

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA ELEKTROTEHNIKO

PODIPLOMSKI ŠTUDIJ ELEKTROTEHNIKE  
MAGISTRSKA NALOGA

PORAZDELITEV ELEKTRIČNE POLJSKE JAKOSTI V  
PODKOŽNEM TUMORJU PRED IN PO  
ELEKTROPORACIJI CELIC

Nataša Pavšelj

mentor: prof. dr. Damijan Miklavčič

LJUBLJANA, 2002



# Kazalo

<b>POVZETEK</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>5</b>
<b>2. TEORETIČNE OSNOVE</b> .....	<b>7</b>
2.1. TOKOVNO POLJE .....	8
2.2. METODA KONČNIH ELEMENTOV .....	11
2.2.1. PROGRAM EMAS .....	17
2.3. MODEL PODKOŽNEGA TUMORJA .....	18
<b>3. ELEKTRIČNE LASTNOSTI BIOLOŠKIH TKIV</b> .....	<b>21</b>
3.1. SNOV V ELEKTRIČNEM POLJU.....	21
3.1.1. PREVODNIK V ELEKTROSTATIČNEM POLJU .....	21
3.1.2. IZOLATOR – DIELEKTRIK V ELEKTROSTATIČNEM POLJU .....	22
3.1.3. BIOLOŠKI MATERIAL V TOKOVNEM POLJU .....	23
3.2. MERITVE BIOLOŠKIH MATERIALOV .....	26
3.2.1. ANIZOTROPNOST BIOLOŠKIH MATERIALOV.....	27
3.2.2. POLARIZACIJA ELEKTROD (IZBIRA MERILNE TEHNIKE).....	27
3.2.2.1. 2-ELEKTRODNE MERITVE.....	28
3.2.2.2. 4-ELEKTRODNE MERITVE.....	28
3.2.3. SPREMEMBE TKIVA PO SMRTI.....	28
3.2.4. OSTALI DEJAVNIKI .....	29
3.3. DIELEKTRIČNE LASTNOSTI TKIV .....	29
3.3.1. TUMOR.....	30
3.3.2. MAŠČOBA .....	32
3.3.3. MIŠICA .....	35
3.3.4. KOŽA .....	38
3.3.4.1. STRATUM CORNEUM .....	41
3.3.4.2. NIŽJE LEŽEČE PLASTI - EPIDERMIS, DERMIS .....	41
3.3.5. KOST.....	42
3.3.6. OBMOČJA VREDNOSTI DIELEKTRIČNIH KONSTANT OBRAVNAVANIH TKIV.....	43
<b>4. POTEK ELEKTROPORACIJE V MODELU</b> .....	<b>45</b>
4.1. PORAZDELITEV ELEKTRIČNEGA POLJA PRED ELEKTROPORACIJO .....	45
4.2. DOGAJANJE V TKIVU MED ELEKTROPORACIJO.....	47
4.2.1. SEKVENČNA ANALIZA V EMAS-u.....	48
4.3. DOLOČITEV PRAGOVNIH VREDNOSTI EL. POLJA IN SPREMEMB PREVODNOSTI .....	50
4.3.1. MIŠICA .....	51
4.3.1.1. MERITVE NA PODGANAH .....	51
4.3.1.2. MODEL V EMAS-u .....	52
4.3.2. KOŽNA GUBA.....	56
4.3.2.1. MERITVE NA PODGANAH .....	56
4.3.2.2. MODEL V EMAS-u .....	57
4.3.3. TUMOR.....	61
4.3.3.1. MERITVE NA MIŠIH .....	61
4.3.3.2. MODEL V EMAS-u .....	63
4.3.4. PODKOŽNO MAŠČEVJE.....	66
4.3.5. FUNKCIJE POTEKOV ELEKTROPORACIJE ZA VSA TKIVA.....	66
4.4. PORAZDELITEV ELEKTRIČNEGA POLJA PO ELEKTROPORACIJI.....	66

<b>5. PARAMETRIZACIJA .....</b>	<b>71</b>
5.1. ZAČETNE VREDNOSTI SPECIFIČNIH PREVODNOSTI TKIV.....	71
5.2. NAČIN POTEKA ELEKTROPORACIJE.....	76
5.3. SPREMEMBA GEOMETRIJE MODELA.....	77
<b>6. RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI .....</b>	<b>81</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>85</b>

---

## Povzetek

Če celico ali skupek celic oziroma tkivo izpostavimo električnemu polju, to na celični membrani povzroči neenakomerno transmembransko napetost, ki je sorazmerna električnemu polju. Ko vsiljena transmembranska napetost preseže neko pragovno vrednost, se poveča prepustnost membrane in nekatere večje molekule lažje vstopajo v celico. Reverzibilno povečanje prepustnosti celične membrane pod vplivom električnega polja imenujemo elektropermeabilizacija. Uporabljamo jo pri genski transfekciji, elektrokemoterapiji, vnosu zdravilnih učinkovin preko kože. Celična membrana se permeabilizira pri pragovni vrednosti transmembranske napetosti, le-ta pa nastopi pri pragovni vrednosti jakosti zunanjšega električnega polja. Ob tem se spremeni tudi specifična prevodnost tkiva, le-ta se poveča, kar lahko uporabimo kot pokazatelj stopnje oziroma poteka elektroporacije v tkivu. Z višanjem električnega polja pa se povečuje tudi delež celic, ki se zaradi previsokega polja trajno poškodujejo. Zato želimo, da je jakost električnega polja med reverzibilnim in ireverzibilnim pragom permeabilizacije.

Potek elektroporacije smo proučevali na matematičnem modelu podkožnega tumorja malih živali, ki smo ga zgradili s komercialnim programom EMAS z metodo končnih elementov. Pri gradnji modela smo se opirali na literaturo in rezultate meritev, s pomočjo katerih smo dobili podatke o specifičnih prevodnostih posameznih tkiv, ki nastopajo v modelu, pragovnih vrednostih električnega polja, pri katerih nastopi elektroporacija, ter spremembah specifičnih prevodnostih za vsako tkivo posebej.

Dokončno zgrajen model smo primerjali z rezultati meritev na podkožnih tumorjih in ugotovili dobro ujemanje reakcijskih tokov skozi model in rezultatov meritev na realnih objektih. Preizkusili smo tudi vpliv spremembe nekaterih parametrov modela, kot so začetne vrednosti specifičnih prevodnosti tkiv, potek elektroporacije med reverzibilnim in ireverzibilnim pragom, ter spremembe v geometriji modela, na izhod modela, torej na porazdelitev električnega polja in reakcijskih tokov skozi model na koncu procesa elektroporacije. Ugotovili smo, da imata največji vpliv na izhod modela zunanji plasti kože in maščobe z najnižjimi vrednostmi specifične prevodnosti, na izhod vplivata tako sprememba njunih začetnih prevodnosti, kot tudi sprememba njune geometrije. Vpliv ostalih tkiv je manjši, prav tako vpliv spremembe načina poteka elektroporacije med reverzibilnim in ireverzibilnim pragom permeabilizacije.

---

---

## Abstract

When electric field is applied to a cell or cell system, a non-uniform transmembrane potential is induced in the exposed cells. If the induced transmembrane potential is above the threshold value, cell membrane becomes permeabilized and thus more conductive. Reversible increase of the cell membrane permeability caused by the electric field is called electroporation. Electroporation is used in gene transfection, electrochemotherapy and transdermal drug delivery to increase the uptake of some molecules into the cells. The cell membrane is permeabilized when the threshold transmembrane potential is reached, thus when the external electric field is above the threshold value. The specific conductivity of the tissue increases when permeabilized, which can be used as an indicator of the level of the electroporation in the tissue in question. Unfortunately the portion of the cells that suffer permanent damage is increased by increasing the electric field. Therefore we want the electric field to be between the reversible and irreversible permeabilization threshold.

We studied the course of the tissue permeabilization on the mathematical model of a subcutaneous tumor on small animals. The model was built with the commercial program EMAS which uses the finite elements method. We built the model using the literature data about the tissue specific conductivities and some experimental results about the reversible and irreversible electric field threshold values and the conductivity changes in the tissues.

The results obtained with the model were then compared with the experimental results from experimental subcutaneous tumors. We established good agreement of the model reaction currents and the reaction currents that were measured in experiments. We also looked into what effects do changes of some model parameters have. We were changing parameters such as initial specific tissue conductivities, electroporation course parameters between reversible and irreversible electric field threshold, and the geometry changes. We were studying changes in the electric field distribution and reaction currents through the model at the end of the electroporation process. We established that both, the change of the specific conductivity and the change in geometry of the outer layers of skin and the subcutaneous fat have the most profound effect on the output of the model. The effect of other tissues is much smaller, as well as the effect of the electroporation course parameters.

---



---

## 1. UVOD

Elektroporacija je pojav, pri katerem zaradi prisotnosti že kratkotrajnega visokonapetostnega električnega pulza v celični membrani nastanejo strukturne spremembe, največkrat jih imenujemo kar "pore". Ob zadostnem številu le-teh in njihovi ustreznih velikosti se poveča prepustnost celične membrane. To povečanje prepustnosti membrane – permeabilizacija omogoči ionom, majhnim molekulam, zdravilnim učinkovinam in makromolekulam, za katere je sicer celična membrana neprepustna ali slabo prepustna, neposreden vstop v celično notranjost. Sprememba prepustnosti je reverzibilna, ob dovolj visokem električnem polju pa je lahko ireverzibilna (celica odmre) [1].

Elektropermeabilizacijo uporabljamo pri genski transfekciji, elektrokemoterapiji in vnosu zdravilnih učinkovin preko kože. V celično membrano lahko z njeno pomočjo vstavljamo beljakovine, preučujemo aktivnosti encimov *in vivo*, vnašamo v celice specifične inhibitorje znotrajcelične encimske aktivnosti ter preučujemo celično signalizacijo preko nadzora koncentracije ionov v citosolu [2].

Prepustnost celične membrane nastopi pri pragovni vrednosti transmembranske napetosti. Večinoma prevladuje mnenje, da znaša pragovna vrednost transmembranske napetosti približno 1V, omenjajo pa tudi nižje vrednosti (200 mV). Pragovna transmembranska napetost pa seveda zahteva pragovno vrednost jakosti zunanega električnega polja. Višja kot je jakost električnega polja, več celic je permeabiliziranih [3],[4].

Elektroporacija je odvisna od prevodnosti medija, parametrov pulzov ter od velikosti, oblike, orientacije in gostote celic. Najpomembnejši parameter je električna poljska jakost, ki na celičnih membranah povzroči transmembransko napetost. Ko se prične povečevati prepustnost membrane, se vnos molekul povečuje z višanjem električne poljske jakosti in hitro doseže največjo vrednost. Toda hkrati se povečuje tudi delež celic, ki jih močno električno polje uniči. Kadar je električna poljska jakost zelo velika, elektroporacije ne preživi nobena celica.

Pred, med in po elektroporaciji se električne lastnosti tkiva spremenijo. Elektroporiranemu tkivu se poveča specifična prevodnost, skozenj steče višji tok, porazdelitev električnega polja v tkivu je drugačna kot na začetku. Porazdelitev električne poljske jakosti je torej pomembna, če želimo raziskovati potek elektroporacije v tkivu [5],[6]. V pričujočem delu smo zgradili matematični model podkožnega tumorja malih živali (podgana, miš) in na njem preučevali potek elektroporacije pri elektrokemoterapiji. Matematični model smo uglasili s pomočjo eksperimentalnih podatkov o poteku elektropermeabilizacije, spremembe specifičnih prevodnosti in reakcijskih tokovih skozi posamezna tkiva.

---

S tako zgrajenim modelom podkožnega tumorja lahko preučujemo potek elektroporacije v tkivu in preizkušamo vpliv spremembe nekaterih parametrov modela na izhod modela, torej na porazdelitev električnega polja in reakcijskih tokov skozi model med potekom in na koncu procesa elektroporacije. Ti parametri so recimo vrednosti specifičnih prevodnosti posameznih tkiv (v literaturi namreč najdemo široka območja vrednosti za posamezna tkiva), potek elektroporacije med reverzibilnim in ireverzibilnim pragom permeabilizacije tkiva, ter spremembe v geometriji modela, saj vemo, da je pri meritvah na realnih objektih, torej pri poskusih na živalih, natančna ponovljivost geometrije skoraj nemogoča.

Izračun električnega polja in reakcijskih tokov v tkivih smo realizirali z numerično metodo končnih elementov. Pri delu smo uporabljali komercialni program EMAS (Ansoft, Pittsburgh, PA, USA) [7]. Metoda končnih elementov (FEM – angl. finite elements method) rešuje parcialne diferencialne enačbe z razdelitvijo modela na manjše elemente, na katerih aproksimira iskano veličino z neko funkcijo. Končni elementi so lahko različnih oblik in velikosti, zato lahko tako modeliramo kompleksne geometrije [8].

V drugem poglavju so na kratko podane teoretične osnove tokovnega polja in metode končnih elementov, opisan je program EMAS in osnovna geometrija modela podkožnega tumorja.

V tretjem poglavju so zbrani podatki o specifični prevodnosti in relativni dielektričnosti različnih bioloških tkiv, ki nastopajo v našem modelu. V literaturi namreč zasledimo širok spekter vrednosti obeh snovnih konstant, zato smo naredili pregled literature na tem področju. Razlike med rezultati merjenj različnih raziskovalcev so posledica številnih faktorjev, zato smo poizkušali iz množice podatkov izluščiti najbolj reprezentativne.

V četrtem poglavju opisujemo potek uglasovanja matematičnega modela podkožnega tumorja, torej določevanje pragov elektroporacije v posameznih tkivih in spremembe specifičnih prevodnosti, tako da se odzivi modelov meritev na posameznih tkivih kar najbolje ujemajo z rezultati meritev na tkivih, ki jih obravnavamo.

Peto poglavje je namenjeno parametrizaciji modela, torej ugotavljanju, kateri izmed parametrov modela imajo največji vpliv na njegov odziv.

V šestem poglavju povzemamo glavne ugotovitve tega dela.

---

## 2. TEORETIČNE OSNOVE

Modelski izračuni porazdelitev električnih tokov in elektromagnetnih polj znotraj bioloških sistemov predstavljajo v zadnjih desetletjih pomembno področje v študijah bioelektromagnetike. So relativno preprosto, a učinkovito orodje za analizo in razlago kompleksnih dogajanj v bioloških sistemih. Z modelskimi izračuni porazdelitve električnih tokov in elektromagnetnih polj lahko ovrednotimo različne stimulacijske pogoje (velikosti tokov oziroma napetosti, velikosti in smeri polj, geometrijo elektrod,...). Eksperimentiranje na modelih je namreč lažje kot na realnih bioloških sistemih, kjer v nekaterih primerih sploh ni možno oziroma je nedopustno. Spreminjanje vzbujanja je poenostavljeno, saj gre le za spremembe robnih oziroma začetnih pogojev na istem modelu, le začetna faza - izgradnja modela - zahteva precej časa in natančnosti. Dober model, verificiran z rezultati meritev, pa zato nudi zelo široke možnosti. Ves čas pa se moramo zavedati dejstva, da imamo opravka z zelo poenostavljeno sliko realnih razmer. Modelski izračuni tako ne morejo nadomestiti eksperimentalnega dela, ampak služijo kot vir dodatnih informacij za osvetlitev dogajanj in načrtovanje eksperimentov [6],[9]-[11].

V začetnem obdobju so prevladovalle analitične metode izračunov električnih veličin znotraj bioloških struktur. Cilj prvih študij je bilo predvsem modeliranje endogenih električnih pojavov ter izračun rezultirajočega električnega polja oziroma takoimenovanega direktnega problema. Analitični izračuni so precej zahtevni in omogočajo le obravnavo modelov, pri katerih lahko geometrijo, snovne lastnosti ter robne pogoje analitično opišemo v izbranem koordinatnem sistemu (pravokotnem, krožnovaljnem ali krogelnem). Nehomogenosti in anizotropnosti materialov, ki jih je možno izraziti v izbranem koordinatnem sistemu, sicer lahko pretvorimo z ustreznimi koordinatnimi transformacijami in obravnavamo kot izotropni problem, a so na ta način dobljene enačbe še bolj zapletene. Zaradi vseh teh lastnosti s tovrstnimi modeli največkrat ni možno dovolj dobro predstaviti oblik in lastnosti bioloških sistemov.

V zadnjih desetletjih se večina modelskih izračunov izvaja na digitalnih računalnikih. K temu je pripomogla predvsem miniaturizacija in pocenitev računalniške strojne opreme. Izboljšane zmožnosti računanja so zaradi hitrejšega izvajanja operacij ter povečanih pomnilniških zmožnosti omogočile obravnavo kompleksnih bioloških sistemov. Razvoj in dostopnost učinkovite programske opreme sta omogočila razmah področja numeričnih metod. Za večino tovrstnih metod je značilno, da model diskretiziramo oziroma razdelimo na

manjše enote, kjer so računane veličine konstantne ali pa se spreminjajo po nekih vnaprej določenih funkcijah. Za vsak tak gradnik potem postavimo enačbo, ki opisuje iskano veličino in je odvisna od uporabljene numerične metode (metoda končnih diferenc, metoda končnih elementov, metoda robnih elementov,...) ter je soodvisna od vrste diskretizacije prostora (mreža točk, končnih elementov ali robnih elementov). Na ta način dobimo sistem enačb, ki ga zapišemo v matrični obliki. Matrično enačbo lahko rešujemo direktno z računanjem inverzne matrike ali z eno od drugih metod direktnega reševanja sistemov enačb. Pri matrikah velikih dimenzij pa je bolj učinkovita (in zaradi omejenosti pomnilnikov večkrat tudi edina možna) uporaba ene od številnih iterativnih metod. Večina numeričnih metod dopušča modelsko aproksimacijo poljubne geometrije. Številne omogočajo tudi modeliranje nehomogenosti in anizotropnosti materialov ter različnih robnih pogojev in vzburjanj.

## 2.1. TOKOVNO POLJE

Električno dogajanje pri vzburjanju bioloških tkiv z enosmernim električnim tokom lahko označimo kot kvazistacionarno. Za snovi, katerih materialne lastnosti ustrezajo električnim prevodnostnim lastnostim bioloških tkiv oziroma organov, kjer dimenzije ne presegajo 1 m in frekvence električnega polja niso višje od 1 kHz, namreč lahko v izbranem časovnem trenutku električno dogajanje, ki je posledica od zunaj dovedenega električnega toka, opišemo z enačbami za stacionarno stanje. Električno polje obravnavamo kot časovno nespremenljivo oziroma zanemarimo kapacitivne in induktivne učinke ter končno hitrost prevajanja električnega toka v biološkem tkivu [6].

