (3–6), je mogoče rešiti analitično. Njegova rešitev za zunaj- in znotrajcelično koncentracijo je:



Slika 4: Geometrija vzorca (tkiva), uporabljena za izpeljavo modela dvojne poroznosti in v poskusih, opravljenih za demonstracijo rabe modela, za primer difuzije snovi iz tkiva v okoliško raztopino.

$$c_e(z, t) = \frac{4c_{i0}}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \cos(\lambda_n z) \left(C_{n,1} e^{\gamma_{n,1} t} \left(\frac{\gamma_{n,1}}{k} + 1 \right) + C_{n,2} e^{\gamma_{n,2} t} \left(\frac{\gamma_{n,2}}{k} + 1 \right) \right) \quad (8)$$

$$c_i(z, t) = \frac{4c_{i0}}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \cos(\lambda_n z) \left(C_{n,1} e^{\gamma_{n,1} t} + C_{n,2} e^{\gamma_{n,2} t} - e^{-kt} \right) + c_{i0} e^{-kt} \quad (9)$$

V enačbah (8) in (9) nastopajo naslednje funkcije oz. koeficienti:

$$C_{n,1} = \frac{\left(\frac{c_{e0}}{c_{i0}} - 1 \right) k - \gamma_{n,2}}{\gamma_{n,1} - \gamma_{n,2}} \quad (10)$$

$$C_{n,2} = \frac{\left(1 - \frac{c_{e0}}{c_{i0}} \right) k + \gamma_{n,1}}{\gamma_{n,1} - \gamma_{n,2}} \quad (11)$$

$$\gamma_{n,1,2} = \frac{-((\delta+1)k + \lambda_n^2 D_{s,e}) \pm \sqrt{((\delta+1)k + \lambda_n^2 D_{s,e})^2 - 4k\lambda_n^2 D_{s,e}}}{2} \quad (12)$$

Zaradi lažjega zapisa je v enačbe (10–12) vpeljana nova konstanta $\delta = (1 - \varepsilon)/\varepsilon$, lastne vrednosti λ_n pa so enake $\lambda_n = (2n+1) \cdot \pi/h$. Črka h označuje debelino cilindričnega vzorca (glej sliko 4).

Sistem enačb (8–12) podaja popolno rešitev za zunajcelično in znotrajcelično koncentracijo snovi tako prostorsko kot časovno. Seveda je te koncentracije v praksi tako rekoč nemogoče izmeriti. Lahko pa si zamislimo poskus, pri katerem cilindrične vzorce tkiva elektroporiramo in potopimo v ustrezno topilo (npr. v vodo), pri tem pa merimo koncentracijo znane snovi, ki difundira iz vzorcev v raztopino. Za primer lahko vzamemo rastlinsko tkivo, bogato s sladkorjem (saharozo). Merimo lahko motnost vodne raztopine z napravo, imenovano refraktometer, in jo prevedemo v koncentracijo saharoze v vodi. Enota, ki se navadno za to uporablja v praksi, je stopinja Brix ($^{\circ}\text{Bx}$) in ustreza 1 gramu saharoze na 100 gramov topila (vode). Če poznamo začetno koncentracijo $^{\circ}\text{Bx}_0$ (ki je enaka 0 za čisto vodo) ter maksimalno $^{\circ}\text{Bx}_{\text{max}}$, ki bi jo dosegli, če bi vso saharozo iz tkiva izlužili v raztopino, lahko

definiramo veličino, imenovano *normirana stopnja/stopinja Brix*, kot:

$$B(t) = \frac{{}^{\circ}\text{Bx}(t) - {}^{\circ}\text{Bx}_0}{{}^{\circ}\text{Bx}_{\text{max}} - {}^{\circ}\text{Bx}_0} \quad (13)$$

V enačbi (13) je s časovno odvisnostjo $B(t)$ poudarjeno, da ima opazovana koncentracija saharoze v raztopini časovno odvisnost, saj sladkor počasi pronica iz tkiva v okoliško vodno raztopino. Poskus ilustrira slika 6 v nadaljevanju, kjer je predstavljen primer rabe modela. Na tem mestu omenimo le, da je mogoče prek primerjave izmerjene $B(t)$ in izračunane $B(t)$ iz simulacije na podlagi enačb (8–12) primerjati rezultate simulacije in poskusa. Za to pa nam manjka le še relacija med $B(t)$ in sistemom (8–12), ki jo podaja enačba (14).

$$B(t) = 1 - \frac{2[\varepsilon \int_0^{h/2} c_e(z,t) dz + (1-\varepsilon) \int_0^{h/2} c_i(z,t) dz]}{h[\varepsilon c_{e0} + (1-\varepsilon)c_{i0}]} \quad (14)$$