Električno polje pri vzburjanju bioloških tkiv oziroma organov s konstantnim enosmernim električnim poljem tako lahko opišemo kot tokovno polje v prevodniku. Zanj velja, da ni izvorno polje, električni tok je namreč vedno sklenjen (nima izvorov oziroma ponorov), kar opisuje naslednja enačba:

$$\oint_S \vec{J} \cdot d\vec{S} = 0, \quad (2.1)$$

kjer je  $S$  sklenjena ploskev, ki objema prostornino  $V$ ,  $\vec{J}$  pa predstavlja vektor gostote toka (enota: A/m<sup>2</sup>). Zanj velja Ohmov zakon, ki se v diferencialni obliki glasi:

$$\vec{J} = \gamma \cdot \vec{E}, \quad (2.2)$$

pri čemer je  $\vec{E}$  vektor električne poljske jakosti (enota: V/m), ki povzroča nastanek toka v snovi (gibanje prostih naelektrenih delcev).

Električna poljska jakost je definirana kot negativni gradient potenciala  $u$  (enota V):

$$\vec{E} = -\nabla u, \quad (2.3)$$

$\gamma$  pa predstavlja specifično prevodnost snovi (enota S/m) in je v najsplošnejšem primeru anizotropnega prevodnika tenzor:

$$\gamma = \begin{bmatrix} \gamma_{xx} & \gamma_{xy} & \gamma_{xz} \\ \gamma_{yx} & \gamma_{yy} & \gamma_{yz} \\ \gamma_{zx} & \gamma_{zy} & \gamma_{zz} \end{bmatrix} \quad (2.4)$$

Če je prevodnost materiala moč opisati v kartezičnem koordinatnem sistemu in se spreminja le v smereh osi koordinatnega sistema ter je tako električno poljsko jakost kot tudi gostoto toka mogoče opisati v istem koordinatnem sistemu, so vsi izvendiagonalni elementi enaki nič in gornja matrika postane diagonalna:

$$\gamma = \begin{bmatrix} \gamma_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \gamma_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \gamma_{zz} \end{bmatrix} \quad (2.5)$$

Pri anizotropnih bioloških tkivih (skeletalna in srčna mišica) se prevodnosti spreminjajo le v dveh smereh: v smeri vzdolž mišičnih vlaken oziroma longitudinalno ter v smeri prečno glede na potek vlaken - transversalno. Če je mišično tkivo orientirano vzdolž ene od osi obravnavanega koordinatnega sistema, sta v gornji matriki dva elementa, ki označujeta prevodnosti prečno glede na potek vlaken, enaka. Obravnava anizotropij se še bolj poenostavi, če problem lahko obravnavamo v cilindričnem koordinatnem sistemu.

V literaturi nekateri avtorji namesto specifične električne prevodnosti  $\gamma$  uporabljajo njeno inverzno vrednost oziroma specifično električno upornost  $\rho = 1/\gamma$  (enota:  $\Omega\text{m}$ ).

Prestopna pogoja tokovnega polja na meji dveh prevodnikov 1 in 2 sta naslednja:

$$J_{n1} = J_{n2}, \quad (2.6)$$

kjer sta  $J_{n1}$  in  $J_{n2}$  normalni komponenti gostote toka v snoveh 1 in 2, in:

$$E_{t1} = E_{t2}, \quad (2.7)$$

kjer sta  $E_{t1}$  in  $E_{t2}$  tangencialni komponenti električne poljske jakosti.

Razmere na meji med prevodnikom in dielektrikom so nekoliko drugačne. Vzemimo, da z indeksom 1 označujemo količine v dielektriku, z indeksom 2 pa v prevodniku. Če v prevodniku ni toka, električno polje opisujejo enačbe za elektrostatiko. Električna poljska jakost v prevodniku je enaka nič. Na površini prevodnika je ploskovno porazdeljena elektrina z gostoto  $\sigma$  (enota  $\text{As}/\text{m}^2$ ). Na meji med prevodnikom in dielektrikom sta od nič različni le normalna komponenta vektorja električne poljske jakosti:

$$E_{n1} = \frac{\sigma}{\varepsilon_1} \quad (2.8)$$

kjer je  $\varepsilon_1$  dielektričnost snovi 1 oziroma dielektrika (enota  $\text{As}/\text{Vm}$ ), in normalna komponenta vektorja gostote električnega pretoka  $\vec{D}$  (enota  $\text{As}/\text{m}^2$ ):

$$D_{n1} = \sigma. \quad (2.9)$$

Razmere se spremenijo v primeru, ko je v notranjosti prevodnika tokovno polje z gostoto toka  $\vec{J}_2$ . Iz konzervativnosti električnega polja (enačba (2.7)) in Ohmovega zakona (enačba (2.2)) sledi:

$$\frac{J_{t1}}{\gamma_1} = \frac{J_{t2}}{\gamma_2}. \quad (2.10)$$

Če upoštevamo, da je snov 1 idealen dielektrik, je njegova specifična prevodnost  $\gamma_1$  enaka nič, v idealnem dielektriku pa je tudi gostota toka  $\vec{J}_1$  enaka nič. Ker imata v prevodniku tako specifična prevodnost  $\gamma_2$  kot tudi gostota toka  $\vec{J}_2$  končno vrednost, je gornjo enačbo bolj smiselno zapisati kot:

$$E_{t1} = \frac{J_{t2}}{\gamma_2}. \quad (2.11)$$

Električno polje torej ni več normalno na površino prevodnika, ampak prestopa mejo pod kotom  $\alpha$ , katerega tangens je enak:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{E_{t1}}{E_{n1}}. \quad (2.12)$$

Delovno oziroma Joulsko moč, ki predstavlja toplotne izgube zaradi trkov prostih nosilcev nabojev v strukturo snovi, definira Joulov zakon, ki se v diferencialni obliki glasi:

$$p = \frac{dP}{dv} = \vec{J} \cdot \vec{E}. \quad (2.13)$$

Pri tem  $p$  predstavlja gostoto prostorsko porazdeljene moči na enoto prostornine (enota:  $W/m^3$ ).

Enačbo za tokovno polje lahko zapišemo samo s potencialom. Enačbo (2.1) zapišemo najprej v diferencialni obliki:

$$\nabla \cdot \vec{J} = 0. \quad (2.14)$$

Ob upoštevanju Ohmovega zakona (enačba (2.2)) dobimo:

$$\nabla \cdot (\gamma \cdot \vec{E}) = 0. \quad (2.15)$$

Uporaba definicije električne poljske jakosti (enačba (2.3)) pa nam da naslednjo zvezo:

$$\nabla \cdot (\gamma \cdot (-\nabla u)) = 0. \quad (2.16)$$

V primeru izotropne, homogene snovi ( $\gamma$  je konstanta) se dobljena enačba poenostavi v Laplace-ovo diferencialno enačbo:

$$\nabla^2 u = 0, \quad (2.17)$$

oziroma:

$$\nabla^2 u = \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \quad \text{na področju } V, \quad (2.18)$$

ki sodi v skupino parcialnih diferencialnih enačb eliptičnega tipa. V splošnem nam skupaj z robnima pogoje:

$$u = \bar{u}, \quad \text{na robu } S_1, \quad (2.19)$$

in odvodom  $u$  v smeri normale na rob področja:

---

$$q = \frac{\partial u}{\partial n} = \bar{q}, \quad \text{na robu } S_2 \quad (2.20)$$

definira mešan ali Robinov problem. Pri tem je:

$$S = S_1 + S_2 \quad (2.21)$$

robna ploskev področja  $V$ . V primeru, ko je podan samo prvi robni pogoj (enačba (2.19)), imamo Dirichletov, v primeru, ko je na robu znan samo normalni odvod (enačba (2.20)), pa Neumannov problem. Laplace-ovo enačbo lahko rešujemo analitično ali z uporabo ene od numeričnih metod. Do enostavnih analitičnih rešitev pridemo samo v primerih, ko lahko geometrijo, nehomogenosti in anizotropnosti materialov ter robne pogoje opišemo v izbranem koordinatnem sistemu (kartezičnem, cilindričnem ali sferičnem). V nasprotju s tem numerične metode reševanja večinoma omogočajo aproksimacijo poljubnih oblik in robnih pogojev. Pri večini metod je možno definirati poljubne nehomogenosti materiala in pri nekaterih tudi anizotropnosti. Za večino bioloških sistemov so značilne zapletene in nepravilne geometrije ter nehomogenosti in anizotropnosti materialov, kar kaže na primernost uporabe numeričnih metod v tovrstnih študijah.

## 2.2. METODA KONČNIH ELEMENTOV

Metoda končnih elementov se je v naših predhodnih študijah izkazala za zelo učinkovito pri številnih izračunih porazdelitve električnega polja znotraj bioloških struktur [9]. Bistvo metode je v razdelitvi modela v manjše sestavne dele - končne elemente, za katere predpostavimo, da lahko v njih iskane veličine opišemo s preprostimi funkcijami. Na začetku analize moramo problem, ki ga želimo rešiti, opisati z ustreznimi enačbami. Sledi izbira veličin izračuna. Ta korak je zelo pomemben, saj po eni strani vpliva na pogojenost problema in s tem na kompleksnost izračuna, po drugi strani pa mora biti iz izbranih veličin izračuna možno izračunati vse ostale iskane veličine. V primeru elektromagnetnih izračunov so se kot zelo primerna veličina izračuna izkazale potencialne funkcije.

Naslednji korak je razdelitev modela na končne elemente. Iskane veličine se znotraj elementov spreminjajo kot funkcije polinomov nižjega reda, odvisno od vrste elementa. Materialne lastnosti pa so znotraj elementov homogene. Postavitev mreže končnih elementov v modelu predstavlja najpomembnejši del analize. Ker za ta del modeliranja doslej ne poznamo ustreznih pravil oziroma navodil, je ta faza močno odvisna od izkušenj uporabnika. V področjih, kjer pričakujemo dinamično spreminjanje računanih veličin, je ponavadi potrebno postaviti gostejšo mrežo, prav tako tudi v področjih, kjer nas porazdelitve električnega polja še posebej zanimajo. Mreža naj bo gostejša tudi v področjih okrog meje med dvema materialoma, katerih snovne lastnosti se močno razlikujejo. Slabo postavljena mreža končnih elementov je najpogostejši vzrok za slab izračun, zato je treba temu koraku posvetiti še posebno pozornost. Eden od najosnovnejših postopkov preverjanja modela, ki ga običajno opravimo v samem začetku študije, je gostitev mreže v opazovanih področjih (na primer znotraj tumorja). Če se pri gostejši mreži rezultati bistveno ne spremenijo, je gostota mreže ustrezna.

Za vsak na ta način definiran element moramo zapisati enačbo za izračun neznane veličine. Poznamo več pristopov k matematični izpeljavi teh enačb. Za Galerkinov postopek

je značilna vpeljava utežnih funkcij. Pri pristopu z uporabo variacijskega računa pa je bistvena vpeljava funkcionala, ki ga želimo minimizirati. Funkcional lahko izberemo tako, da ima nek fizikalen pomen oziroma predstavlja navidezno delo sistema. Rezultat tega dela analize so, ne glede na uporabljen pristop, linearne enačbe za iskane veličine za vsak končni element. Iz tako dobljenih enačb sestavimo sistem linearnih enačb, ki ga uredimo v matrični zapis in rešujemo z numeričnimi metodami.

Sistem Maxwellovih enačb predstavlja skupaj z enačbami za prestopne pogoje in dopolnilnimi enačbami najsplošnejši opis elektromagnetnega dogajanja v snoveh. V integralni obliki je to naslednji sistem [6]:

$$\oint_L \vec{H} \cdot d\vec{l} = \int_S (\gamma \cdot \vec{J} + \rho \cdot \vec{v} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}) \cdot d\vec{S} + \oint_L (\vec{v} \times \vec{D}) \cdot d\vec{l}, \quad (2.22)$$

$$\oint_L \vec{E} \cdot d\vec{l} = - \int_S \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \cdot d\vec{S} + \oint_L (\vec{v} \times \vec{B}) \cdot d\vec{l}, \quad (2.23)$$

$$\oint_S \vec{D} \cdot d\vec{S} = \int_V \rho \, dv, \quad (2.24)$$

$$\oint_S \vec{B} \cdot d\vec{S} = 0. \quad (2.25)$$

V diferencialni obliki pa se sistem glasi:

$$\nabla \times \vec{H} = \vec{J} + \dot{\vec{D}}, \quad (2.26)$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\dot{\vec{B}}, \quad (2.27)$$

$$\nabla \cdot \vec{D} = \rho, \quad (2.28)$$

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0. \quad (2.29)$$

Direktno reševanje sistema Maxwellovih enačb z izračunom vektorjev  $\vec{E}$  in  $\vec{B}$  ima naslednje pomanjkljivosti:

Število neznank je večje, kot je dejansko potrebno, saj moramo za vsak vektor izračunati tri komponente. Tako imamo 6 neznank in samo 4 enačbe.

Druga pomanjkljivost sta prestopna pogoja, ki morata biti izpolnjena na meji dveh snovi:

$$D_{n1} = D_{n2}, \quad (2.30)$$

kjer sta  $D_{n1}$  in  $D_{n2}$  normalni komponenti gostote električnega pretoka v snoveh 1 in 2. Enačba (2.30) mora biti izpolnjena, ker na meji snovi ni ploskovno porazdeljenih elektronov.

Drugi prestopni pogoj pa se glasi:

$$H_{t1} = H_{t2}, \quad (2.31)$$

kjer sta  $H_{t1}$  in  $H_{t2}$  tangencialni komponenti jakosti magnetnega polja v snoveh 1 in 2. Ta pogoj mora biti izpolnjen, ker na meji snovi ni ploskovne gostote toka.



Pri vsakem reševanju sistema Maxwellovih enačb z izračunom  $\vec{E}$  in  $\vec{B}$  moramo te robne pogoje upoštevati na vsaki meji dveh področij, kar pri metodi končnih elementov pomeni na robovih vsakega elementa. Ta zahteva predstavlja veliko breme za numerični izračun.

Pomanjkljivost izbire  $\vec{E}$  in  $\vec{B}$  za neznani spremenljivki pri izračunu je tudi dejstvo, da ti veličini lahko zavzameta neskončne vrednosti na ostrih robovih določenih snovi. Neskončne vrednosti (singularnosti) pa predstavljajo resen problem pri numeričnih izračunih z digitalnimi računalniki.

Da bi se izognili navedenim problemom, so raziskovalci s področja numeričnih izračunov v elektromagnetiki vpeljali funkcije potenciala. Ker je po enačbi (2.29) divergenca  $\vec{B}$  vedno enaka 0, predstavlja  $\vec{B}$  takoimenovano solenoidalno polje, za katera velja, da jih lahko izrazimo kot rotor nekega drugega vektorskega polja. Na podlagi te lastnosti vpeljemo vektorski potencial  $\vec{A}$ :

$$\vec{B} = \nabla \times \vec{A}. \quad (2.32)$$

Električno poljsko jakost lahko izrazimo z na ta način definiranim vektorskim potencialom  $\vec{A}$ , ki predstavlja magnetni vektorski potencial, in skalarnim potencialom  $u$ :

$$\vec{E} = -\nabla u - \dot{\vec{A}}. \quad (2.33)$$

Zaradi poenostavitve enačb pri analizi s končnimi elementi vpeljemo novo obliko skalarnega potenciala, ki je definirana kot časovni integral  $u$ :

$$\psi = \int_t u dt. \quad (2.34)$$

Enačba (2.33) se tako spremeni:

$$\vec{E} = -\nabla \psi - \dot{\vec{A}}. \quad (2.35)$$

Vpeljava nekonvencionalnega skalarnega potenciala  $\psi$  ima za posledico simetričnost in poenotenje ter poenostavitev zapisa elektromagnetnih veličin pri analizi s končnimi elementi. Tri komponente vektorskega potenciala  $\vec{A}$  in nekonvencionalni skalarni potencial  $\psi$  predstavljajo neznane veličine, ki jih želimo izračunati v primeru splošnega elektromagnetnega problema, opisanega z Maxwellovimi enačbami. V primeru tokovnega polja (kvazistacionarne razmere) se problem poenostavi. Vse tri komponente vektorskega potenciala  $\vec{A}$  so enake 0 in računamo samo nekonvencionalni skalarni potencial  $\psi$  oziroma njegov časovni odvod  $\dot{\psi} = u$ .

Kot smo že omenili, lahko sistem enačb za izračun z metodo končnih elementov izpeljemo z uporabo Galerkin-ove metode ali s pomočjo variacijskega računa. Izračun, formuliran z metodo variacijskega računa, minimizira funkcional, ki predstavlja navidezno delo kot posledico posplošenih sil na sistem. Posplošene sile na sistem so rezultat sprememb iskanih spremenljivk (treh komponent vektorskega potenciala  $\vec{A}$  in skalarnega potenciala  $\psi$ ). Do rešitve Maxwell-ovih enačb pridemo z uvajanjem dinamičnega ravnovesja med posplošenimi silami pri reševanju matrične enačbe.

V primeru tokovnega polja je navidezno delo definirano s toplotnimi izgubami (enačba (2.13)). Energijo toplotnih izgub na enoto volumna lahko zapišemo kot:

$$w = \int_t p dt . \quad (2.36)$$

Če upoštevamo enačbe (2.13), (2.3) in (2.34), dobimo:

$$w = \int_t \vec{E} \cdot \vec{J} dt = - \int_t \nabla u \cdot \vec{J} dt = - \nabla \left( \int_t u dt \right) \cdot \vec{J} , \quad (2.37)$$

oziroma:

$$w = - \nabla \psi \cdot \vec{J} . \quad (2.38)$$

Diferencial virtualnega dela  $\delta W$  kot rezultat delovanja posplošenih sil, povezanih s spremembami nekonvencionalnega skalarnega potenciala  $\delta \psi$ , je tako definiran z izrazom:

$$\delta W = \int_V \delta (\nabla \psi) \cdot \vec{J} dV . \quad (2.39)$$

Pri integraciji desne strani gornje enačbe po delih (per partes) bi dobili naslednji izraz:

$$\int_S \delta \psi \cdot \vec{n} \cdot \vec{J} dS , \quad (2.40)$$

kjer  $S$  predstavlja robno ploskev področja, v katerem računamo,  $\vec{n}$  je enotin vektor v smeri normale na to ploskev,  $\vec{n} \cdot \vec{J}$  pa predstavlja normalno komponento gostote toka na robni ploskvi področja izračuna.

Gornji izraz zapišemo v posplošeni obliki tako, da dodamo energijo, ki je posledica predpisane konstantne vrednosti gostote toka  $\vec{J}^*$  in dobimo:

$$\int_S \delta \psi \cdot \vec{n} \cdot (\vec{J} - \vec{J}^*) dS . \quad (2.41)$$

Dobljeni člen bo enak 0 v dveh primerih:

- če bo sprememba potenciala  $\delta \psi$  na robu  $S$  enaka 0, oziroma se  $\psi$  ne bo spreminjal - Dirichletov robni pogoj,
- če bo normalna komponenta gostote toka na robu enaka predpisani vrednosti  $J_n^*$  oziroma:  $\vec{n} \cdot (\vec{J} - \vec{J}^*) = 0$  - Neumannov robni pogoj.

V izrazu za virtualno delo (enačba (2.39)) upoštevajmo še ta prispevek:

$$\delta W = \int_V \delta (\nabla \psi) \cdot \vec{J} dV - \int_S \delta \psi \cdot \vec{n} \cdot \vec{J}^* dS . \quad (2.42)$$

V prvem členu desne strani z upoštevanjem enačb (2.2), (2.3) in (2.34) izrazimo gostoto toka z nekonvencionalnim skalarnim potencialom  $\psi$  in dobimo:

$$\delta W = - \int_V \delta (\nabla \psi) \cdot \gamma \cdot \nabla \psi dV - \int_S \delta \psi \cdot \vec{n} \cdot \vec{J}^* dS . \quad (2.43)$$

Dobljena zveza predstavlja osnovo za izračun po metodi končnih elementov. Prvi člen desne strani predstavlja energijo toplotnih izgub, drugi člen pa predstavlja energijo zaradi postavljenih robnih pogojev oziroma energijo virov.

Naslednji korak pri analizi z metodo končnih elementov je razgradnja modela v manjše sestavne dele - končne elemente, katerih oblika je relativno preprosta. Posameznemu končnemu elementu pripišemo homogene snovne lastnosti. Potek potenciala znotraj elementov pa lahko opišemo s polinomi nižjega reda. Z uporabo tako definiranih elementov lahko modeliramo geometrijsko in snovno bolj komplicirane sisteme.

Privzemimo, da lahko potencial  $\psi$  v posameznem elementu zapišemo kot vsoto:

$$\psi(\vec{r}) = N_1(\vec{r}) \cdot \psi_1(t) + N_2(\vec{r}) \cdot \psi_2(t) + N_3(\vec{r}) \cdot \psi_3(t) + \dots, \quad (2.44)$$

kjer so  $N_i$  takoimenovane funkcije oblike, ki so odvisne samo od pozicije  $\vec{r}$ ,  $\psi_i(t)$  pa predstavlja vrednost nekonvencionalnega skalarnega potenciala v posameznih točkah izračuna  $i$  (ang. grids), ki se nahajajo v elementu. Število točk izračuna v posameznem elementu je odvisno od geometrije in vrste elementa. Najosnovnejše tri oblike pri trirazsežnostnih modelih so šestploskovna, petploskovna in štiriploskovna oglata telesa.

Točke izračuna so ponavadi kar oglišča elementov, lahko pa definiramo tudi vmesne točke na robovih oziroma znotraj elementov (elementi višjih redov). Funkcije oblike se s tem spremenijo, izračun pa je natančnejši, a zato bolj obsežen.

Enačbo (2.44) lahko zapišemo v vektorsko - matrični obliki:

$$\psi = \{N\}^T \cdot \{\psi^e\}, \quad (2.45)$$

kjer je  $\{N\} = \{N_1, N_2, N_3, \dots\}^T$  vektor funkcij oblike elementa in  $\{\psi^e\} = \{\psi_1, \psi_2, \psi_3, \dots\}^T$  vektor nekonvencionalnih skalarne potencialov v točkah izračuna posameznega elementa. Dimenzija obeh vektorjev je enaka številu točk izračuna  $n$ , ki pripadajo obravnavanemu elementu.

Enačbo za virtualno delo (3.43) želimo zapisati za posamezni element z uporabo na ta način definiranih izrazov. Časovni odvod  $\dot{\psi}$  lahko zapišemo kot:

$$\dot{\psi} = \{N\}^T \cdot \{\dot{\psi}^e\}. \quad (2.46)$$

Za funkcije oblike vzamemo, da so konstantne glede na variacije  $\delta\psi$ , zato velja:

$$\delta\psi = \{N\}^T \cdot \delta\{\psi^e\}. \quad (2.47)$$

Gradient potenciala  $\nabla\psi$  zapišemo z uporabo funkcij oblike kot:

$$\nabla\psi = [\nabla N] \cdot \{\psi^e\}, \quad (2.48)$$

pri čemer je  $[\nabla N]$  matrika dimenzije  $3 \times n$ :

$$[\nabla N] = \begin{bmatrix} \frac{\partial N_1}{\partial x} & \frac{\partial N_2}{\partial x} & \cdots \\ \frac{\partial N_1}{\partial y} & \frac{\partial N_2}{\partial y} & \cdots \\ \frac{\partial N_3}{\partial z} & \frac{\partial N_3}{\partial z} & \cdots \end{bmatrix}. \quad (2.49)$$

Izraz za navidezno delo za posamezni element zapišemo z uporabo na ta način definiranih zvez:

$$\delta W^e = - \int_{V^e} ([\nabla N] \cdot \delta \{\psi^e\})^T \cdot \gamma \cdot ([\nabla N] \cdot \{\dot{\psi}^e\}) dV - \int_{S^e} (\{N\} \cdot \delta \{\psi^e\})^T \cdot (\bar{n} \cdot \bar{J}^*) dS. \quad (2.50)$$

Ker so vektorji nekonvencionalnih skalarnih potencialov  $\{\psi^e\}$  krajevno neodvisni, jih lahko pišemo zunaj volumskih in ploskovnih integracij:

$$\delta W^e = - \delta \{\psi^e\}^T \cdot \left( \int_{V^e} [\nabla N]^T \cdot \gamma \cdot [\nabla N] dV \right) \cdot \{\dot{\psi}^e\} - \delta \{\psi^e\}^T \cdot \int_{S^e} \{N\}^T \cdot (\bar{n} \cdot \bar{J}^*) dS. \quad (2.51)$$

Definirajmo prevodnostno matriko elementa:

$$[B^e] = \int_{V^e} [\nabla N]^T \cdot \gamma \cdot [\nabla N] dV, \quad (2.52)$$

ki vsebuje informacijo o geometriji elementa v kombinaciji z njegovimi prevodnostnimi lastnostmi, in vpeljimo še vektor ploskovnih vzbujanj sistema:

$$\{J^e\} = - \int_{S^e} \{N^T\} \cdot (\bar{n} \cdot \bar{J}^*) dS, \quad (2.53)$$

kjer (\*) označuje predpisano vrednost - Neumann-ov robni pogoj. Integracija se izvaja le po tistih ploskvah elementov, ki so del robne ploskve modela.

Enačbo za virtualno delo posameznega elementa (2.50) lahko ob upoštevanju tako vpeljanih zvez zapišemo kot:

$$\delta W^e = - \delta \{\psi^e\}^T \cdot [B^e] \cdot \{\dot{\psi}^e\} + \delta \{\psi^e\}^T \cdot \{J^e\}. \quad (2.54)$$

Naslednji korak predstavlja seštevanje prispevkov navideznega dela posameznih elementov za celoten sistem. Rezultat je izraz za navidezno delo celotnega modela:

$$\delta W = - \delta \{\psi\}^T \cdot [B] \cdot \{\dot{\psi}\} + \delta \{\psi\}^T \cdot \{J\}, \quad (2.55)$$

pri čemer je vektor  $\{\psi\}$  sestavljen iz vektorjev  $\{\psi^e\}$  vseh elementov modela. Podobno sta zgrajena tudi matrika  $[B]$  in vektor  $\{J\}$ .

Zadnji korak je uvedba dinamičnega ravnovesja:

$$0 = -[B] \cdot \{\dot{\psi}\} + \{J\}_S. \quad (2.56)$$

Končna matrična enačba se glasi:

$$[B] \cdot \{\dot{\psi}\} = \{J\}_S, \quad (2.57)$$

oziroma: 
$$[B] \cdot \{u\} = \{J\}_S. \quad (2.58)$$

V gornjo enačbo moramo vstaviti še robne pogoje - predpisane vrednosti potencialov v točkah izračuna. Sistem enačb nato preuredimo tako, da imamo v vektorju na levi strani samo neznanke (potenciale):

$$\mathbf{A} \cdot \mathbf{x} = \mathbf{B} \cdot \mathbf{f}, \quad (2.59)$$

kjer je  $\mathbf{A}$  sistemska matrika,  $\mathbf{x}$  vektor neznank,  $\mathbf{B}$  komplementarna matrika in  $\mathbf{f}$  vektor robnih pogojev. Tako dobljeno matrično enačbo lahko rešujemo direktno ali z uporabo ene od iterativnih numeričnih metod. Bistvo iterativnih (indirektnih) metod je v tem, da v sistem linearnih enačb postavimo neko začetno vrednost, sistem rešimo in dobljeno rešitev vstavimo v naslednjo iteracijo ter na ta način rešujemo, dokler ne zadostimo nekemu kriteriju za zaključitev postopka. Algoritmi iterativnega reševanja so lahko različni. Iterativne metode so primerne predvsem za prazne oziroma razpršene sisteme enačb (ang. sparse systems), pri katerih je precej členov v matriki enakih 0. Ta pogoj je pri metodi končnih elementov običajno dobro izpolnjen, saj so v posamezni vrstici matrike  $[B]$  od 0 različni le tisti elementi, ki predstavljajo vpliv točk izračuna, ki so neposredne sosede obravnavane točke.

Po podobni poti bi v splošnem primeru obravnave celotnega sistema Maxwellovih enačb ter izračuna vektorskega potenciala  $\vec{A}$  in nekonvencionalnega skalarnege potenciala  $\psi$  prišli do naslednjih dveh matričnih enačb:

$$\begin{bmatrix} M^{AA} & M^{A\psi} \\ M^{\psi A} & M^{\psi\psi} \end{bmatrix} \cdot \begin{Bmatrix} \ddot{\vec{A}} \\ \ddot{\psi} \end{Bmatrix} + \begin{bmatrix} B^{AA} & B^{A\psi} \\ B^{\psi A} & B^{\psi\psi} \end{bmatrix} \cdot \begin{Bmatrix} \ddot{\vec{A}} \\ \ddot{\psi} \end{Bmatrix} + \begin{bmatrix} K^{AA} & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{Bmatrix} \vec{A} \\ \psi \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} \vec{M}_0 \\ 0 \end{Bmatrix}_V + \begin{Bmatrix} \vec{H}_t \\ \vec{J}_n \end{Bmatrix}_S + \begin{Bmatrix} I \\ 0 \end{Bmatrix}_{\text{v točki}} \quad (2.60)$$

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 \\ M^{\psi A} & M^{\psi\psi} \end{bmatrix} \cdot \begin{Bmatrix} \dot{\vec{A}} \\ \dot{\psi} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} 0 \\ \rho_0 \end{Bmatrix}_V + \begin{Bmatrix} 0 \\ \vec{D}_n \end{Bmatrix}_S + \begin{Bmatrix} 0 \\ Q \end{Bmatrix}_{\text{v točki}}, \quad (2.61)$$

kjer je  $[M]$  matrika dielektričnosti,  $[K]$  pa matrika permeabilnosti, ki ju izračunamo na podoben način kot prevodnostno matriko  $[B]$ .  $\vec{M}_0$  predstavlja vektor magnetizacije,  $\rho_0$  prostorsko gostoto elektron in  $Q$  velikost naboja elektron. V primeru tokovnega polja ( $\vec{A} = 0$ ) se gornji sistem poenostavi v enačbo (2.57).

### 2.2.1. PROGRAM EMAS

Za izračun porazdelitve potenciala in električne poljske jakosti po metodi končnih elementov v modelu podkožnega tumorja smo uporabili komercialni programski paket EMAS (Ansoft, Pittsburgh, PA, USA) [7].

V EMAS-u predstavlja definicija geometrije modela prvi korak modeliranja. Sledi določanje robnih pogojev in vzbujanj, torej Dirichletovih in Neumannovih pogojev. V naslednji fazi v prej zgrajene geometrijske objekte postavimo končne elemente, kar nam

---

program lahko naredi avtomatsko, uporabnik vnese le zahtevo po gostoti mreže. Ta faza predstavlja najpomembnejši del postopka modeliranja, saj močno vpliva na točnost izračuna. Osnovni zahtevi za mrežo končnih elementov sta naslednji:

- vsak element mora imeti natanko toliko sosedov, kolikor robnih elementov ima; mejni ploskvi med dvema sosednjima elementoma morata biti identični.
- elementi morajo biti po obliki čimbolj podobni ustreznim pravilnim geometrijskim telesom; v primeru trirazsežnostnih modelov je za šestploskovni element to kocka, za petploskovni pravilna tristrana prizma in za štiriploskovni element tetraeder.

Neizpolnjenost teh zahtev ima za posledico numerične napake in zato slab izračun. Program ima vgrajena orodja za preverjanje izpolnjenosti teh zahtev.

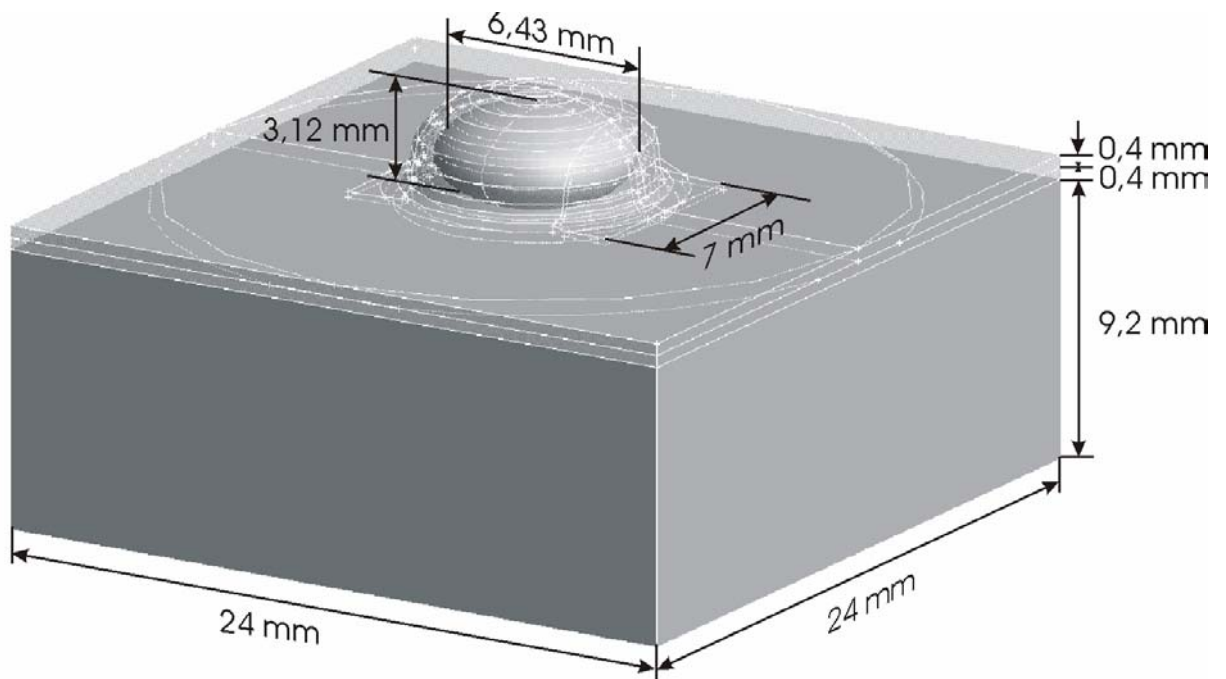
Na mestih, kjer pričakujemo velike spremembe opazovanih veličin, je priporočljivo, da je mreža končnih elementov gostejša. Enako velja za meje področij z zelo različnimi vrednostmi specifičnih električnih prevodnosti. Gostejšo mrežo moramo postaviti tudi v področjih okrog elektrod ter povsod tam, kjer je geometrija takšna, da redka mreža ne bi omogočila dovolj natančnega modeliranja realnega sistema. Vsakemu elementu oziroma skupini elementov je ob definiciji potrebno določiti tudi materialne lastnosti. Postavitev mreže je močno poenostavljena pri modelih, katerih geometrija je pravilne ali simetrične oblike. Z definiranjem linij oziroma ravnin simetrije se zmanjša tudi potrebno število končnih elementov in s tem močno poenostavi in skrajša izračun.

Gradnja modela je tako zaključena in sledi izračun. Rezultate lahko pregledujemo na različne načine, v poljubnih prereznih ravninah, po posameznih vozliščih in jih predstavimo na različne načine – prikaz ekvipotencialnih ploskev z različnimi barvami, prikaz vektorskih veličin s puščicami... Poljubno lahko mrežo končnih elementov zgostimo v področjih kjer nas porazdelitev še posebej zanima, oziroma v področjih kjer je zaradi preredke mreže prišlo do prevelikih napak. Postopek ponovimo do prikaza rezultatov in v primeru da se rezultati bistveno ne razlikujejo od tistih ki smo jih dobili v prejšnjem koraku, postopek zaključimo, sicer ga ponavljamo dokler temu ni zadoščeno.

## 2.3. MODEL PODKOŽNEGA TUMORJA

Zgradili smo numerični model podkožnega tumorja pri katerem so električni pulzi dovedeni preko kože z uporabo ploščatih elektrod pritisnjenih na kožo. Pri naši študiji želimo modelirati porazdelitev električne poljske jakosti v podkožnem tumorju pred in po elektroporaciji ter preučiti vpliv nekaterih parametrov na porazdelitev električnega polja znotraj in v okolici tumorja pri klinični elektrokemoterapiji. Rezultate, dobljene z modelskimi izračuni bomo primerjali z eksperimentalnimi podatki pridobljenimi z meritvami na podkožnih tumorjih malih živali (miš, podgana...)

Model, ki smo ga uporabili za študijo klinične elektrokemoterapije podkožnih tumorjev, je bil zgrajen iz naslednjih tkiv oziroma organov: kože, podkožnega maščevja, podkožnega tumorja in mišice. Ker je specifična električna prevodnost kosti, ki se nahaja pod mišico, zelo majhna, nismo upoštevali nižje ležeče anatomije, saj je polje v primeru para ploščatih elektrod, nameščenega ob tumorju, lokalno omejeno. Na sliki 1 vidimo geometrijo našega modela z vsemi dimenzijami.



Slika 1: Slika geometrije modela z dimenzijami

Model, ki ga vidimo na sliki 1, je osnovni model podkožnega tumorja. Pri kasnejši parametrizaciji smo geometrijo tudi malce spreminjali, da bi ugotovili kolikšen vpliv ima to na končni rezultat, torej odziv matematičnega modela. Spreminjali smo tudi vrednosti specifičnih prevodnosti modela in opazovali njihov vpliv, ter vpliv parametrov poteka elektroporacije tkiv.