2.3 Model dvojne poroznosti za primer iztiska tekočine

Z vidika fizike in matematike obstaja očitna analogija med Fickovim zakonom difuzije in Darcyjevim zakonom, ki narekuje hidrodinamične razmere v poroznih materialih. Model dvojne poroznosti, kot ga podajajo enačbe (1–6), je torej mogoče zapisati tudi za opis filtracijsko-konsolidacijskega obnašanja tkiva pod tlakom, pri čemer, matematično gledano, ostaja formulacija integro-diferencialnega sistema enačb enaka. Difuzijski koeficient $D_{s,e}$ v primeru tlačnega modela zamenja hidravlična propustnost tkiva a_e , deljena z viskoznostjo μ , tj. a_e/μ , in koeficientu transporta snovi k podoben proporcionalnostni koeficient β , ponovno tudi ta ulomljen z viskoznostjo, tj. β/μ . Začetna poroznost tkiva ε je že zajeta v koeficientu a_e in s stisljivostnim modulom $G_{e,e}$, ki nista intrinzični, temveč prostorskopovprečni veličini na celoten vzorec tkiva, in zato je mogoče opustiti faktor $(1 - \varepsilon)/\varepsilon$. Pride tudi do menjave koncentracijskih gradientov, ki jih zamenjajo gradienti tlaka tekočine. Pri iztiskanju pod tlakom so namreč gradienti tlaka tekočine primarno odgovorni za transport snovi, ki je v tem primeru tako znotraj- kot zunajcelična tekočina (medij z raztopljenimi snovmi). Posledično so koncentracije c_e in c_i nadomeščene s tlaki tekočin p_e in p_i . Kot rezultat so, analogno osnovnim enačbam za difuzijski problem (1–6), pridobljene osnovne enačbe za primer iztiska tekočine iz hipotetičnega cilindričnega vzorca tkiva zapisane kot sistem enačb (15–20). Pri tem se opiramo na geometrijo, ki je zavoljo primerljivosti med rezultati simulacije modela in realističnim eksperimentom sicer enaka kot v difuzijskem primeru, le da smo pri difuziji govorili o ravnini simetrije sredi vzorca in difuziji tako proti eni kot drugi krožni ploskvi cilindra, v primeru iztiskanja tekočine pa si zamislimo, da delujemo s silo na zgornjo ploskev vzorca in opazujemo iztiskanje tekočine skozi spodnjo ploskev cilindra. Ilustracija situacije je na sliki 5.

$$\frac{1}{G_{e,e}} \frac{\partial p_e}{\partial t} - \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{\alpha_e}{\mu} \frac{\partial p_e}{\partial z} \right) - \frac{\beta}{\mu} (p_i - p_e) = 0 \quad (15)$$

$$\frac{1}{G_{e,i}} \frac{dp_i}{dt} + \frac{\beta}{\mu} (p_i - p_e) = 0 \quad (16)$$

$$\left. \frac{\partial p_e}{\partial z} \right|_{z=h} = 0 \quad (17)$$

$$p_e|_{z=0} = 0 \quad (18)$$

$$p_e(z, 0) = p_{e0} \quad (19)$$

$$p_i(z, 0) = p_{i0} \quad (20)$$

Enačbi (15–16) tako kot njun difuzijski analog izhajata iz zakonov o ohranitvi mase. Vendar pa, v nasprotju s koncentracijo topljenca, ki je tako merjena/opazovana veličina kot (prek svojega gradienta) tudi izvorna gonilna sila procesa transporta snovi, je tlak tekočine v tlačnem problemu sicer izvorna sila in gonilo transporta, ni pa tudi neposredno merjena ali opazovana veličina in ni predmet zakona o ohranitvi mase. Tlak mora zato biti povezan z maso ali volumnom tekočine, ki se ohranjata, in posledično s poroznostjo posameznega prostora v tkivu, kar je v modelu doseženo z vpeljavo tako imenovanih stisljivostnih modulov (angl. *compressibility moduli*). Stisljivostni modul ali njegova obratna vrednost, stisljivost (angl. *bulk modulus*), je običajno definiran kot razmerje med relativno spremembo v volumnu (tako imenovano razmerje prostega volumna – angl. *void ratio*), ki jo povzroči dana sprememba tlaka, in to tlačno spremembo. Če razmerje prostega volumna e označuje razmerje med prostim volumnom (tekočino) in trdnimi snovmi v znotraj- in zunajceličnem prostoru, sta lahko stisljivostna modula določena iz relacij (21–22).

$$\frac{\partial e_e}{\partial t} = - \frac{\partial p_e}{\partial t} \cdot \frac{\partial e_e}{\partial p_{e,s}} = \frac{1}{G_{e,e}} \frac{\partial p_e}{\partial t} \quad (21)$$

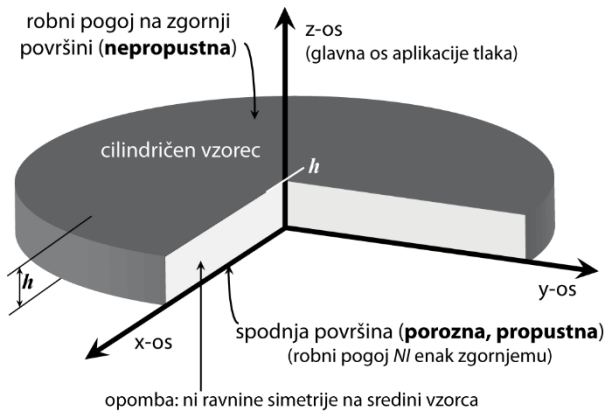
$$\frac{\partial e_i}{\partial t} = - \frac{\partial p_i}{\partial t} \cdot \frac{\partial e_i}{\partial p_{i,s}} = \frac{1}{G_{i,i}} \frac{\partial p_i}{\partial t} \quad (22)$$

Stisljivostna modula G_e in G_i povezujeta spremembo v razmerju prostega volumna z izgubo tlaka tekočine. V poskusih je merjen premik bata, ki ustvarja v sistemu pritisk, s čimer postane poznana deformacija vzorca tkiva, ki je tesneje povezana s poroznostjo (razmerje med prostim volumnom in celotnim volumnom tkiva) kot pa z razmerjem prostega volumna, ki podaja, kot že rečeno, razmerje med volumnom tekočine in volumnom trdnih snovi. Zato so stisljivostni moduli ponovno definirani prek povprečne poroznosti obeh prostorov, tako da velja (23–24).

$$\bar{G}_{e,e} = G_e (1 + \bar{e}_e)^2 \quad (23)$$

$$\bar{G}_{e,i} = G_i (1 + \bar{e}_i)^2 \quad (24)$$

Povsod, razen v enačbah (23–24), je notacija, ki označuje povprečne vrednosti, izpuščena, čeprav implicitno vsebovana. Ta definicija omogoča enostavno pridobitev začetnih ocen za stisljivostne module na podlagi končne deformacije tkiva, ki je dobljena eksperimentalno.