Elektrode smo modelirali kot robni pogoj, torej v modelu elektroda ne nastopa kot fizični element. Robni pogoj smo postavili tako, da modelira ploščate elektrode debeline 1 mm, oddaljenosti 8 mm, pri čemer upoštevamo tudi prisotnost prevodnega gela med elektrodami in kožo, kar pomeni da smo robni pogoj postavili na malce širše območje kot ga narekujejo same dimenzije elektrod.

---



---

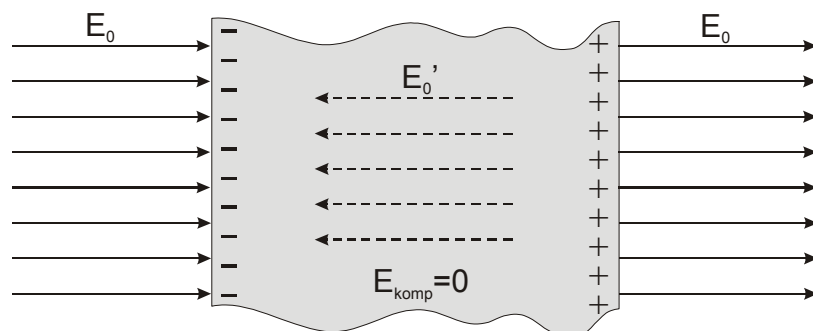
## 3. ELEKTRIČNE LASTNOSTI BIOLOŠKIH TKIV

Za analizo dogajanja v tkivu, pri kateri želimo določiti porazdelitev vektorskih in skalarnih polj v tkivu oziroma organizmu kot posledico električne stimulacije, potrebujemo vrednosti specifičnih električnih prevodnosti in relativnih dielektričnosti ustreznih tkiv oziroma organov. Zaradi različnih oblik celic in različnih načinov njihove namestitve v tkivu ter različnih električnih lastnosti medceličnega prostora, je dogajanje v tkivih na mikro nivoju precej kompleksno. Pri modelnih izračunih porazdelitve polj znotraj bioloških sistemov električno prevodnost in dielektričnost obravnavamo kot makroskopski parameter. Električne lastnosti bioloških tkiv so lahko anizotropne (mišica), kompleksne (vsebuje realni in imaginarni del, tkivo ni 100% prevodnik ali pa 100% izolator, lastnosti tkiva so frekvenčno odvisne) in so lahko časovno ter prostorsko spremenljive (sprememba prevodnosti zaradi elektroporacije tkiva).

### 3.1. SNOV V ELEKTRIČNEM POLJU

#### 3.1.1. PREVODNIK V ELEKTROSTATIČNEM POLJU

Tipično za električno prevodne snovi je, da so elektroni na zadnji lupini energijsko šibko vezani na jedro in se morejo prosteje gibati v medatomarnem svetu – so brez matičnega atoma. Rečemo da so energijsko v t.i. prevodnem pasu. Vemo tudi, da se količina elektronov v prevodnem pasu s temperaturo povečuje, z zniževanjem te – proti absolutni ničli – pa nabor elektronov plahni [12]. Kovina je navzven električno nevtralna, ko pa jo damo v električno polje, se začnejo v prevodniku in v prvotnem električnem polju dogajati določene spremembe. Po prehodnem pojavu, ki je odvisen od relaksacijskega časa kovine in je okoli  $10^{-19}$  s, se vzpostavi novo stanje. Prevodno telo se polarizira, elektrine se razdvojijo tako, da je na prihajajoči strani polja presežek (-) elektrine, na odhajajoči strani pa presežek (+) elektrine. Temu pojavu rečemo električna influenza ali električna indukcija. Polarizirano telo izgleda globalno kot elektrinski par (dipol). Influidirani naboj ustvari dodatno električno polje, ki prvotnemu polju nasprotuje in ga povsem kompenzira (slika 2). V elektrostatiki je torej rezultirajoče električno polje v prevodniku enako nič! Polje je enako nič tudi, če so v kovini prazni prostori (Faradayeva kletka). Vnešeno prevodno nevtravno telo pa izdatno popači tudi prvotno zunanje polje. Spremembe so predvsem izrazite v neposredni okolici telesa, medtem ko je popačitev daleč stran od telesa sorazmerna upadanju polja v okolici točkastega dipola-upada torej s tretjo potenco.

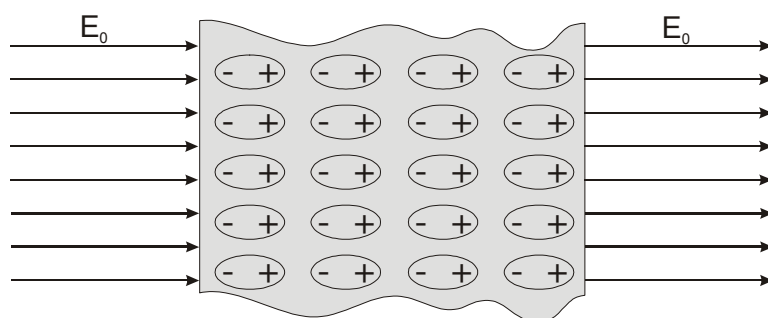


Slika 2: Prevodnik v elektrostatičnem polju

V prevodniku je električno polje le, če teče po njem tok. V elektrostatiki, v kateri preučujemo mirujoče naboje, moramo zmeraj upoštevati da v prevodnikih ni električnega polja. Prevodniški elektroni so sicer gibljivi, a ne zapustijo prevodnika. Zato se nabere presežek ali primankljaj naboja na površini prevodnika. Električno silo, ki deluje na prevodniške elektrone v električnem polju, uravnovesi sila, ki jih veže na prevodnik. Električna sila mora biti pravokotna na površino, se pravi, ne sme imeti tangencialne komponente. Sila, ki veže prevodniške elektrone na prevodnik, ima namreč le komponento v smeri pravokotno na površino. Tangencialna komponenta električne sile bi povzročila tok po površini.

### 3.1.2. IZOLATOR – DIELEKTRIK V ELEKTROSTATIČNEM POLJU

Obnašanje teh snovi v elektrostatičnem polju je povsem drugačno, pogojeno predvsem z njihovim pomanjkanjem prostih elektronov [12]. Relaksacijski časi so reda velikosti nekaj sekund pri steklu, do nekaj dni pri kvarcu, zato pri tipičnih izolacijskih materialih ne moremo računati s prevodniško naravo odziva na vsiljeno elektrostatično polje. V izolatorju torej ni prostih nosilcev naboja, vseeno pa vsebujejo vezane naboje (polarne molekule, ione). Če izolator položimo v električno polje, se težišči pozitivnega in negativnega naboja razmakneta, atom, molekula, oziroma ionska vez se tako raztegne v električni dipol. Zamislimo si nek kompakten kos izolatorja z induciranimi dipoli. Na prihajajoči strani polja imamo presežek vezane (-) elektrine, na odhajajoči strani pa presežek vezane (+) elektrine. Polje vmesnih ( $\pm$ ) elektrin se kompenzira, (-) in (+) elektrine na zunanjih plasteh pa ustvarjajo v vmesnem prostoru polje, ki je v nasprotni smeri zunanjega polja in mu nasprotuje, torej polje v dielektriku slabi, vendar se ne izniči tako kot v kovinah (slika 3).



Slika 3: Izolator (dielektrik) v elektrostatičnem polju

---

Jakost električnega polja v snovi ( $E$ ) je manjša kot jakost prvotnega polja na mestu kjer je zdaj dielektrik ( $E_0$ ) in sicer:

$$E = \frac{E_0}{\varepsilon} \quad (3.1)$$

pri čemer se brezdimenzijski parameter  $\varepsilon$  imenuje dielektričnost snovi. Čim bolj se atomi oziroma molekule snovi deformirajo, tem močnejši naboj se influira, tem bolj polje na območju snovi oslabi, tem večja je dielektričnost  $\varepsilon$ . Dielektričnost snovi je produkt dielektričnosti praznega prostora  $\varepsilon_0$  ( $8.854 \cdot 10^{-12}$  As/Vm) in brezdimenzijskega parametra relativne dielektričnosti snovi  $\varepsilon_r$ :

$$\varepsilon = \varepsilon_r \cdot \varepsilon_0 \quad (3.2)$$

### 3.1.3. BIOLOŠKI MATERIAL V TOKOVNEM POLJU

Dielektrik lahko definiramo preprosto kot katerikoli material, ki ga damo med plošči kondenzatorja. Če smo natančni, pa je dielektrik material, v katerega električno polje prodre, česar ne bi mogli trditi za prevodnik v statičnem električnem polju. V osnovi je idealen dielektrik material brez prostih nabojev. Lahko pa ga definiramo tudi kot material, v katerem je kapacitivni tok večji od izgubnega, oziroma  $\omega C > G$ . Glede na to definicijo pri dovolj visoki frekvenci tudi prevodnik po svojih dielektričnih lastnostih postane dielektrik. Definicija je torej frekvenčno odvisna, zato materialov ne moremo tako preprosto razdeliti na prevodnike in dielektrike. Vsekakor pa lahko material proglasimo za dielektrik, če ima sposobnost kapacitivnega shranjevanja energije in ne zgolj njene porabe. [13]

Dielektričnost ( $\varepsilon$ ) in prevodnost ( $\gamma$ ) materiala sta, posamično, gostota naboja in gostota toka inducirane kot odgovor na električno polje [14],[15]. Primer lahko ilustriramo z idealnim ploščnim kondenzatorjem s površino plošč  $A$  in razmikom med njimi  $d$ , znotraj katerega je material, ki nas zanima. Najprej naj bo v prostoru med ploščama vakuum. Konstantna priključena napetost  $V$  med ploščama inducira naslednjo gostoto naboja  $D$ :

$$D = \varepsilon_0 \cdot \frac{V}{d} \quad (3.3)$$

Kjer je  $\varepsilon_0$  dielektričnost praznega prostora ( $8.85 \times 10^{-12}$  F/m).

Kapacitivnost  $C$  je razmerje med induciranim nabojem na ploščah kondenzatorja in pritisnjeno napetostjo (ne upoštevajoč stresanega polja na robovih kondenzatorja)

$$C = \varepsilon_0 \cdot \frac{A}{d} \quad (3.4)$$

Če damo med plošče kondenzatorja nek material, se na ploščah kondenzatorja inducira dodaten naboj  $P_s$ , ki nastane zaradi polarizacije nabojev znotraj materiala. Za dovolj majhne napetosti je ta gostota naboja proporcionalna polju  $E$  in jo lahko napišemo kot:

$$\begin{aligned} D &= \varepsilon_0 E + P_s \\ &= \varepsilon_r \varepsilon_0 E \end{aligned} \quad (3.5)$$

---

kapacitivnost pa je

$$C = \varepsilon_r \varepsilon_0 \cdot \frac{A}{d} \quad (3.6)$$

kjer je  $\varepsilon_r$  relativna dielektričnost materiala. Merilni tokokrog lahko vsebuje tudi prevodnost  $G$ , ki je paralelna s kapacitivnostjo:

$$G = \gamma \cdot \frac{A}{d} \quad (3.7)$$

kjer je  $\gamma$  enosmerna specifična prevodnost materiala.

V odgovor na izmenična polja se dielektrične lastnosti spreminjajo s frekvenco, če so prisotni procesi dielektrične relaksacije. Električne lastnosti materiala lahko opišemo v kompleksnem in imajo tako prevodniške kot tudi kapacitivne lastnosti. Ko material vsebuje tako dipole kot tudi proste naboje, moramo njegove lastnosti opisati v kompleksnem. Celoten tok skozi material je vsota uporovne in kapacitivne komponente  $I = I_R + I_C$  in ga napišemo kot:

$$I = \frac{V}{R} + C \frac{dV}{dt} \quad (3.8)$$

za sinusno vzbujanje, lahko enačbo napišemo kot:

$$I = \frac{V\gamma A}{d} + V \left( \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r A}{d} \right) j\omega \quad (3.9)$$

ali ekvivalentno

$$I = \frac{VA}{d} (\gamma + j\omega \varepsilon_0 \varepsilon_r) \quad (3.10)$$

S krožno frekvenco  $\omega$  lahko kompleksno admitanco  $Y^*$  napišemo kot:

$$\begin{aligned} Y^* &= G + j\omega C \\ &= (A/d)(\gamma + j\omega \varepsilon_0 \varepsilon_r) \end{aligned} \quad (3.11)$$

iz katerega definiramo kompleksno prevodnost  $\gamma^*$  materiala:

$$\boxed{\gamma^* = \gamma + j\omega \varepsilon_0 \varepsilon_r} \quad (3.12)$$

enačbo (3.10) lahko napišemo tudi kot

$$I = \frac{j\omega \varepsilon_0 A}{d} \left( \varepsilon_r - \frac{j\gamma}{\omega \varepsilon_0} \right) V \quad (3.13)$$

---

Izraz v oklepaju je kompleksna dielektrična konstanta, ki jo napišemo kot:

$$\boxed{\varepsilon^* = \varepsilon_r - \frac{j\gamma}{\omega\varepsilon_0}} \quad (3.14)$$

oziroma

$$\varepsilon^* = \varepsilon' - j\varepsilon'' \quad (3.15)$$

kjer sta  $\varepsilon' = \varepsilon_r$  in  $\varepsilon'' = \sigma/(\omega\varepsilon_0)$ . Enačbi (3.12) in (3.14) opisujeta nek material.

Kompleksna prevodnost in dielektričnost sta povezani v enačbi:

$$\boxed{\gamma^* = j\omega\varepsilon^*\varepsilon_0} \quad (3.16)$$

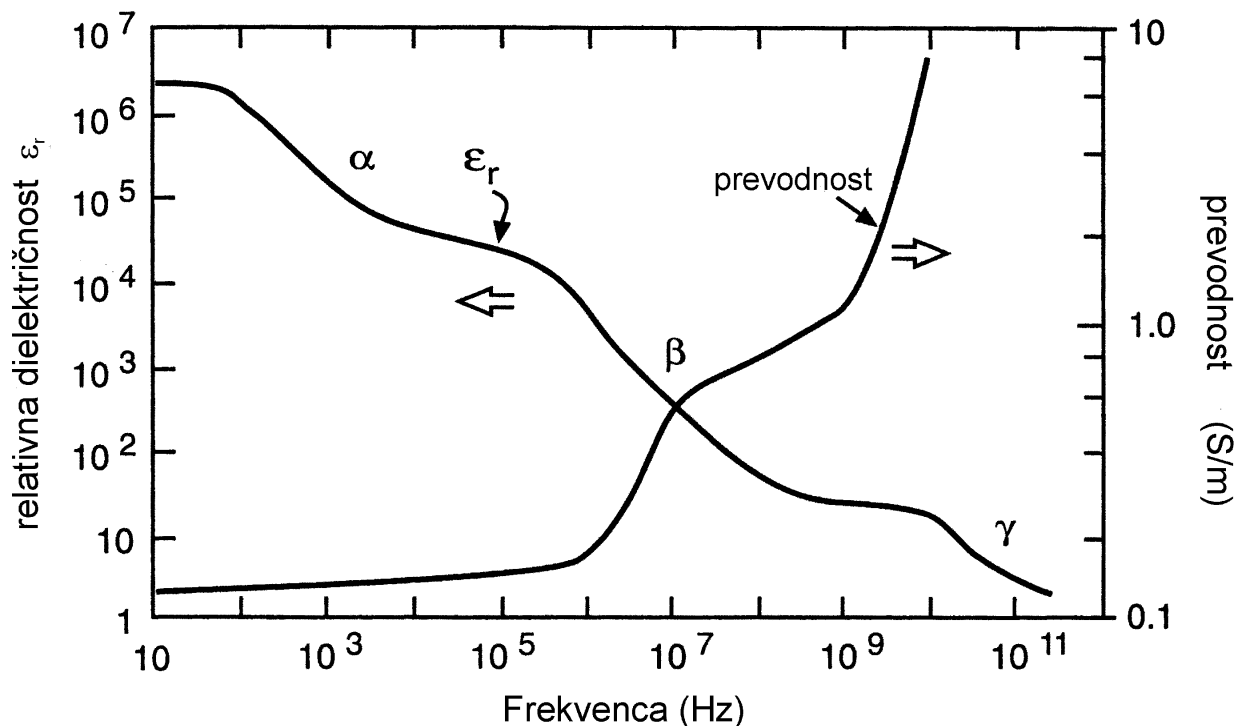
V zgornji izpeljavi predpostavimo, da se dipoli orientirajo glede na notranje izmenično polje in spremenijo svojo orientacijo vsako polovico cikla. Dipoli imajo določeno vztrajnost in ne morejo slediti oscilacijam polja če so le-te prehitre. Zato je relativna dielektričnost največja pri nizkih frekvencah in pade, ko frekvenca zraste nad določeno mejo. Pri zelo visokih frekvencah dipoli ohranijo naključno orientacijo in relativna dielektričnost materiala se približa 1. [15]

Sposobnost materiala da se odziva na električno polje, lahko izrazimo v smislu relaksacijskega časa  $\tau_r$ , oziroma ekvivalentno v smislu relaksacijske frekvence  $\omega_r = 2\pi f_r = 1/\tau_r$ . V tipičnem biološkem mediju obstaja več mehanizmov za tvorbo dipolov, vsak z drugačnim relaksacijskim časom. Poleg tega nastanejo na meji med dvema različnima dielektričnostma enaki relaksacijski časi za oba tkiva zaradi gradnje nabojev na teh mejah.

V literaturi dostikrat zasledimo da so vse dielektrične lastnosti bioloških materialov odvisne od fenomena relaksacije. Vendar pa je v resnici koncept relaksacije povezan z zakasnenim odzivom in torej ne igra vloge pri frekvenčno neodvisni enosmerni prevodnosti, ki je konstantna s časom in ne pozna relaksacije. [13]

Slika 4 ilustrira primer relaksacij tipičnega biološkega materiala. Padci v krivulji nastanejo zaradi različnih mehanizmov polarizacije in jih imenujemo električna disperzija. [15]

- ◆ Pri nizkih frekvencah,  $\alpha$  disperzija je povezana s procesi ionske difuzije na mestu celične membrane.
- ◆  $\beta$  disperzija v področju 100 kHz nastane zaradi polarizacije celičnih membran, ki se obnašajo kot bariere pretoku ionov med znotraj in zunaj celičnim medijem. Drugi prispevki beta disperzije se pojavijo zaradi polarizacije proteinov in drugih organskih makromolekul.
- ◆  $\gamma$  disperzija v področju gigahercov ( $10^9$  Hz) nastane zaradi polarizacije vodnih molekul.



Slika 4: Tipična frekvenčna odvisnost kompleksne dielektričnosti tkiva [15]

Relativna dielektričnost biomaterialov pri nizkih frekvencah je lahko reda  $10^6$ . Te vrednosti so neverjetno visoke v primerjavi z ostalimi dielektričnimi materiali, za katere so tipične vrednosti 5 do 10. Kljub tako visoki dielektričnosti pa ostajajo biološki materiali izrazito uporabni. [15]

### 3.2. MERITVE BIOLOŠKIH MATERIALOV

Biolško tkivo je zelo nehomogen material. Celice so različnih velikosti in imajo različne funkcije. V prevodnosti tkiv zasledimo velike razlike: zaradi tekočega tkiva, ki teče po žilah, mielinskih ovojnici, ki kot izolatorji ovijajo aksone živčnih celic, veznega tkiva, ki mora prenesti mehanični stres, kosti, zob, mišic, mrtvih delov kože, plinov v pljučnem tkivu, itn. Z električnega stališča tkivo težko obravnavamo kot homogen material. [13]

Podatki o električnih lastnostih tkiv, ki jih zasledimo v literaturi, se med seboj zelo razlikujejo. Zakaj nastajajo take razlike med različnimi meritvami? Različni vzorci tkiv vsebujejo različne količine telesnih tekočin, standardizacija merilne tehnike pa predstavlja še večji problem. Potem so tu še sezonske spremembe, dejavniki okolja, starost osebkov in razlike povezane z bolezenskimi stanji. [16]

Najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na meritve na bioloških materialih in na katere moramo biti pozorni, so podani v nadaljevanju.

---

### 3.2.1. ANIZOTROPNOST BIOLOŠKIH MATERIALOV

Nekateri biološki materiali imajo izrazite anizotropne lastnosti, zato moramo biti pri podatkih v literaturi pozorni ali se nanašajo na longitudinalne, transverzalne ali povprečne vrednosti prevodnosti in dielektričnosti. Primer takega tkiva je mišica.

Mišične celice oziroma mišična vlakna so usmerjena vzdolž smeri krčenja mišice, zato to biološko tkivo izraža tipične anizotropne električne lastnosti. To pomeni da so električne lastnosti odvisne od smeri. Tako govorimo o vzdolžnih ali longitudinalnih lastnostih, vzporednimi s smerjo vlaken, in o prečnih ali transverzalnih lastnostih, prečnimi glede na smer vlaken. Razlog za to je smer toka, ki mora v pravokotni smeri na vlakna teči po "ovinkasti" poti, medtem ko v paralelni smeri teče po krajši, "ravni" poti [15]. Razlika v dolžini poti povzroči razliko v upornosti med obema smerema.

V splošnem efektivna specifična električna prevodnost in dielektričnost nista več skalarni vrednosti, ampak tenzorja. Če izberemo koordinatni sistem tako, da so osi vzporedne oziroma pravokotne glede na smer vlaken, se tenzor poenostavi in so od nič različni le elementi na diagonalni matrike. Zaradi zgradbe in kapacitivnih lastnosti celične membrane je anizotropnost odvisna od frekvence uporabljenih tokov. Če je frekvenca toka zadosti visoka, anizotropne lastnosti izginejo (konkretno za mišico anizotropnost izgine nekje v frekvenčnem področju MHz).

Pri merjenju električnih lastnosti anizotropnih materialov se pojavi problem, kako doseči homogeno električno polje najprej vzporedno z vlakni in nato prečno nanje. Namreč, če hočemo pravilno izmeriti vzdolžno upornost mišice, moramo doseči popolno ujemanje med smerjo tokovnega polja in orientacijo celic. [17]

Meritve Epsteina in Fosterja kažejo na to, da že 5 stopinjsko neujemanje polja s smerjo mišičnih vlaken pomeni 18% previsoke vrednosti za specifično prevodnost v pravokotni smeri in le 0,4% prenizke vrednosti za specifično prevodnost v vzdolžni smeri. [18]

Večina avtorjev poroča, da je prevodnost mišice v prečni smeri pri nizkih frekvencah približno 10-15% prevodnosti v vzdolžni smeri (pri nizkih frekvencah, pod 100 kHz!)

Poleg skeletne mišice imajo anizotropne lastnosti tudi nekatera druga tkiva: srce, živčno tkivo.

### 3.2.2. POLARIZACIJA ELEKTROD (IZBIRA MERILNE TEHNIKE)

V praksi meritve na prevodnih materialih v frekvenčnem območju 10 Hz do 10 MHz niso preproste. Na meritve vplivata dva vira sistematičnih napak, polarizacija elektrod in indukcijske napake, ki predvsem postanejo očitne na spodnjem in zgornjem robu obravnavanega frekvenčnega območja. Polarizacija elektrod se kaže v razporeditvi molekularnih nabojev na stiku tkivo-elektroda v prisotnosti vodnih molekul in hidriranih ionov. V preprosti obliki lahko ta pojav opišemo s kondenzatorjem s frekvenčno odvisno impedanco v seriji z uporom. Obe komponenti lahko aproksimiramo kot funkcijo frekvence z negativno potenco, kar pomeni, da njuni absolutni vrednosti padata z naraščanjem frekvence. Efekt narašča z naraščanjem prevodnosti vzorca, in je bolj izražen na kapacitanci kot na konduktanci tako ionskih raztopin kot tudi bioloških vzorcev. V primeru bioloških

---

vzorcev slabo prevodne celice zakrivajo del elektrode pred ionskim tokom in torej zmanjšajo efekt polarizacije v primerjavi z ionsko raztopino iste prevodnosti kot medij znotraj celice. V določitvi polarizacijske impedance elektrode igra pomembno vlogo tudi material iz katerega je elektroda narejena. [19]

V osnovi poznamo dva načina merjenja dielektričnih lastnosti tkiv. Tako imenovani dvoelektrodna in štirielektrodna metoda. Obe metodi lahko v principu uporabljamo tako v enosmernih kot tudi v izmeničnih razmerah, seveda pa z omejitvami. [20]

### **3.2.2.1. 2-ELEKTRODNE MERITVE**

Ta metoda je primerna za izmenične meritve. V enosmernih razmerah je namreč ne moremo uporabljati zaradi efekta polarizacije elektrod, ki ustvari proti napetost in s tem spremembo upornosti merjenca med elektrodama. Pri merjenju moramo rezultat popraviti, še posebej za nižje frekvence (pod 100 kHz), kjer je efekt polarizacije elektrod še toliko bolj izražen.

### **3.2.2.2. 4-ELEKTRODNE MERITVE**

To metodo lahko uporabimo tako v izmeničnih kot tudi v enosmernih razmerah. Uporabljamo dva seta elektrod: tokovni elektrodi in napetostni elektrodi. Tok, ki ga daje napetostni vir, potuje skozi merjenec. Napetostni elektrodi postavimo na oziroma v objekt in med tokovni elektrodi, pri čemer je razdalja med njima znana. Merimo napetost med tema dvema elektrodama, iz česar izračunamo specifično upornost materiala med napetostnimi elektrodami. Prednost te metode je, da polarizacija na tokovnih elektrodah nima nobenega vpliva na razmerje med potencialno razliko med merilnima sondama. Polarizacija na napetostnih elektrodah pa je zanemarljiva, tako v izmeničnih kot tudi v enosmernih razmerah, zaradi visoke vhodne impedance merilnega sistema (torej je tok ki teče skozi napetostni elektrodi, zanemarljiv).

Nekateri avtorji namesto 4-elektrodnega sistema predlagajo 2-elektrodnega z metodo popravljanja napake [17]. Napake zaradi polarizacije elektrod naj bi znašale 3-5 procentov pri frekvenci 100 Hz, pri frekvenci 10 Hz pa že 10-15 procentov upornosti. S predlagano metodo popravljanja napake zaradi polarizacije, poročajo o manjših napakah in sicer le še 3% pri frekvenci 10 Hz in manj kot 1% pri višjih frekvencah. Pri 4-elektrodnem sistemu naj bi polarizacija elektrod namreč ne bila popolnoma odpravljena.

Rush, Abildskov, McFee podobno poročajo da so pri 2-elektrodni tehniki merjenja upornosti mišice rezultati za približno 20% višji kot pri 4-elektrodni tehniki. [21]

Pri izbiri merilne metode moramo biti pozorni tudi na geometrijo merilne celice in amplitudo merilnega toka.

### **3.2.3. SPREMEMBE TKIVA PO SMRTI**

Metabolizem tkiva po odstranitvi iz telesa upade, temperatura tkiva pade. Tudi po smrti ga lahko poizkušamo vzdrževati v namene merjenja (vzdrževanje temperature in sistemi umetne prekrvitve) in ga tako stabiliziramo za omejen čas za eksperimente *in vitro* (*ex vivo*).



---

Če tega ne storimo, se pojavijo ireverzibilne spremembe, ki jim sledi celična in tkivna smrt. Za različna tkiva je seveda čas nastopa ireverzibilnih sprememb različen. [13]

Pomembna je tudi vsebnost krvi v tkivu, saj lahko zaradi dobre prevodnosti krvi (cca 100  $\Omega\text{cm}$  pri telesni temperaturi), že majhne spremembe v volumnu krvi v tkivu povzročijo opazne razlike v upornosti tkiva. To je že samo po sebi, brez razmišljanja da je "živo" tkivo najbrž drugačno od "mrtvega", dovolj velik razlog za *in situ* merjenja, če želimo dobiti kar najbolj natančne rezultate. [17]

Spremembe upornosti, ki spremljajo celično smrt je preučevalo že dosti raziskovalcev. Odkrili so, da je v prvi uri po odstranitvi tkiva iz telesa specifična upornost skoraj konstantna (odvisno od tkiva). Prve spremembe se začnejo pojavljati v jetrih po pol ure, v možganih po 1 uri in v mišici po 2 urah. V vseh primerih pa upornost s časom pada. [16]

Schwan poroča da dielektričnost mišice žabe pri 10 Hz pade za faktor 2 v 2,5 urah po smrti, spremembe v frekvenčnem področju nad 100 Hz pa so manjše in opazne šele po daljšem času. Ker pa je impedanca tkiva pri nizkih frekvencah skoraj popolnoma uporabne narave, napake dielektričnosti tu ne igrajo velike vloge.

### 3.2.4. OSTALI DEJAVNIKI

- Tkiva se med seboj razlikujejo tudi v odvisnosti od živalske vrste, kateri pripadajo (F.X. Hart, meritve na mišicah različnih živali [22]). Vseeno pa lahko iz literature, po primerjavi različnih meritev na različnih živalskih vrstah ugotovimo, da te razlike niso sistematične in so lahko dosti večje znotraj iste vrste kot med različnimi vrstami. [19]
- Prav tako so meritve odvisne od temperature, zato jih je priporočljivo izvajati pri normalni telesni temperaturi, ki je za toplokrvne živali okoli 37°C, tudi če merimo na mrtvih tkivih.
- Vpliv na dielektrične lastnosti tkiva pa imajo tudi sezonske spremembe, dejavniki okolja, starost osebka in morebitna bolezenska stanja osebka.

### 3.3. DIELEKTRIČNE LASTNOSTI TKIV

Biološka tkiva se po prevajalnih lastnostih med seboj razlikujejo. Kri je zelo dober prevodnik, jetra in vranica manj. Možgani prevajajo boljše, mišica slabše, vseeno pa zaradi njune anizotropije težko posplošimo njune prevajalne sposobnosti. Med najslabšimi prevodniki v telesih toplokrvnih živali so koža, pljuča, maščoba in kosti. [16]

Biološke tekočine in skoraj vsa tkiva izkazujejo negativni temperaturni koeficient upornosti, to pomeni da z naraščanjem temperature narašča prevodnost tkiva. In nadalje, v večini tkiv, z možno izjemo fistih, ki izražajo zadostno stopnjo anizotropnosti, vrednosti upornosti v frekvenčnem območju med 0 Hz in nekaj 100 kHz ne izkazujejo izrazite frekvenčne odvisnosti.

V literaturi večinoma zasledimo podatke o dielektrični konstanti in specifični prevodnosti tkiv za frekvence nad 100 Hz. [23] Za večino tkiv so podatki pod 100 Hz zelo omejeni ali pa celo ne obstajajo. Razlog za to ni nezanimanje za to frekvenčno področje, ampak omejitve pri izbiri merilne metode. Le-te so namreč pri nizkih frekvencah vir sistematičnih napak. Pod 100 Hz je impedanca bioloških materialov predvsem resistivna. Prispevek kapacitivne komponente je reda 10% v večini primerov.

---

V nadaljevanju so zbrani podatki iz literature za nekatera biološka tkiva. Omejili smo se le na tista, ki nas zanimajo pri eksperimentiranju in gradnji numeričnega modela podkožnega tumorja. Za osnovo smo vzeli grafe iz obširne raziskave Gabriel et al [19],[23]-[25], kjer so poleg njihovih meritev zbrani tudi podatki starejših meritev drugih raziskovalcev, in temu dodali še nekaj podatkov iz literature [16],[18],[20],[21],[26]-[36].

### 3.3.1. TUMOR

Če primerjamo električne lastnosti tumorja in zdravega okoliškega tkiva (jetra), opazimo da je tumorsko tkivo bolj prevodno. In sicer pri nizkih frekvencah je vzrok manjša volumska vsebnost zdravih celic, pri visokih frekvencah pa je prevodnost višja zaradi višje vsebnosti vode. [26]

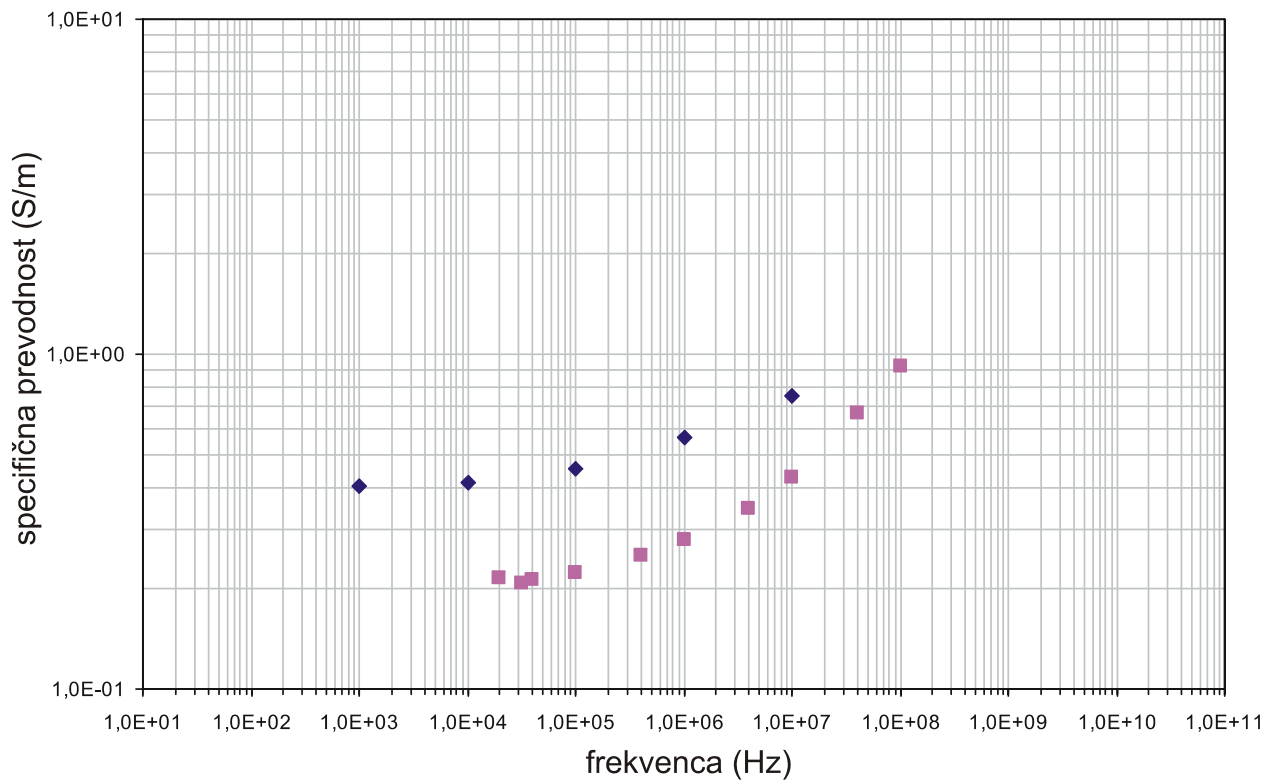
Električne lastnosti tumorjev, če jih primerjamo z okoliškim, zdravim tkivom so pomembne tudi pri diagnosticiranju prisotnosti tumorja v tkivu. Veliko je bilo namreč poskusov, kjer so želeli te razlike uporabiti v diagnostične namene. Smith s sodelavci ugotavlja, da se dielektrične lastnosti tumorja in okoliškega zdravega tkiva jeter opazno razlikujejo in sicer za faktor 6-7,5 v prevodnosti in za faktor 2-5 v dielektričnosti [26]. Izražene razlike v električnih lastnostih med tumorjem in okoliškimi zdravimi tkivi, v primeru da bi bile konsistentne, bi lahko vodile k celemu številu kliničnih aplikacij, predvsem v diagnosticiranju tumorjev s pomočjo impedančnih meritev.

Pri tumorjih je težko najti neke električne lastnosti, ki bi jih lahko posplošili na vse. Ne samo da poznamo več vrst tumorjev, ampak lahko tudi znotraj istega tipa najdemo vzorce z zelo različnimi lastnostmi, ki odražajo različne stadije razvoja tumorja. Predvsem pa so si tumorji med seboj zelo različni.