Slika 5: Geometrija vzorca (tkiva), uporabljena za izpeljavo modela dvojne poroznosti in v poskusih, opravljenih za ilustracijo rabe modela, na primeru z iztiskanjem tekočine.

Rešitev sistema enačb (15–20) je povsem analogna rešitvi difuzijskega problema, le da sinus v Fourierjevi vrsti zamenja kosinus, prav tako pa se zaradi robnih pogojev rahlo spremenijo tudi lastne vrednosti in končna analitična rešitev je dana z enačbami (25–30).

$$p_e(z, t) = \frac{4p_{i0}}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{2n+1} \left((\gamma_{n,1}\tau + 1) C_{n,1} e^{\gamma_{n,1}t} + (\gamma_{n,2}\tau + 1) C_{n,2} e^{\gamma_{n,2}t} \right) \sin\left(\frac{(2n+1)\pi}{2h} z\right) \quad (25)$$

$$p_i(z, t) = \frac{4p_{i0}}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{2n+1} \left(C_{n,1} e^{\gamma_{n,1}t} + C_{n,2} e^{\gamma_{n,2}t} - e^{-\tau^{-1}t} \right) \sin\left(\frac{(2n+1)\pi}{2h} z\right) + p_{i0} e^{-\tau^{-1}t} \quad (26)$$

$$C_{n,1} = \frac{\left(\frac{p_{e0}}{p_{i0}} - 1\right) \tau^{-1} - \gamma_{n,2}}{\gamma_{n,1} - \gamma_{n,2}} \quad (27)$$

$$C_{n,2} = \frac{\left(1 - \frac{p_{e0}}{p_{i0}}\right) \tau^{-1} + \gamma_{n,1}}{\gamma_{n,1} - \gamma_{n,2}} \quad (28)$$

$$\gamma_{n,1,2} = \frac{-(\tau^{-1}\delta + \lambda_n^2 v) \pm \sqrt{(\tau^{-1}\delta + \lambda_n^2 v)^2 - 4\lambda_n^2 v \tau^{-1}}}{2} \quad (29)$$

$$v = \frac{\alpha_e G_{\epsilon, \epsilon}}{\mu}; \tau^{-1} = \frac{\beta G_{\epsilon, i}}{\mu}; \delta = \left(1 + \frac{G_{\epsilon, e}}{G_{\epsilon, i}}\right) \quad (30)$$

Lastne vrednost λ_n so enake $\lambda_n = (2n+1) \cdot \pi/2h$. Ko sta tlak tekočine v znotraj- in zunajceličnem prostoru znana, je mogoče uporabiti enačbe (21–24) za izračun deformacije vzorca. Po zapisu za brezdimenzijsko deformacijo $s_{\epsilon}(t)$, ki je normalizirana na začetno debelino vzorca, je izračun deformacije iz znanih tlakov razviden iz enačbe (31).

$$s_{\epsilon}(t) = \frac{s_{\epsilon}(t)}{h} = \frac{1}{G_{\epsilon, e}} \int_0^1 \int_{p_e(z,0)}^{p_e(z,t)} dp_e \cdot dz + \frac{1}{G_{\epsilon, i}} \int_0^1 \int_{p_i(z,t)}^{p_i(z,0)} dp_i \cdot dz \quad (31)$$

Zadnji parameter, ki zahteva obravnavo, je brezdimenzijski faktor β , ki povezuje vpliv elektroporacije na hidravlično propustnost celične membrane. Glede na teorijo, podrobneje predstavljeno v [18], velja za sferično celico radija R s površinskim deležem stabilne populacije por f_p , ki jo sestavlja N_p por povprečnega radija r_p , relacija (32).

$$\beta = \frac{9}{R^2} f_p \alpha_p = \frac{9f_p r_p^2}{8R^2} \quad (32)$$

Pri tem je $\alpha_p = r_p^2/8$ hidravlična propustnost posamezne pore, faktor $9/R^2$ pa je faktor dimenzijske prilagoditve za sferično celico radija R .

2.4 Model dvojne poroznosti za primer prenosa toplote

Prek fizikalno in matematično enake analogije zakonov s Fourierjevim zakonom toplotnega prevajanja (angl. *thermal conduction*) ter upoštevanje osnovne zakonitosti termodinamike neravnovesnih stanj, lahko predpostavimo, da je mogoče model dvojne poroznosti zapisati tudi za opis toplotnih razmer v bioloških tkivih, kar bi moralo v principu veljati, če je tkivo elektroporirano, ali pa tudi ne.

Enačbe toplotnega modela za primer toplotnega toka vzdolž ene (glavne, prevladujoče) osi prevajanja toplote se za zunaj- in znotrajcelični prostor glasijo:

$$\frac{\partial T_e}{\partial t} - \frac{\theta_e}{\rho c_p} \frac{\partial^2 T_e}{\partial z^2} - \frac{f_v h_v}{\rho c_p} (T_i - T_e) = 0 \quad (33)$$

$$\frac{\partial T_i}{\partial t} - \frac{\theta_i}{\rho c_p} \frac{\partial^2 T_i}{\partial z^2} + \frac{h_v}{\rho c_p} (T_i - T_e) = 0 \quad (34)$$

V enačbi (33) nastopa nov parameter, volumsko razmerje f_v ; ta multiplikativni parameter omogoča upoštevanje prostorskega (volumskega) deleža celic v celotnem volumnu tkiva in je enak $F/(1-F)$. Preostale veličine so: T_e in T_i sta temperaturi v zunaj- in znotrajceličnem prostoru [K]; θ_e in θ_i sta zunaj- ter znotrajcelični toplotni prevodnosti [W/(m.K)]; z je prostorska in t časovna koordinata; c_p je specifična toplotna kapaciteta tkiva [J/(kg.K)]; ρ gostota tkiva [kg/m³]; in h_v volumski koeficient prenosa toplote [W/(m³.K)]. Koeficient h_v odraža toplotno prevodnost celične membrane in značilne geometrije sistema izmenjave toplote.