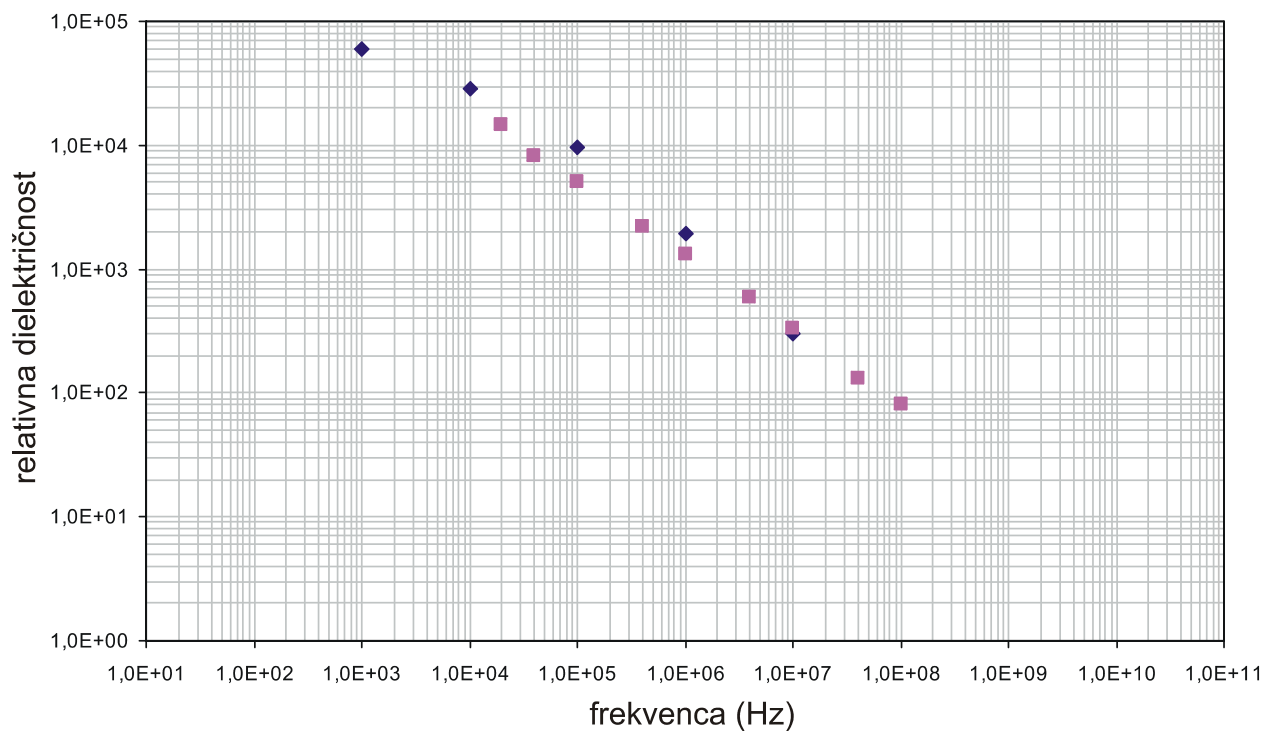
V raziskaviah Gabriel et al ni zbranih podatkov za tumor, spodaj zbrane dielektrične lastnosti smo našli v dveh člankih in sicer Smith et al [26] in Surowiec et al [27].

Smith et al (1986) [26] sta merila dielektrične lastnosti vsajenega VX-2 tumorja v primerjavi z zdravim okoliškim jetrnim tkivom pri zajcu v frekvenčnem področju od 1kHz-12 MHz. Vse meritve so bile izvedene v 16 urah po smrti živali. Po odstranitvi tkiva je bilo le-to do izvedbe meritev shranjeno pri 4°C. Relativno napako zaradi impedančnih meritev ocenjujejo znotraj 2%, in nekoliko višjo pri nižjih frekvencah (5% pri 1kHz). Vseeno pa so razlike med meritvami dosti večje (20-50%), napaka je po mnenju avtorjev biološkega izvora. Meritve so bile izvedene z dvoelektrodno metodo s Schwanovo korekcijo. V članku je več različnih meritev na tumorjih, odvisno od velikosti tumorja, kar pogojuje tudi nekrozo. Meritev, vnešena v grafu je bila izvedena na tumorskih tkivih, ki v premeru merijo manj kot 3 cm in še ne izražajo nekroze, rezultat pa je povprečje meritev na 4 vzorcih.

Meritve v raziskavi Surowiec et al (1988) [27] so bile izvedene na 28 vzorcih raka na dojki sedmih različnih pacientk. Meritve so bile narejene v manj kot 4 urah po operaciji, pri 37°C in ponovljene 10-15x pri 101 različnih frekvencah enakomerno porazdeljenih po logaritemski frekvenčni osi. Pri vsaki frekvenci je bilo izračunano povprečje, podani pa so rezultati tipičnih predstavnikov različnih tkiv. Napaka pri meritvi je ocenjena na manj kot 2% za dielektrično konstanto in manj kot 1% za prevodnost. Za zmanjšanje efekta polarizacije pri nizkih frekvencah je bila tudi tu uporabljena dvoelektrodna metoda s Schwanovo korekcijo. Za meritve, ki smo jo vnesli v graf, smo izbrali meritve na tkivu v sredini tumorja.



Slika 5: Specifična prevodnost tumorja



Slika 6: Relativna dielektričnost tumorja

- ◆ zajec, VX-2 tumor na jetrih, 2el. s Schwanovo korekcijo, 16h po smrti, Smith et al, 1986
- rak na dojki, 2el. s Schwanovo korekcijo, 4h po operaciji, 37 °C, Surowiec et al, 1988

Slika 7: Tumor legenda

---

Tumor ima glede na jetra približno 6-7,5 krat višjo prevodnost, tumorji pa so tudi na splošno bolj prevodni od tkiv v katerih rastejo. Od maščobe, ki je eden od najmanj prevodnih bioloških tkiv, je njegova prevodnost večja približno za faktor 10.

Oba zgoraj navedena avtorja ugotavljata, da so meritve na tumorjih problematične zaradi visoke strukturne nehomogenosti. Meritve so bile izvedene na različnih lokacijah znotraj tumorja, oziroma pri različnih velikostih tumorjev, v različnih razvojnih fazah, in se pri obeh raziskavah med seboj razlikujejo. Meritve, ki smo izbrali kot najbolj reprezentativne, ki naj bi kar najbolj predstavljale "čisto" tumorsko tkivo, brez nekroze, se zelo dobro ujemajo v dielektrični konstanti, in nekoliko manj v specifični prevodnosti, sploh pri nižjih frekvencah. Rezultati obeh avtorjev so delno najbrž vprašljivi tudi zato, ker so bile meritve pri obojih izvedene dokaj pozno po odstranitvi tkiva iz telesa (16 ur oziroma 4 ure po odstranitvi).

### 3.3.2. MAŠČOBA

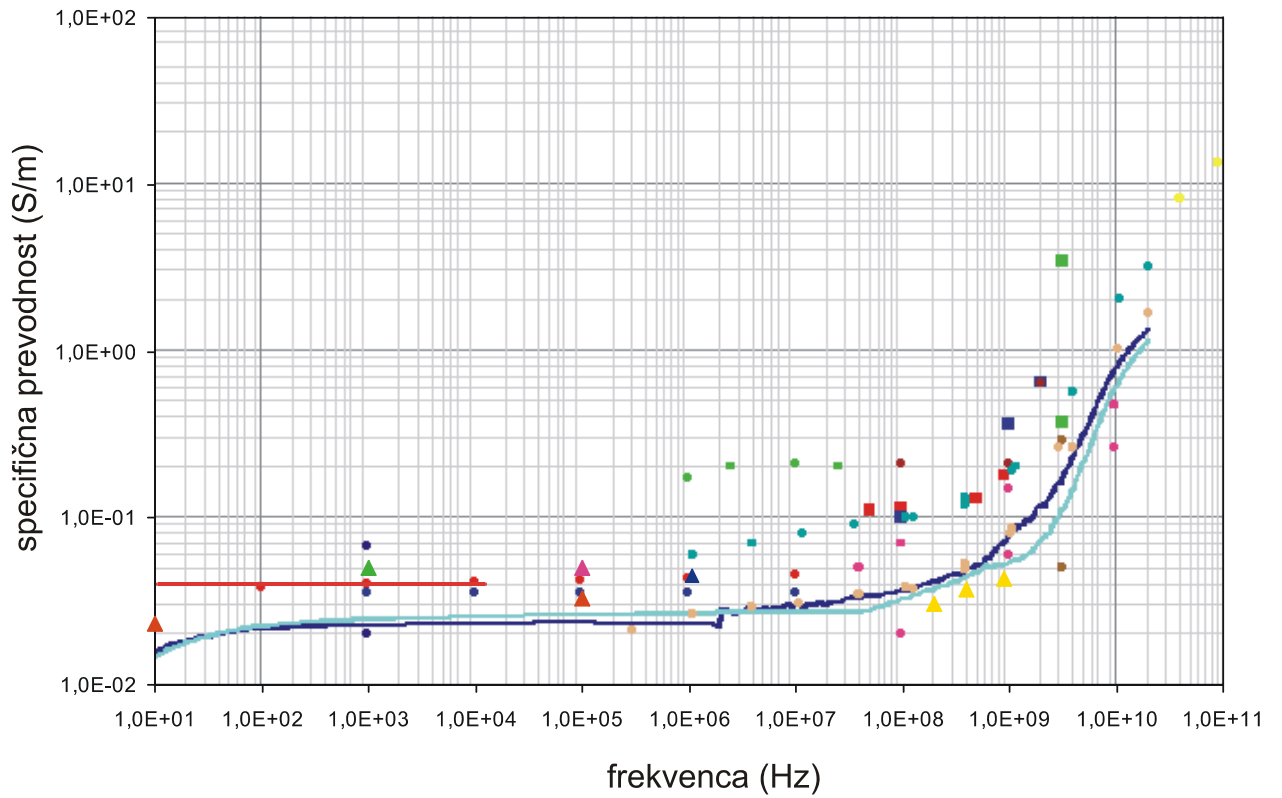
Maščoba je eden izmed najslabših prevodnikov v telesih toplokrvnih živali, zaradi svoje nizke vsebnosti elektrolitov.

Podatki in meritve na maščobi smo našli zbrane v člankih in poročilu Gabriel et al [19],[23]-[25], in sicer ločeno za maščobo in *breast fat*, kar smo prikazali na skupnih grafih (slika 8 in slika 9) in temu dodali še nekaj meritev in zbranih podatkov drugih avtorjev ([16],[21],[28]).

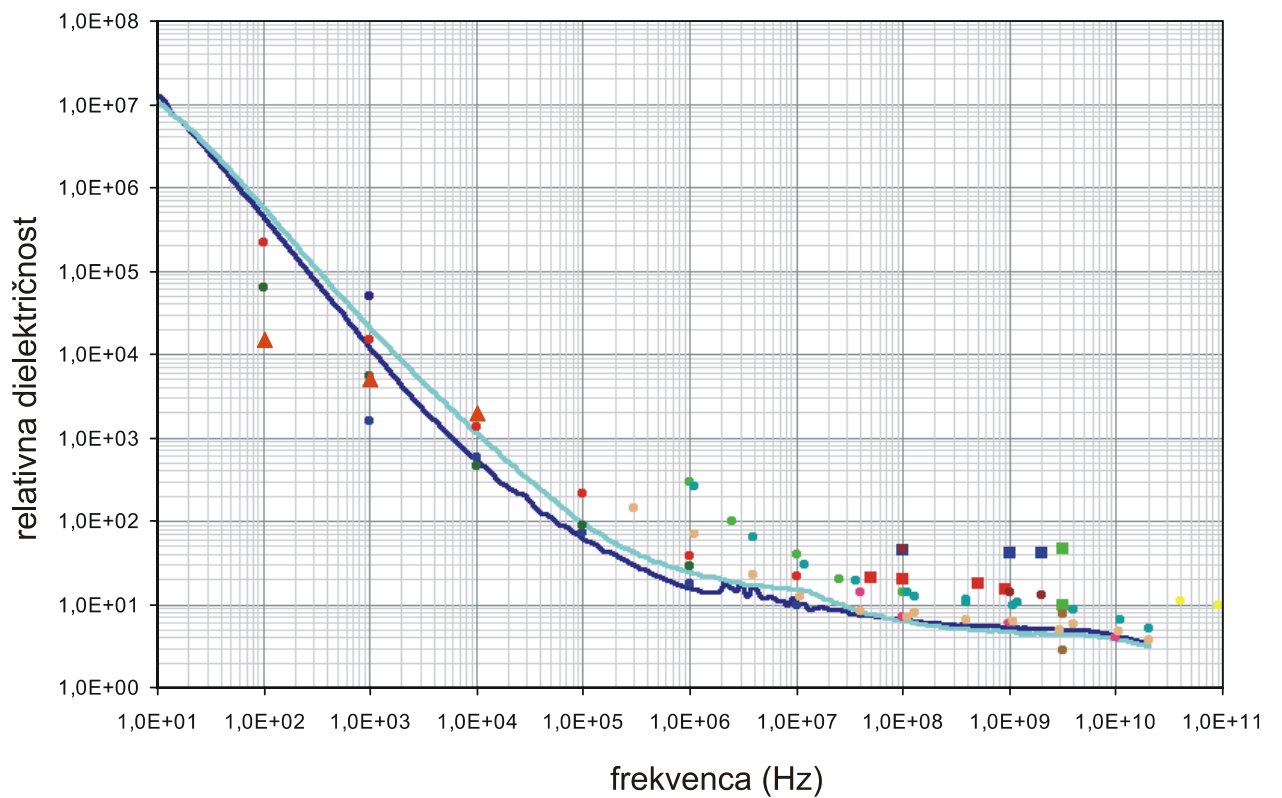
Schwan in Kay (1957) [28] sta meritve izvajala *in situ* na psih in sicer na tkivih v okolici srca, v področju frekvenc, ki jih srce povzroča s svojim normalnim delovanjem. Uporabljena je bila dvoelektrodna tehnika, a so z ocenitvijo napake zaradi polarizacije rezultate popravili. Vseeno pa ni bilo mogoče izvesti meritev navzdol do frekvence nič. Zato avtorja predlagata uporabo 10 Hz vrednosti za enosmerne razmere, saj  $\alpha$  disperzija nastopi pri višji frekvenci, pod njo pa so vrednosti skoraj konstantne.

Rush et al (1963) [21] so v članku zbrali nekaj podatkov o dielektričnih lastnostih maščobe iz literature [31], in temu dodali svoje meritve. Tako kot Schwan in Kay [28], sta tudi Kaufman in Johnston [31] uporabljala dvoelektrodno tehniko na anesteziranih živalih. Meritve Rush et al pa so bile izvedene na 50 živih, anesteziranih psih, s štirielektrodno tehniko in sicer prav tako na tkivih okoli srca v frekvenčnem področju EMF signalov, ki jih generira srce.

Geddes in Baker (1967) [16] sta v svojem članku iz literature zbrala podatke o specifični upornosti bioloških tkiv, med drugim tudi maščobe, pri čemer sta izločila tiste meritve pri katerih je zaradi dvoelektrodne merilne tehnike nastopala očitna napaka zaradi polarizacije elektrod. Za maščobo zasledimo podatke izmerjene na tkivih človeka [28],[32],[33] in psa [21],[31],[34]. Za človeško tkivo so meritve le v visokofrekvenčnem področju, oboje z dvoelektrodno merilno tehniko.



Slika 8: Specifična prevodnost maščobe



Slika 9: Relativna dielektričnost maščobe

- Bovine @ 25°C (1E2-1E7Hz) Rigaud et al, 1994
  - Porcine @ 34-36°C (1E6-1E8Hz) Hahn et al, 1980
  - Equine & Canine @ 25°C (1E3-1E7Hz) Smith & Foster, 1985
  - Bovine @ 37°C (4E10-7E10Hz) Edrich & Hardee, 1976
  - Human (4E7-1E10Hz) Schwan, 1955
  - Canine (In vivo) @ 37°C (1E8-2E9Hz) Burdette et al, 1980
  - Porcine (peritoneal cavity) @ 22°C (1E2-1E6Hz) Kyber et al, 1992
  - Canine (In situ) (1E3Hz) Schwan 1956, 57, 63 (in Durney et al, 1986)
  - Human (breast) @ 25°C (3E9Hz) Land & Campbell, 1992
  - Ovine @ 37°C (1E6-2E10Hz) Current study measurements
  - Human @ 37°C (3E5-2E10Hz) Current study measurements
  - Bovine Fat @ 37°C (1E1-2E10Hz) Current study measurements
- Breast fat**
- Human @ 23-25°C (5E7-9E8Hz) Joines et al, 1994
  - Human (glandular and connective tissue) @ 25°C (3E9Hz) Campbell & Land, 1992
  - Rat @ 30°C (1E8-2E9Hz) Joines et al, 1980
  - Human @ 37°C (1E1-2E10Hz) Current study measurements
- Ostalo**
- ▲ Clovek, 2 elektrodno, Schwan & Kay, 1957
  - ▲ Pes, anesteziran, 2 elektrodno, telesna temperatura, Kaufmann & Johnston, 1943
  - ▲ Clovek, 2 elektrodno, sveže izrezano, telesna-sobna temp., Herningway, 1937
  - ▲ Clovek, 2 elektrodno, objekt autopsije, 27 °C, Schwan, 1953
  - ▲ Pes, 2 elektrodno, telesna temp., Kinnen, 1964
  - Pes, 4 elektrodno, in situ, anesteziran, Rush et al, 1963

Slika 10: Legenda maščoba

Iz frekvenčnih potekov za specifično prevodnost in relativno dielektričnost najprej opazimo zelo dobro ujemanje med vrednostmi za govejo maščobo in človeško "breast fat", izmerjeno v študiji Gabriel et al [19],[24]. Z obema se zelo dobro ujema tudi človeška maščoba, vendar so podatki le za višje frekvence. V isti študiji so merili tudi na tkivu ovce (višje frekvence), kjer pa podatki tako za prevodnost kot tudi za dielektrično konstanto malce odstopajo navzgor. Vse meritve so bile narejene s tremi različnimi metodami v različnih frekvenčnih območjih, da bi kar najbolj izločili napake meritev, pri temperaturi 37°C, v dveh urah po smrti živali in v 24 do 48 urah po smrti kadar je šlo za človeška tkiva.

Tudi dvoelektrodne meritve Schwana in Kaya [28] se pri nizkih frekvencah lepo ujemajo z meritvami Gabriel et al, prav tako ni velikega odstopanja pri štirielektrodnih meritvah Rush et al [21] na anesteziranih psih.

Tako pri potekih specifične prevodnosti kot tudi relativne dielektričnosti pa pri nizkih frekvencah ni opazne  $\alpha$  disperzije in do frekvence  $10^6$  ali še več, specifična prevodnost je skoraj konstantna.

---

### 3.3.3. MIŠICA

Podatke in meritve na mišici smo našli zbrane v člankih in poročilu Gabriel et al [19],[23]-[25], temu pa smo dodali še nekaj meritev in zbranih podatkov drugih avtorjev ([18],[20],[21],[28],[29],[30]). Vsi ti podatki nastopajo posebej za longitudinalno in transverzalno smer, le meritve Schwana in Kaya [28] imajo naključno orientacijo. (slika 11 in slika 12)

Burger in Van Dongen (1960) [20] sta izvajala meritve na tkivih krave, konja, zajca in človeka. V grafih so prikazane samo meritve posebej za longitudinalno in transverzalno smer (nekaj sta jih naredila tudi za naključno orientacijo), ki so bile vse izmerjene s štirielektrodno tehniko. Merila sta takoj po odstranitvi tkiva iz telesa.

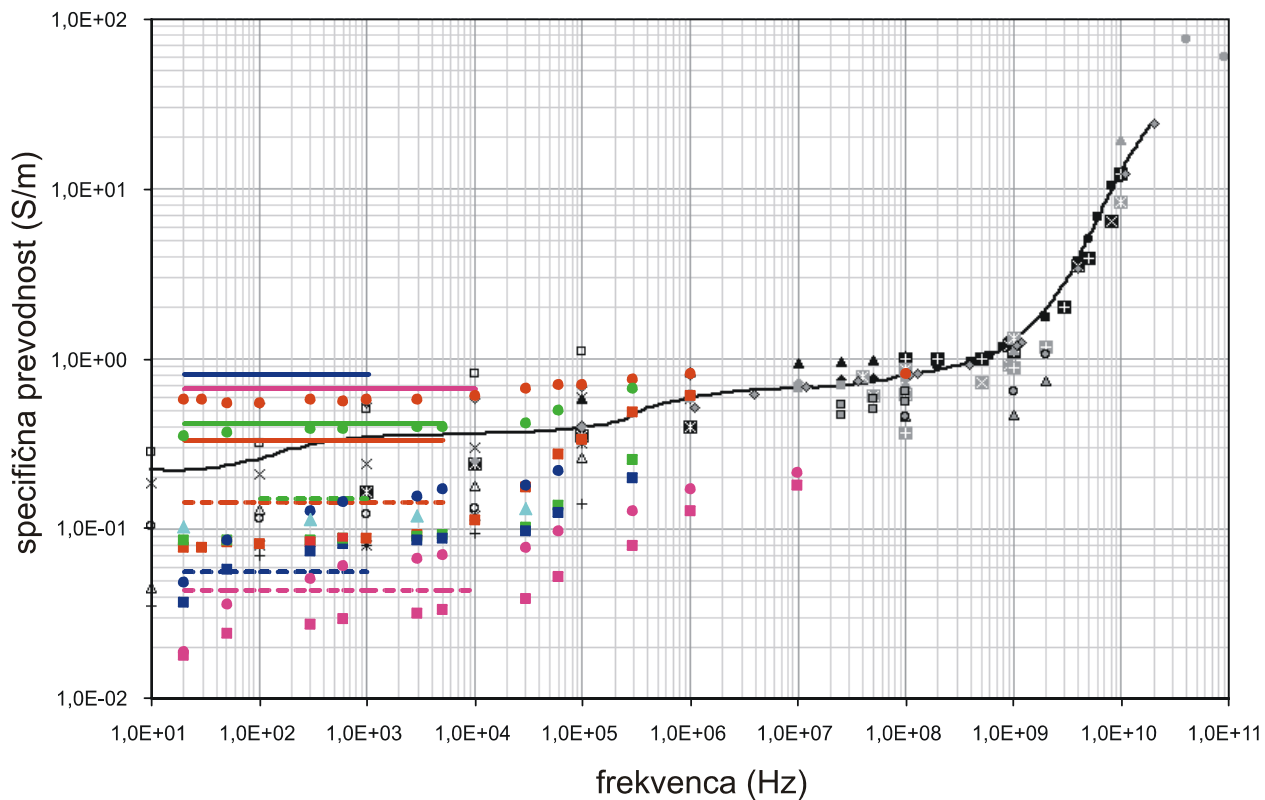
Rush et al (1963) [21] so v članku zbrali nekaj podatkov o dielektričnih lastnostih mišice iz literature, in temu dodali svoje meritve. Njihove meritve so bile izvedene na 50 živih, anesteziranih psih, s štirielektrodno tehniko in sicer na tkivih okoli srca v frekvenčnem področju EMF signalov, ki jih generira srce. Vrednosti, ki so jih izmerili, so računsko popravili za vsebnost maščobe, kosti in nepopolno ujemanje polja s smerjo mišičnih vlaken.

Epstein in Foster (1983) [18] sta v svoji raziskavi uporabljala obe merilni metodi: dvoelektrodno in štirielektrodno (za visoke in za nizke frekvence, posamično), v frekvenčnem področju 20Hz do 1MHz, in sicer na psih pri telesni temperaturi, v 6 urah po smrti živali. Tkivo je bilo izrezano iz področja bokov. Merilna napaka pri merjenju prevodnosti naj bi bila znotraj 2%. Pri merjenju relativne dielektričnosti pa poročajo o napaki 10-20% pri nizkih frekvencah (pri višjih frekvencah pa dosti manj).

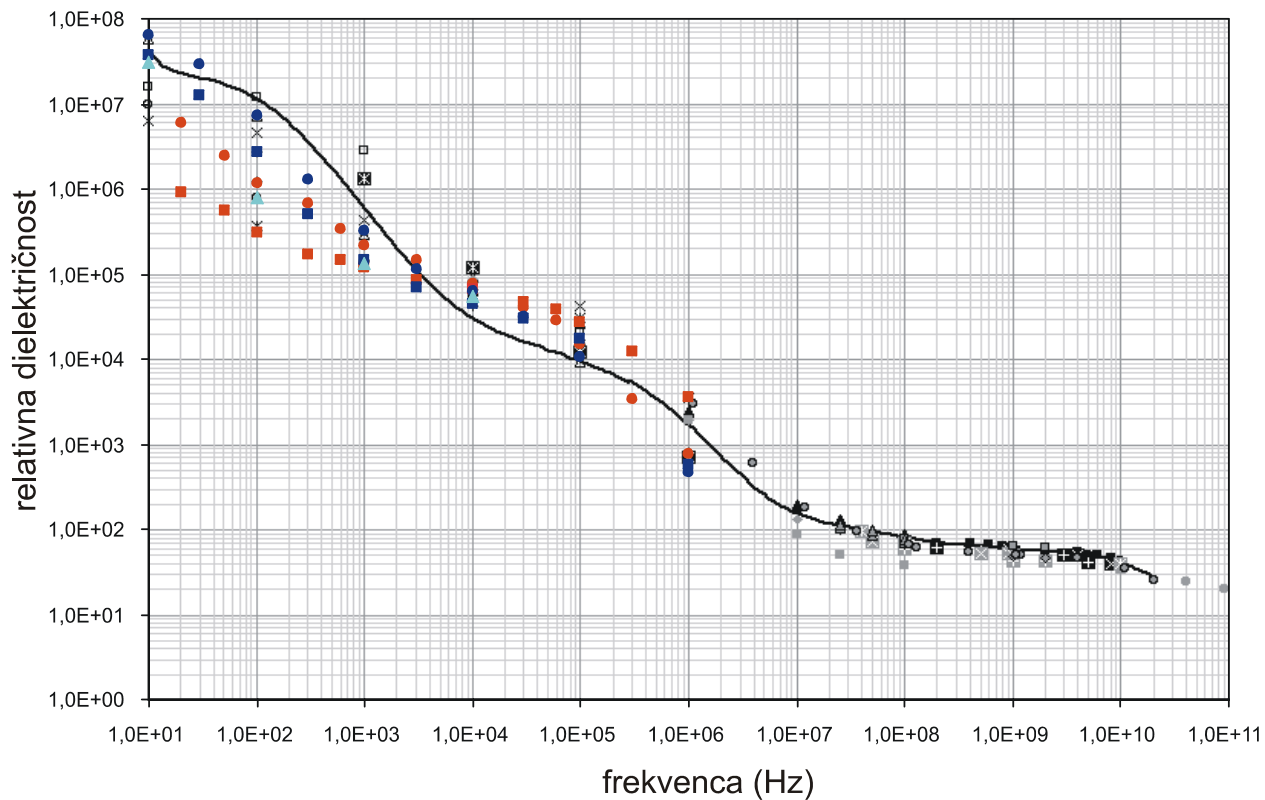
Gielen et al (1984) [29] so merili na mišici anestezirane podgane in zajca in vivo, s štirielektrodno tehniko, v frekvenčnem področju EMG signalov (cca 10Hz-20kHz). Njihove meritve so temeljile na predpostavki, da so meritve prevodnosti odvisne tudi od medelektrodne razdalje. Da bi preverili to predpostavko, so meritve izvajali na večji mišici (zajec) in na manjši (podgana). Svojo predpostavko so tudi potrdili, zato smo med številnimi meritvami izbrali samo tiste, pri katerih se medelektrodna razlika ujema s tistimi v literaturi.

Bodakian in Hart (1994) [30] sta uporabljala dvoelektrodno tehniko, zanimala pa so ju predvsem spremembe v dielektričnih lastnostih mesa s časom. Meritve sta izvajala na govejem in piščančjem mesu in sicer na vzorcih takoj po smrti živali (v dveh urah) in na komercialno kupljenih vzorcih mesa, pri 20°C. Med opravljenimi meritvami smo v grafu zbrali samo tiste, ki so bile narejene na svežem mesu.

Meritve Schwana in Kaya (1957) [28] se ne ločujejo posebej za longitudinalno in transverzalno smer, ampak je orientacija elektrod naključna glede na orientacijo mišičnih vlaken. Objekt meritev je pasja mišica in sicer v okolici srca, in situ, v nizkofrekvenčnem področju (10Hz-10kHz), z dvoelektrodno tehniko, s popravljenimi rezultati zaradi polarizacije elektrod.



Slika 11: Specifična prevodnost mišice



Slika 12: Relativna dielektričnost mišice



□ Rat Parallel (In vivo) @ 37°C ±1°C (1E1-1E5Hz) Gielen et al, 1984	— krava/konj, longitudinalno, 4el., manj kot 1h, 33 C Burger & Van Dongen, 1960
◇ Canine Parallel @ 36-38°C (1E2-1E6Hz) Epstein & Foster, 1983	--- krava/konj, transverzalno, 4el., manj kot 1 h, 33 C Burger & Van Dongen, 1960
△ Bovine Parallel @ 20°C (1E1-1E5Hz) Bodakian & Hart, 1994	— človek, longitudinalno, 4el., manj kot 1h, 37 C Burger & Van Dongen, 1960
○ Canine (In situ) (1E1-1E4Hz) Schwan 1956,57,63 (in Durney et al, 1986)	--- človek, transverzalno, 4el., manj kot 1h, 37 C Burger & Van Dongen, 1960
× Rat Transverse (In vivo) @ 37°C ±1°C (1E1-1E5Hz) Gielen et al,1984	— zajec, longitudinalno, 4el., manj kot 1h, 37 C Burger & Van Dongen, 1960
✕ Canine Transverse @ 36-38°C (1E2-1E6Hz) Epstein & Foster,1983	--- zajec, transverzalno, 4el., manj kot 1h, 37 C Burger & Van Dongen, 1960
+ Bovine Transverse @ 20°C (1E1-1E5Hz) Bodakian & Hart,1994	— pes, longitudinalno, 4el., anesteziran, telesna temp. Rush, Abildskov, McFee, 1963
■ Frog (In vivo) @ 22°C (2E8-8E9Hz) Schwartz & Mealing, 1985	--- pes, transverzalno, 4el., anesteziran, telesna temp. Rush, Abildskov, McFee, 1963
◆ Canine @ 37°C (1E5-1E8Hz) Stoy et al,1982	● pes, longitudinalno, 2/4el., sveže izrez., telesna temp., Epstein & Foster, 1983
▲ Rat @ 37°C (1E5-1E8Hz) Stoy et al, 1982	■ pes, transverzalno, 2/4el., sveže izrez., telesna temp., Epstein & Foster, 1983
● Rat (In vivo) @ 31°C ±1°C (1E8-1E10Hz) Kraszewski et al, 1982	● zajec, longitudinalno, 4el., in vivo, 37 C Gielen, Wallinga de Jonge, Boon, 1984
⊠ Feline (In vivo) @ 33°C ±1°C (1E8-8E9Hz) Kraszewski et al, 1982	■ zajec, transverzalno, 4el., in vivo, 37 C Gielen, Wallinga de Jonge, Boon, 1984
⊠ Frog (In vivo) (1E3-1E6Hz) Hart & Dunfee, 1993	● govedina, longitudinalno, 2el., sveže meso, 20 C Bodakian & Hart, 1994
⊠ Canine @ 25°C (1E8-1E10Hz) Schwan & Foster, 1977	■ govedina, transverzalno, 2el., sveže meso, 20 C Bodakian & Hart, 1994
× Porcine (In vivo) @ 34-36°C (1E6-1E8Hz) Hahn et al, 1980	● piščanec, longitudinalno, 2el., sveže meso, 20 C Bodakian & Hart, 1994
◇ Feline (In vivo) @ 32.1°C ±2°C (1E4-1E8Hz) Suroweic et al, 1986	■ piščanec, transverzalno, 2el., sveže meso, 20 C Bodakian & Hart, 1994
⋈ Canine @ 20°C ±1°C (1E8-1E10Hz) Xu et al, 1987	▲ pes, random orientacija, 2el., in situ, telesna temp., Schwan & Kay, 1957
⊠ Rat (In vivo) @ 37°C (4E10-9E10Hz) Edrich & Hardee, 1976	
⊠ Human @ 23-25°C (5E7-9E8Hz) Joines et al,1994	
⊠ Human (4E7-1E10Hz) Schwan, 1955	
⊠ Rat @ 30°C (1E8-2E9Hz) Joines et al, 1980	
⊠ Porcine & Bovine @ 37°C (2E7-1E8Hz) Osswald, 1937	
◇ Ovine @ 37°C (1E6-2E10Hz) Gabriel et al, 1994	
▲ Canine (In vivo) @ 34°C (1E8-2E9Hz) Burdette et al, 1980	
● Rat (In vivo) @ 31°C (1E8-2E9Hz) Burdette et al, 1980	
— Ovine @ 37°C (1E1-2E10Hz) Current study measurements	

Slika 13: Legenda mišica

Prva stvar, ki jo opazimo pri potekih specifične upornosti in dielektrične konstante mišice, je anizotropnost in sicer predvsem v nizkofrekvenčnem področju. V tem področju je tudi velika razpršenost meritev specifične prevodnosti. Še najbolj navzdol pa odstopajo meritve Bodakiana in Harta, pri čemer so vrednosti za piščančje meso še nekoliko nižje kot pri govedini.

Burger in Van Dongen [20] ter Rush [21] et al poročajo o praktično konstantnih vrednostih v nizkofrekvenčnem področju (polne in črtkane črte na grafu). Meritve prvih dveh kažejo na manjšo anizotropnost pri kravi, konju in človeku in dosti večjo pri zajcu. Prav tako kažejo meritve Rush et al na veliko anizotropnost pri mišici psa. To potrjujejo tudi meritve Epsteina in Fosterja (pes) [18] in Gielen et al (zajec) [29], vseeno pa v manjši meri.

---

Pri Schwanovih meritvah [28] je orientacija elektrod glede na smer mišičnih vlaken naključna, vrednosti pa se gibljejo nekje med vrednostmi za transversalno orientacijo, v primerjavi z ostalimi, kar potrjuje domnevo večine raziskovalcev, da je za merjenje longitudinalnih vrednosti pomembno ujemanje orientacije elektrod z orientacijo vlaken. S tem razmišljanjem pa se ne sklada poročilo Epsteina in Fosterja, ki pravi da že 5 stopinjska napaka v orientaciji rezultira v 18% višjih rezultatih za transversalno prevodnost in 0.4% nižjih rezultatih za paralelno prevodnost tkiva.

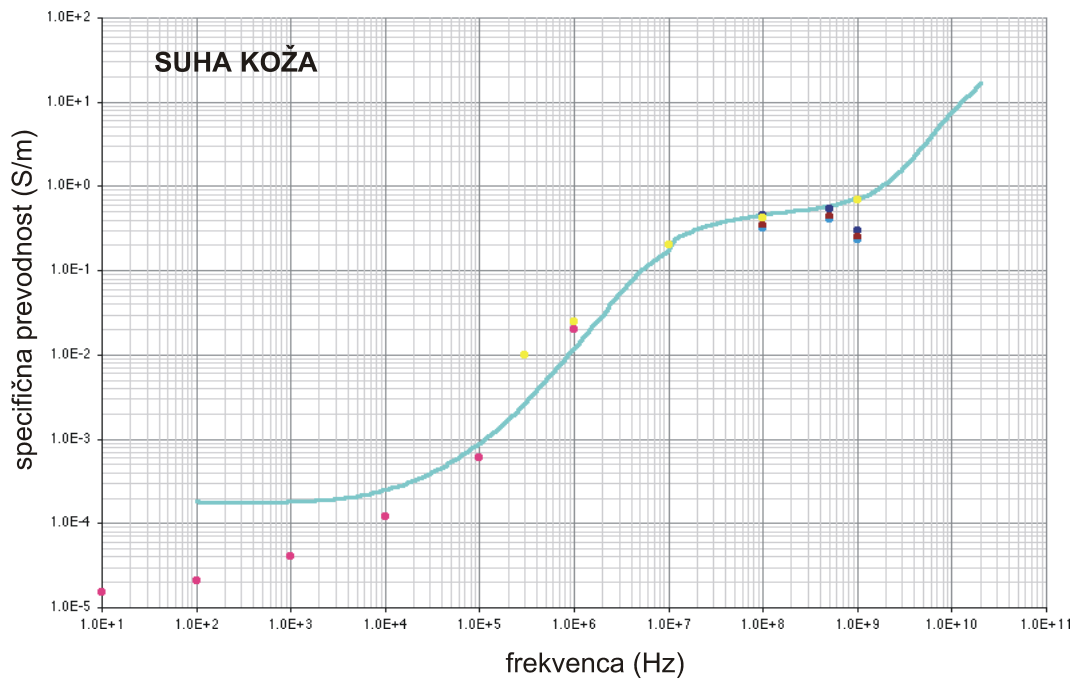
Bodakian in Hart [30] poročata o razliki v izkazovanju anizotropije med komercialno kupljenim in svežim mesom. Sveže meso izkazuje večjo anizotropijo električnih lastnosti in manjšo frekvenčno odvisnost prevodnosti. Ugotovljeno je bilo, da je pri svežem govejem mesu vzdolžna prevodnost približno 2x vrednost prečne. Anizotropija je dosti višja kot pri komercialno kupljeni govedini. Isto so izmerili pri piščančjemu mesu (sveže meso long/trans=2, kupljeno meso long/trans=50%). Opazili so tudi, da v kiloherčnem frekvenčnem področju prevodnost svežega mesa narašča hitro s frekvenco, pri kupljenem mesu pa je v tem področju skoraj konstantna. Kljub na splošno manjši frekvenčni odvisnosti pri nizkih frekvencah pa je vseeno pri mišici opaziti vse tri vrste disperzije.

Za relativno dielektričnost imamo na voljo manj meritev, prav tako pa je lepo vidna anizotropnost. Tudi tu se pri nizkih frekvencah pojavljajo napake, anizotropnost pa je še nekoliko večja.