Sistem (33–34) ima za določene vrednosti θ_e in θ_i analitično rešitev, in sicer v posebnem primeru, ko je $\theta_e = \theta_i$. Vendar je to za večino tkiv problematična predpostavka; pomeni namreč, da toplota enako hitro prehaja znotrajcelični kot tudi zunajcelični prostor. V rastlinskih tkivih, kjer je večina vode shranjena v vakuolah, zunajcelični prostor pa je pogosto poln zraka, je takšna poenostavitev s predpostavko enakosti nerealistična. Sistem lahko v vsakem primeru rešimo tudi numerično, vendar se izkaže, da to ni potrebno.

V difuzijskem in tlačnem primeru prenosa snovi v tkivu igrata pomembno vlogo koeficienta k in β , ki povežujeta gradient koncentracije oz. tlaka prek membrane z rezultirajočim transmembranskim transportom topljenca oz. tekočine, in sicer v odvisnosti od stopnje propustnosti membrane. Bolj je membrana

propustna, višje vrednosti dosežata koeficienta, lažji in hitrejši je transmembranski transport. Upravičeno se vprašamo, kako pa je v primeru transmembranskega prenosa toplote, torej kako velik je koeficient h_v .

Izkaže se (za podrobno teoretično razlago glej [19]), da je zaradi sestave (lipidni dvosloj) in izredne tankosti biološke membrane (nekaj nm) membrana tako rekoč »prosojna« za toplotni tok. Z drugimi besedami, glede na prevodnost znotraj- in zunajceličnega prostora membrana ne vpliva znatno na odstopanje, ko govorimo o toplotni prevodnosti. Velikostni razred parametra h_v je ocenjen na:

$$h_v = \frac{3\theta_i}{2R^2} \cong 10^8 \frac{W}{m^3K} \quad (35)$$

V enačbi (35) nastopajoči polmer R predstavlja polmer biološke celice in je velikostnega razreda 10^{-4} , kar povzroči visoko vrednost h_v . Tako je za toplotno izmenjavo (upoštevaje samo toplotno prevajanje, in ne konvekcije) vseeno, ali je membrana elektroporirana ali ne. To seveda velja za relativno dolge čase opazovanja (milisekunde, sekunde). Povsem drugo vprašanje bi seveda bilo, kako elektroporacija vpliva na toplotno prevodnost tkiva zaradi redistribucije tekočine v tkivu, ki jo elektroporacija povzroči, ali pa denimo to, kakšne so toplotne razmere v membrani v času dovajanja elektroporacijskih pulzov in tik po tem (na časovni skali nano- do mikrosekund). Žal ti dve vprašanji presegata obseg in globino tega prispevka in ostajata predmet nadaljnjih raziskav. Zaključek o toplotnih razmerah v elektroporiranem tkivu, ki ga lahko naredimo iz analize modela dvojne poroznosti, kaže zanemarljiv vpliv membrane na toplotni tok skozi tkivo. To velja ne glede na to, ali je membrana porirana ali ne, saj pride do hipne, milisekunde do sekunde trajajoče izenačitve znotrajcelične z zunajcelično temperaturo, če se seveda temperaturnemu gradientu prek membrane sploh uspe vzpostaviti.

3 DEMONSTRACIJA RABE MODELA

3.1 Difuzijski eksperimenti

Da bi prikazali, kako lahko model dvojne poroznosti opiše difuzijo topljenca iz elektroporiranega tkiva, lahko naredimo preprost eksperiment, ki vključuje vzorce tkiva ustrezne geometrije, ki smo jo predstavili že v koraku izpeljave modela. Posamezne vzorce tkiva elektroporiramo z ustreznim protokolom pulzov v obdelovalni komori in nato prelijemo v difuzijski komori z deionizirano vodo, ki jo med difuzijskim eksperimentom stalno mešamo in vzorčimo, da lahko z refraktometrično metodo periodično spremljamo koncentracijo topljenca (v našem primeru saharoze) v raztopini.

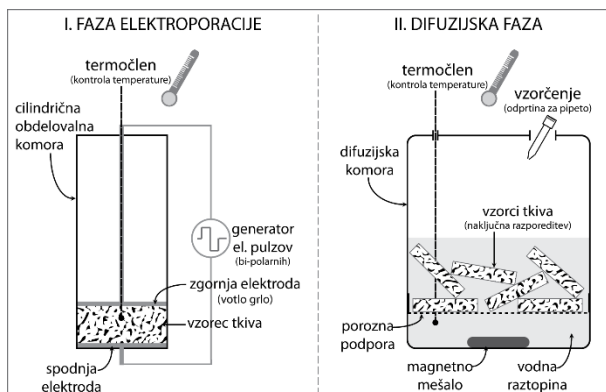
Eksperimentalni protokol je zastavljen tako, da iz gomoljev sladkorne pese in jabolka (brez lupine) najprej izrežemo pravilne, 5 mm debele cilindrične koščke tkiva. Vsi vzorci so v danem primeru premera 25 mm. Vsakega

izmed vzorcev najprej izpostavimo elektroporaciji tako, da dovedemo električne pulze 150, 200, 300, ali 400 V napetosti prek para vzporednih jeklenih ploščatih elektrod, ki sta na medsebojni razdalji 5 mm, z vzorcem tkiva med elektrodama. Namen takšne konfiguracije je izpostavitve tkiva električnim poljskim jakostim približno 300, 400, 600 in 800 V/cm (izračunano po formuli za približek *poljska jakost = napetost / razdalja med elektrodama*). Zelena poljska jakost seveda ni dosežena homogeno povsod v tkivu, saj tkivo ni električno homogen material (dielektričnost, prevodnost idr.), poleg tega so elektrode končnih dimenzij in polje doseže maksimalno (ciljno) vrednost le v centralnem delu, dovolj daleč od robov elektrod.

Pravokotne bipolarne pulze (tj. pulze izmenjujoče polaritete) dovedemo v dveh vlakih z medsebojno razdaljo vlakov ene sekunde. Vlak je sestavljen iz 8 pulzov, vsak pulz pa je dolg 100 μ s in se znotraj vlaka ponavlja s frekvenco 1 kHz. Pulze dovedemo s pomočjo ustreznega generatorja visokonapetostnih pulzov, ki zmore dovesti ustrezno moč oz. energijo glede na prevodnost tkiva.

Po elektroporaciji vzorce tkiva odstranimo iz obdelovalne komore in jih površinsko osušimo z vpojnim papirjem, kar s površine odstrani sladek sok, ki se je tam pojavil po elektroporaciji. Ta tekočina je prisotna na površju vzorca v manjši meri zaradi rezanja, predvsem (v večji meri) pa zaradi elektroosmotskih ter tlačnih razmer v tkivu med elektroporacijo in po njej (izguba turgorja). Če površine vzorcev ne bi bile osušene, bi sok, nabran na površini, povzročil takojšnje povečanje koncentracije sladkorja v raztopini že takoj na začetku difuzijskega poskusa, kar bi povzročilo kinetiko difuzije, znano kot »faza izpiranja«. Tega pojava pa model dvojne poroznosti ne zajema, zato se mu moramo izogniti. Tako površinsko osušeni vzorci so premeščeni v stekleno bučko skupaj z magnetnim mešalom in deionizirano vodo. Vzorce tekočine med stalnim mešanjem periodično odvezemamo in analiziramo z digitalnim analizatorjem koncentracije vodotopnih snovi – refraktometrom. Refraktometer izmeri koncentracijo vseh topnih snovi, med katerimi prevladuje saharoza. Ves čas je razmerje med tekočino in skupnim volumnom vzorcev tkiva 2 proti 1 ter ostaja enako. Shematsko je poskus poenostavljeno prikazan na sliki 6.

Ob merjeni koncentraciji saharoze, izraženi v stopinjah Brix ($^{\circ}$ Bx), in znanih maksimalni in začetni koncentraciji sladkorja (glej razlago v podpoglavju 2.2.) lahko po enačbi (13) pridemo do funkcijske odvisnosti $B(t)$, do katere pa lahko pridemo tudi prek modela. Tako lahko primerjamo rezultate eksperimenta za različne električne poljske jakosti z rezultati simulacij modela, pri katerem spreminjamo površinski delež por, tj. parameter f_p , in tako simuliramo bolj in manj intenziven vpliv elektroporacije na propustnost membrane za saharozo. Rezultati (kinetika ekstrakcije saharoze z difuzijo) za modelni tkivi (sladkorna pesa in jabolko) so podani na sliki 7.

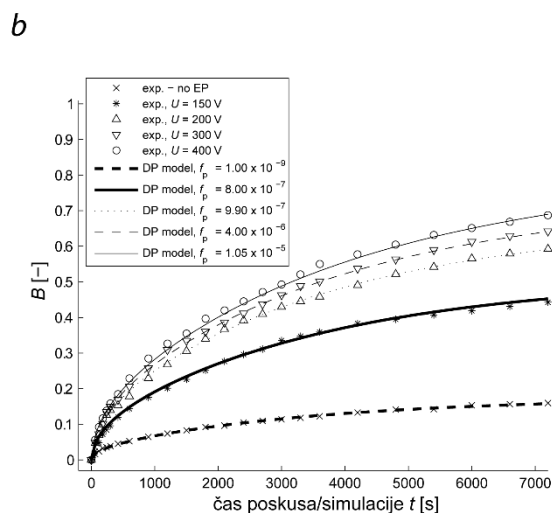
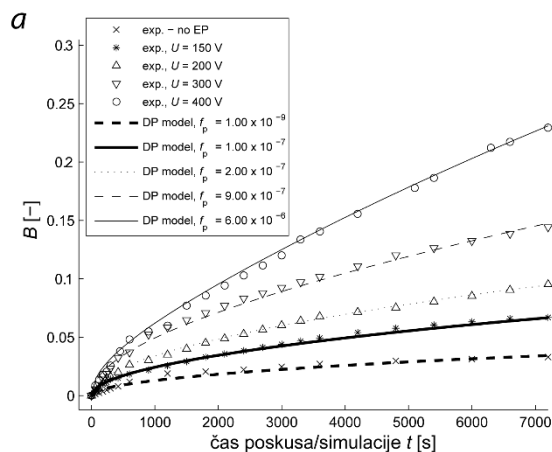


Slika 6: Shematična poenostavljena predstavitev difuzijskega poskusa – faza elektroporacije (levo) in sledeča faza difuzije (desno).

Na sliki 7 lahko vidimo, da je model dvojne poroznosti sposoben dobrega ujemanja z eksperimentalno pridobljeno kinetiko ekstrakcije saharoze prek difuzije iz vzorcev tkiva. Višja je napetost in torej intenzivnejša obdelava tkiva z električnimi pulzi, več in hitreje se izloča saharoza iz tkiva. Elektroporacija seveda na difuzijo iz celičnih vakuol, v katerih je saharoza primarno prisotna, prek celične membrane v zunajcelični prostor in nato iz vzorcev tkiva v raztopino vpliva na več načinov. Zavedati se moramo, da je parameter f_p kompleksna prostorsko-časovna funkcija in v našem primeru poenostavljenega, analitičnega rešljivega modela dvojne poroznosti predstavlja samo idealiziran parameter. Ta parameter mora zajeti vso kompleksnost pojava elektroporacije v interakciji z biološkim materialom, ki je inherentno raznolik, nehomogen, odvisen od pogojev rasti, skladiščenja, priprave vzorca itd. Pomembno je, da lahko s spreminjanjem enega samega parametra, ki nekako v integralnem smislu popisuje propustnost celične membrane, popišemo vse eksperimentalno izmerjene krivulje ekstrakcije saharoze iz tkiva. V primeru jabolka je tudi jasno viden plato, ki ga dosežemo pri napetostih med 200 in 300 V. Od približno 200 V namreč višanje napetosti nima več znatnega vpliva na končno množino saharoze, ki je difundirala iz tkiva.

3.2 Tlačni eksperimenti / Eksperimenti z iztiskanjem

Kot pri poskusih z difuzijo lahko tudi pri poskusih z iztiskanjem uporabimo enake cilindrične vzorce tkiva sladkorne pese ter jabolka premera 25 mm in debeline 5 mm. Vzorce v tem primeru prav tako namestimo med dve vzporedni ploščati elektrodi iz nerjavečega jekla, vendar lahko v tem primeru dovedemo elektroporacijske pulze že kar med oz. sočasno z apliciranjem sile na vzorec. Uporabimo enak protokol poracije kot v primeru difuzijskih eksperimentov, le da za napetost na elektrodah tokrat izberemo eno vrednost več in imamo nabor 150 V, 200 V, 300 V, 350 V in 400 V.

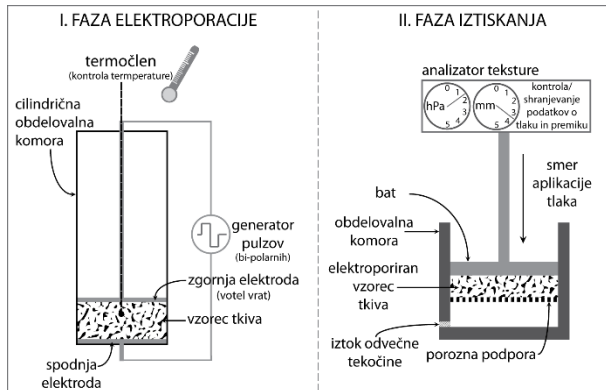


Slika 7: Normalizirana stopinja Brix (B) za sladkorno peso (a) in jabolko (b) v odvisnosti od časa poskusa/simulacije. Posamezne krivulje ustrezajo različnim pritisnjenim napetostim na elektrodah, ki jim ustrezajo tudi posamezne vrednosti ključnega parametra modela, ki popisuje sposobnost membrane za transmembranski transport snovi, tj. f_p .

Kot omenjeno, električni obdelavi takoj sledi iztiskanje (uporaba tlaka), saj obdelovalna komora za elektroporacijo hkrati služi tudi za meritve stisljivosti vzorcev. Vzorce obremenimo s konstantno obremenitvijo 150 N – približno 580 kPa (jabolko) oziroma 300 N – približno 290 kPa (sladkorna pesa) s pomočjo analizatorja teksture. Analizator teksture je naprava, ki je zmožna pritiskati s konstantno silo in meriti premik aplikatorja ali pa premikati aplikator s konstantno hitrostjo in meriti silo, s katero se vzorec upira. Uporabili smo prvega od teh režimov (konstantna sila) in med obremenitvijo vzorca beležili premik bata v obdobju ene ure.

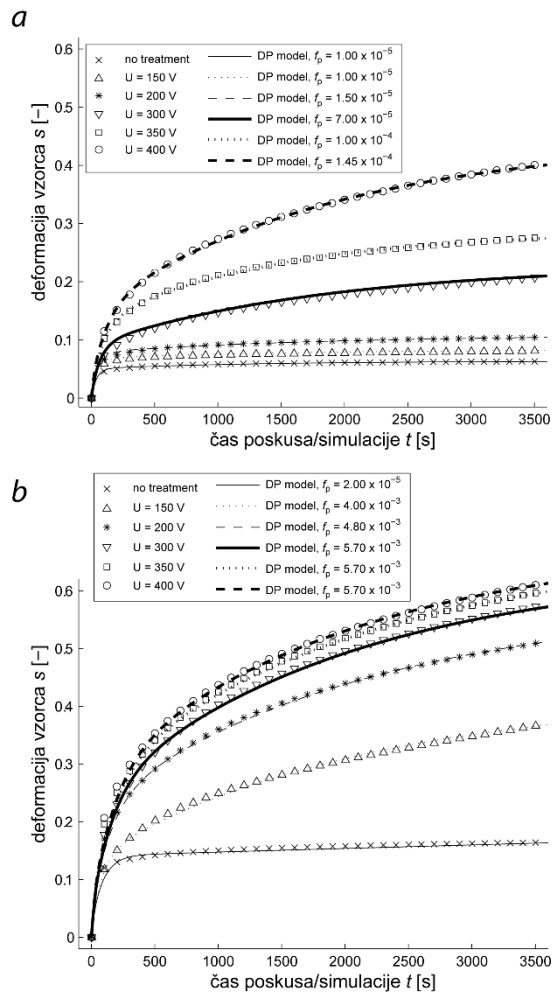
Premik bata je enak deformaciji vzorca vzdolž iste osi, v smeri katere na vzorec deluje sila analizatorja teksture. Ta deformacija vzorca je teoretično povezana z izgubo tlaka tekočine v tkivu (model je prvič predstavljen v [18]). To omogoča primerjavo eksperimentalnih rezultatov deformacije vzorca z rezultati modela

(simulacijami), ki jih izračunamo po enačbi (31). Shematično poskuse z iztiskanjem predstavlja slika 8.



Slika 8: Shematična predstavitev konfiguracije poskusov z iztiskanjem – faza elektroporacije (levo) in sledeča faza iztiskanja soka z analizatorjem teksture (desno). Obdelovalna komora (levo) in merilna (desno) sta združeni v isti merilni sestavi, kar omogoča hkratno dovajanje pulzov in merjenje premika aplikatorja analizatorja teksture.

Prek analogije na primeru difuzije lahko ugotovimo, da razliko v kinetiki deformacije vzorca lahko dosežemo s spremembo ključnega parametra, ki opisuje sposobnost membrane za transmembranski transport snovi, tj. f_p . V nasprotju z difuzijo topljenca (saharoze) pa pri iztiskanju znotrajceličnih sokov iz tkiva kot komponenta masnega transporta sodeluje predvsem znotrajcelična tekočina z vsemi v njej raztopljenimi snovmi. Zaradi tako raznolikih mehanizmov (transport topljenca vs. transport topila) bi težko pričakovali, da bodo absolutne vrednosti parametra v obeh inkarnacijah modela dvojne poroznosti enake ali celo primerljivega velikostnega razreda. V primeru difuzije namreč govorimo o sposobnosti molekule saharoze, da difundira skozi poro v elektroporirani membrani, v primeru iztiskanja tekočine pa o sposobnosti vodnih molekul, da prehajajo membrano pod vplivom tlačnih razlik. Poleg tega je populacija por, ki jih vzpostavi električno polje, časovno in prostorsko zelo spremenljiv pojav. Konstantna in prostorsko nespremenljiva vrednost vseh parametrov, ki popisujejo v predstavljenem modelu dvojne poroznosti vpliv elektroporacije na propustnost membrane, je poenostavitev, ki nam v fazi zasnove modela omogoča, da pridemo do elegantne in poučne rešitve sistema sklopljenih diferencialnih enačb (več o interpretaciji posameznih rešitev enačb (8–9) in (25–26) v [17], [18]). Seveda se moramo ob vseh predpostavkah in poenostavitvah zavedati stohastične narave procesa formiranja por v biološki membrani zaradi vpliva močnega zunanega električnega polja, in to upoštevati pri nadaljnjem razvoju mehanističnih modelov.



Slika 9: Deformacija vzorca $s_e(t)$ za sladkorno peso (a) in jabolko (b) v odvisnosti od časa poskusa/simulacije. Posamezne krivulje ustrezajo različnim pritisnjenim napetostim na elektrodah, ki jim ustrezajo tudi posamezne vrednosti ključnega parametra modela, ki popisuje sposobnost membrane za transmembranski transport snovi, tj. f_p .

4 ZAKLJUČEK

S člankom smo na primeru elektroporacije rastlinskih tkiv prikazali, kako je mogoče tkivo predstaviti kot dvoporozni, dvoprostorski ali dvofazni material in za vsakega izmed prostorov (znotraj- in zunajceličnega) zapisati enačbo za masni ali toplotni tok. Neodvisno od fizikalnega ozadja procesa, torej ali gre za difuzijo pod vplivom koncentracijskih gradientov, ali za tok tekočine pod vplivom tlačnih gradientov, ali za prenos toplote v tkivo zaradi temperaturnih razlik, nam poenostavljeni model dvojne poroznosti omogoča analizo vpliva elektroporacije na pretok snovi ali toplote.

Teoretična analiza pokaže, da elektroporacija nima neposrednega vpliva na prenos toplote v tkivo zaradi spremembe propustnosti membrane, ima pa posredni vpliv prek redistribucije snovi.

Model dvojne poroznosti opiše vpliv elektroporacije na propustnost membrane s pomočjo mehanističnega pristopa, temelječega na teoriji formiranja populacije por v membrani pod vplivom električnega polja, vendar je v predstavljeni obliki ta mehanistični pristop toliko poenostavljen, da v konstitutivnih enačbah ne nastopajo prostorsko ali časovno odvisni koeficienti. Tak opis omogoča razvoj analitične rešitve sistema konstitutivnih enačb (iz didaktičnih razlogov) na račun bolj verne predstavitve fizikalnega ozadja.

Model je vseeno mogoče kadarkoli na kateremkoli od poenostavljenih elementov (parametrov) nadgraditi z vernejšo funkcijsko odvisnostjo, na primer s trdnjšimi temelji pri popisu termodinamike lipidnega dvosloja, vendar s tem postane model kompleksnejši in zahtevnejši za reševanje in praktično rabo.

ZAHVALA

Raziskave je podprla Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) v okviru programov P2-0249 in IP-0510 ter podoktorskega projekta Z7-1886, čigar nosilec je Samo Mahnič-Kalamiza. Avtor se zahvaljuje prof. Damijanu Miklavčiču za konstruktivno kritiko rokopisa.

LITERATURA

- [1] T. Kotnik, L. Rems, M. Tarek, in D. Miklavčič, „Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models“, *Annu. Rev. Biophys.*, let. 48, št. 1, str. 63–91, maj 2019, doi: 10.1146/annurev-biophys-052118-115451.
- [2] L. Delemotte in M. Tarek, „Molecular Dynamics Simulations of Lipid Membrane Electroporation“, *J. Membr. Biol.*, let. 245, št. 9, str. 531–543, sep. 2012, doi: 10.1007/s00232-012-9434-6.
- [3] S. Corovic, L. M. Mir, in D. Miklavcic, „In Vivo Muscle Electroporation Threshold Determination: Realistic Numerical Models and In Vivo Experiments“, *J. Membr. Biol.*, let. 245, št. 9, str. 509–520, sep. 2012, doi: 10.1007/s00232-012-9432-8.
- [4] B. Geboers idr., „High-Voltage Electrical Pulses in Oncology: Irreversible Electroporation, Electrochemotherapy, Gene Electrotansfer, Electrofusion, and Electroimmunotherapy“, *Radiology*, let. 295, št. 2, str. 254–272, mar. 2020, doi: 10.1148/radiol.2020192190.
- [5] A. Golberg in M. L. Yarmush, „Nonthermal Irreversible Electroporation: Fundamentals, Applications, and Challenges“, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, let. 60, št. 3, str. 707–714, mar. 2013, doi: 10.1109/TBME.2013.2238672.
- [6] Y. Demiryurek idr., „Transport, resealing, and re-poration dynamics of two-pulse electroporation-mediated molecular delivery“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, let. 1848, št. 8, str. 1706–1714, avg. 2015, doi: 10.1016/j.bbamem.2015.04.007.
- [7] M. L. Yarmush, A. Golberg, G. Serša, T. Kotnik, in D. Miklavčič, „Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges“, *Annu Rev Biomed Eng.*, let. 16, str. 295–320, jul. 2014, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071813-104622.
- [8] C. J. Bradley in D. E. Haines, „Pulsed field ablation for pulmonary vein isolation in the treatment of atrial fibrillation“, *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, let. 31, št. 8, str. 2136–2147, 2020, doi: 10.1111/jce.14414.
- [9] K. de Boer, N. R. Moheimani, M. A. Borowitzka, in P. A. Bahri, „Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: a review focused on energy consumption“, *J Appl Phycol*, let. 24, št. 6, str. 1681–1698, dec. 2012, doi: 10.1007/s10811-012-9835-z.

[10] L. Buchmann in A. Mathys, „Perspective on Pulsed Electric Field Treatment in the Bio-based Industry“, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, let. 7, 2019, doi: 10.3389/fbioe.2019.00265.

[11] S. Mahnič-Kalamiza, E. Vorobiev, in D. Miklavčič, „Electroporation in food processing and biorefinery“, *J. Membr. Biol.*, let. 247, št. 12, str. 1279–1304, dec. 2014, doi: 10.1007/s00232-014-9737-x.

[12] K. Dymek, „Impregnation of Leaf Tissues and its Consequences on Metabolism and Freezing; Study on Vacuum Impregnation and Pulsed Electric Field Treatment“, dissertation, Lund University, 2015.

[13] R. Straessner, C. Eing, M. Goettel, C. Gusbeth, in W. Frey, „Monitoring of Pulsed Electric Field-Induced Abiotic Stress on Microalgae by Chlorophyll Fluorescence Diagnostic“, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, let. 41, št. 10, str. 2951–2958, okt. 2013, doi: 10.1109/TPS.2013.2281082.

[14] V. Mutsenko idr., „Me2SO- and serum-free cryopreservation of human umbilical cord mesenchymal stem cells using electroporation-assisted delivery of sugars“, *Cryobiology*, let. 91, str. 104–114, dec. 2019, doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.10.002.

[15] G. Pataro, G. Ferrari, in F. Donsi, „Mass Transfer Enhancement by Means of Electroporation“, v *Mass Transfer in Chemical Engineering Processes*, J. Markoš, Ur. InTech, 2011, str. 151–176.

[16] A. Golberg in B. Rubinsky, „Chapter 12 - Mass Transfer Phenomena in Electroporation“, v *Transport in Biological Media*, S. M. Becker in A. V. Kuznetsov, Ur. Boston: Elsevier, 2013, str. 455–492.

[17] S. Mahnič-Kalamiza, D. Miklavčič, in E. Vorobiev, „Dual-porosity model of solute diffusion in biological tissue modified by electroporation“, *Biochim. Biophys. Acta*, let. 1838, št. 7, str. 1950–1966, jul. 2014, doi: 10.1016/j.bbamem.2014.03.004.

[18] S. Mahnič-Kalamiza in E. Vorobiev, „Dual-porosity model of liquid extraction by pressing from biological tissue modified by electroporation“, *Journal of Food Engineering*, let. 137, str. 76–87, sep. 2014, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2014.03.035.

[19] S. Mahnič-Kalamiza, N. Poklar Ulrih, E. Vorobiev, in D. Miklavčič, „A comprehensive theoretical study of thermal relations in plant tissue following electroporation“, *International Journal of Heat and Mass Transfer*, let. 111, str. 150–162, avg. 2017, doi: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2017.03.119.

Samo Mahnič-Kalamiza je leta 2011 diplomiral na Fakulteti za elektrotehniko v Ljubljani, leta 2015 pa doktoriral z doktoratom v somentorstvu na Fakulteti za elektrotehniko v Ljubljani in univerzi Sorbonne Universités, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, Francija. Zaposlen je kot raziskovalec na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Njegova raziskovalna zanimanja vključujejo procese, povezane z elektroporacijo rastlinskih in živalskih tkiv, predvsem s poudarkom na prehranskem inženiringu pa tudi na modeliranju temeljnih procesov, povezanih z elektroporacijo.