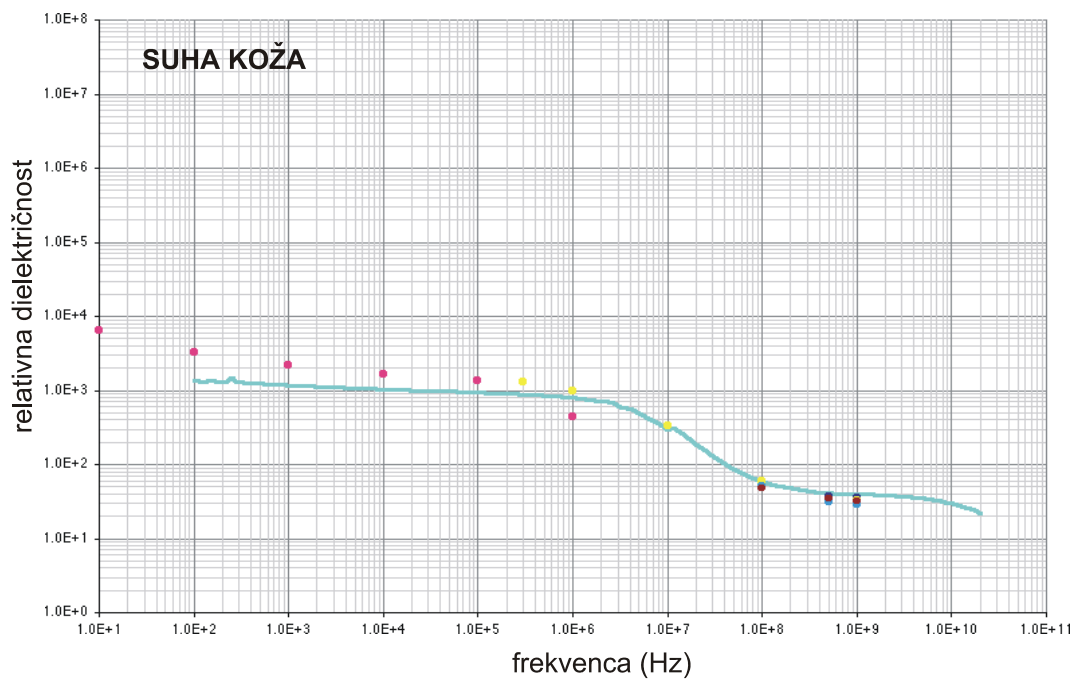
Do sedaj narejene študije sovpadajo v tem da je pri nizkih frekvencah prevodnost v transversalni smeri približno 10-15% prevodnosti v paralelni smeri.

### 3.3.4. KOŽA

Koža je sestavljena iz več plasti. K njenim dielektričnim lastnostim najbolj prispeva zunanja plast, stratum corneum, ki je sestavljen iz keratinskih plasti, njegova debelina pa je približno 40  $\mu\text{m}$ . Globlje plasti kože sestojijo iz bolj prevodnih plasti, epidermisa in dermisa. V nadaljevanju bomo obravnavali vsako plast posebej, najprej pa je tu nekaj meritev Gabriel et al [19] in zbranih podatkov iz literature iste raziskave, kjer najdemo podatke za kožo, pa tudi posebej za stratum corneum. (slika 14 – slika 19)



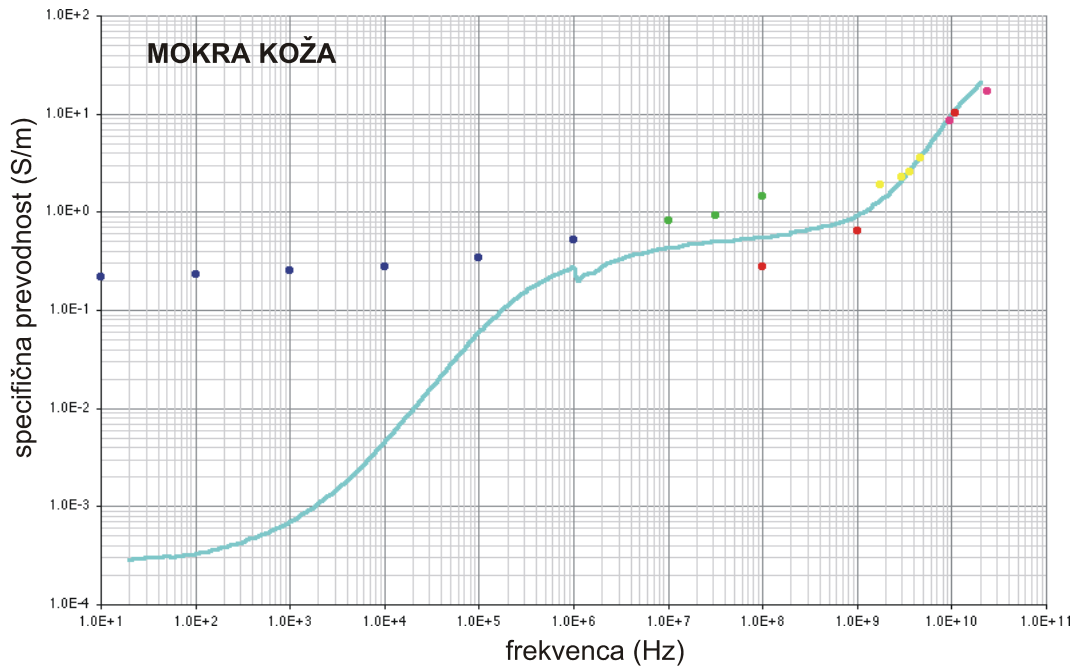
Slika 14: Specifična prevodnost suhe kože



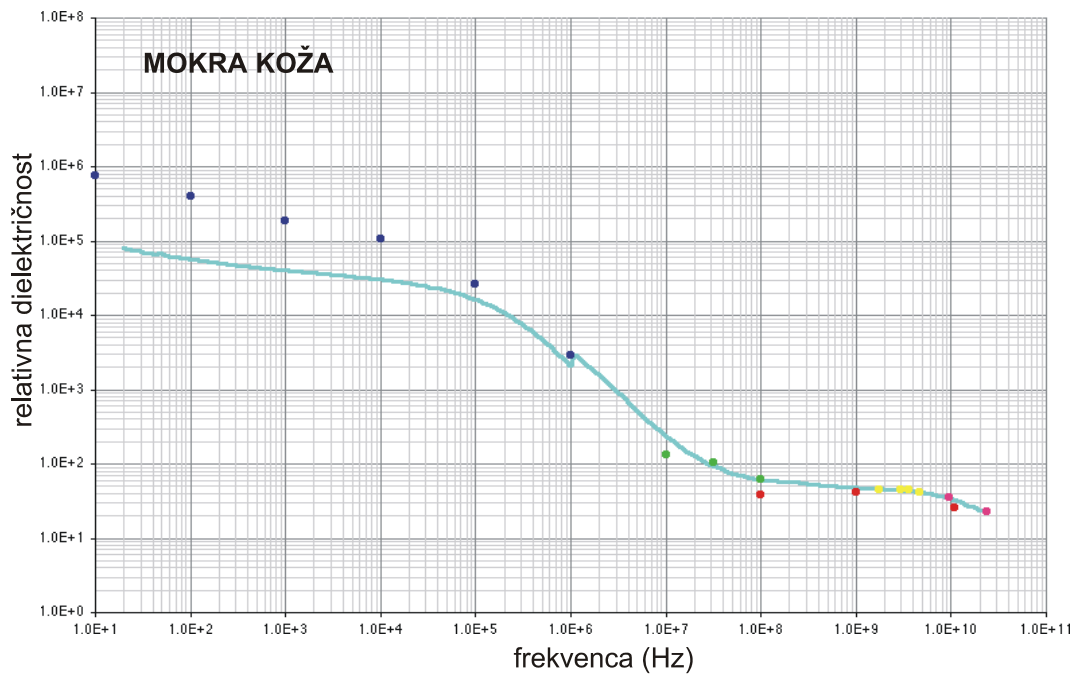
Slika 15: Relativna dielektričnost suhe kože

- Human (In vivo-temple) (1E8-1E9Hz) Grant et al, 1988
- Human (In vivo) (3E5-1E9Hz) Tamura et al, 1994
- Human (stratum corneum) (1E1-1E6Hz) Yamamoto & Yamamoto, 1976
- Human (In vivo-neck) (1E8-1E9Hz) Grant et al, 1988
- Human (In vivo-abdomen) (1E8-1E9Hz) Grant et al, 1988
- Human (In vivo-forearm) 1E1-2E10Hz) Current study measurements

Slika 16: Legenda suha koža



Slika 17: Specifična prevodnost mokre kože



Slika 18: Relativna dielektričnost mokre kože

- Canine @20°C (1E8-1E10Hz) Xu et al, 1987
- Human (excised) @ 20°C (1E7-1E8Hz) Bhattacharjee et al, 1995
- Human (granular associated with wet values) (1E1-1E6Hz) Yamamoto & Yamamoto, 1976
- Human (excised) @ 37°C (2E9-5E9Hz) Cook, 1952
- Human (excised) @ 37°C (9E9-2E10Hz) England, 1950
- Human (In vivo-forearm) (1E1-2E10Hz) Current study measurements

Slika 19: Legenda mokra koža

### 3.3.4.1. STRATUM CORNEUM

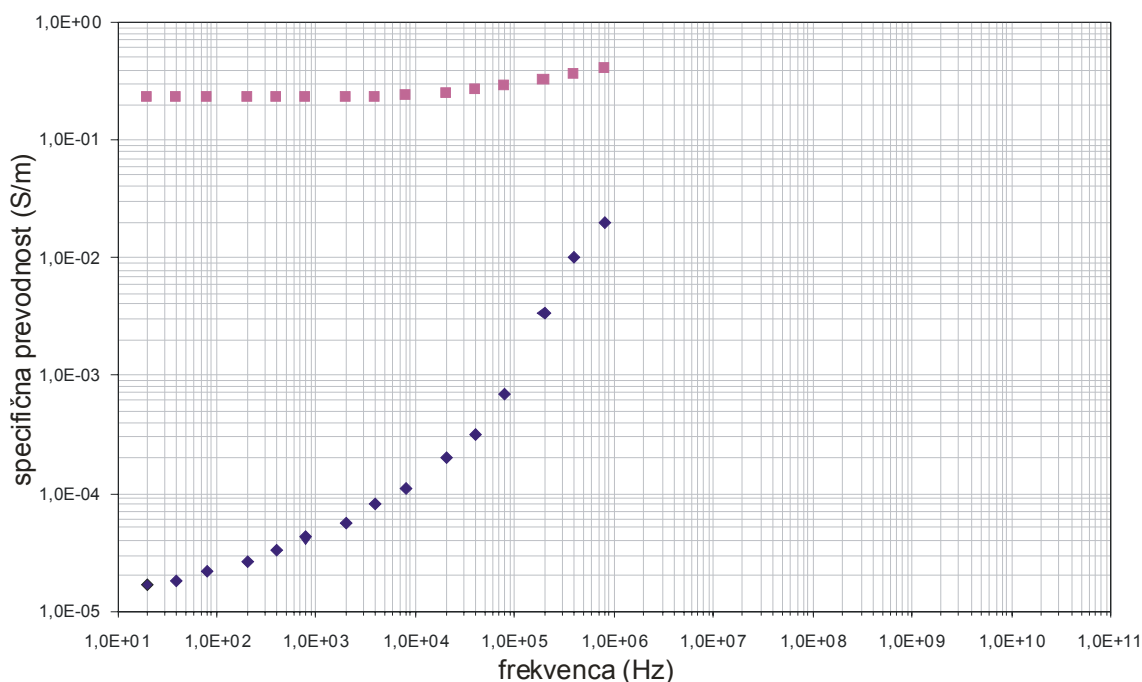
Predvsem pri nizkih frekvencah (pod 10 kHz) k impedanci kože največ doprinese stratum corneum, pa čeprav je ta, najbolj zunanja plast kože, najtanjša. Raziskave kažejo, da je pri 10 kHz delež stratum corneuma v celotni impedanci kože približno 50 %, pri 100 kHz pa samo še 10%. Debelina stratum corneuma je od 10  $\mu\text{m}$  pa vse do 1 mm ali pa več (recimo na peti stopala), povprečno nekje 40  $\mu\text{m}$  [13].

Stratum corneum predstavlja učinkovito pregrado prehajanja snovi skozi kožo. Izvencelični prostor napolnjuje večplastni lipidni dvosloj, večji del stratum corneuma pa je sestavljen iz roževinastih celic. Njihova relativno prepustna celična notranjost običajno ni dovzetna za transport, saj je obdana z relativno neprepustnimi medceličnimi lipidi.

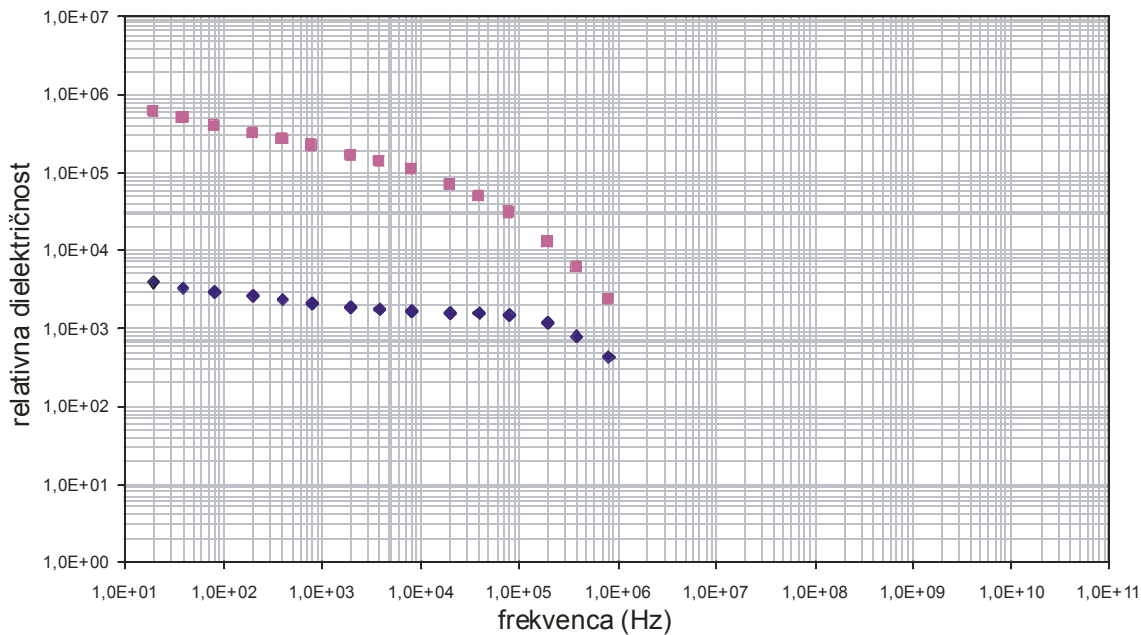
### 3.3.4.2. NIŽJE LEŽEČE PLASTI - EPIDERMIS, DERMIS

Epidermis predstavlja zgornjo, zaščitno plast, dermis pa daje koži čvrstost in elastičnost. Epidermalni sloj je relativno tanek (0.06 – 0.8 mm), debelina dermisa pa je približno 7 krat večja. Pod dermisom se nahaja subcutis, ki globlje prehaja v plast maščobnega tkiva, ki sega do mišičnega tkiva.

Podatke o dielektričnih lastnostih stratum corneuma in nižje ležečih plasti kože smo našli v raziskavi Yamamoto in Yamamoto, 1976 [35],[36]. Meritve so izvajali tako, da so postopoma, s celuloznim lepljivim trakom, odstranjevali plasti stratum corneuma, dokler ga niso popolnoma odstranili. Med odstranjevanjem plasti so v nizkofrekvenčnem področju (pod 10 kHz) opazili zelo hitro naraščanje prevodnosti, kar kaže na to, da k veliki upornosti kože res največ doprinese stratum corneum. Specifično prevodnost in relativno dielektričnost plasti kažeta slika 20 in slika 21.



Slika 20: Specifične prevodnosti plasti kože (stratum corneuma in nižje ležečih plasti)



Slika 21: Relativne dielektričnosti plasti kože (stratum corneuma in nižje ležečih plasti)

- ◆ Stratum corneum
- Nižje ležeče plasti kože (epidermis, dermis)

Slika 22: Legenda plasti kože

Iz zgornjih slik je razvidno, da je pri nizkih frekvencah specifična prevodnost stratum corneuma za velikostni razred  $10^4$  manjša od specifične prevodnosti nižje ležečih plasti kože. Vseeno pa h končnemu prispevku upornosti kože prinese manj kot toliko, saj je plast stratum corneuma dosti tanjša od ostalih plasti. Pri višjih frekvencah pa se ta razlika opazno zmanjšuje (pri 1 MHz je specifična prevodnost stratum corneuma le še približno 20x manjša od spec. prev. nižje ležečih plasti). Zmanjševanje razlike opazimo tudi pri podatkih za relativno dielektričnost.

### 3.3.5. KOST

Prevodnost kosti je zelo nizka. V primerjavi z ostalimi tkivi jo lahko smatramo za izolator. V literaturi ne zasledimo veliko podatkov o dielektričnih lastnostih kosti, nekaj malega smo zasledili samo v članku Geddesa in Bakerja [16] (1967). Od vseh tkiv v človeškem telesu je prevodnost kosti najbolj spremenljiva. To ni presenetljivo, saj je kost po svoji strukturi zelo nehomogena. Na primer lobanja sestoji iz dveh gostih, slabo prevodnih kosov, med katerima je spužvasto tkivo polno krvi, ki je dober prevodnik. Podobno so tudi dolge kosti v resnici slabo prevodni votli valji, napolnjeni z visoko prevodnim, žilnatim kostnim mozgom, ki je vir rdečih krvničk. Zato so podatki o specifični upornosti kosti zgolj informativni in nam predvsem kažejo na težko naravo meritev na kosteh.

Vseeno pa kost lahko obravnavamo kot izolator, vpliv bolj prevodnega kostnega mozga pa zanemarimo, saj ne obstaja nobena prevodna pot do njega [21].

V članku Geddesa in Bakerja [16] zasledimo naslednje podatke o prevodnosti kosti:

Tabela 1: Podatki o prevodnosti kosti

tkivo	spec. prev. (S/m)	frekvenca	temp.	merilna tehnika	referenca
človeško	0,00625	nizka, ECG spekt.	ni podano	?	Lepeschkin, 1951
človeško	0,0555	1 MHz	sveže, med telesno in sobno	2 el.	Hemingway, 1932
krava/prashič	0,0219	audio	37	2	Osswald, 1937
	0,027	25-100 MHz	37	2	
	0,016	audio	20	2	
	0,02	25-100 MHz	20	2	

### 3.3.6. OBMOČJA VREDNOSTI DIELEKTRIČNIH KONSTANT OBRAVNAVANIH TKIV

Na koncu so v preglednici (tabela 2) še enkrat zbrane nizkofrekvenčne vrednosti specifične prevodnosti in relativne dielektričnosti obravnavanih tkiv. Podana so območja vrednosti, ki smo jih našli v literaturi, z izločitvijo najbolj odstopajočih meritev. Te vrednosti smo tudi uporabili v nadaljnjih izračunih.

Enosmernih vrednosti v literaturi skoraj ne zasledimo, zato moramo na njih sklepati iz nizkofrekvenčnih vrednosti (pri 10 ali 100 Hz). Ekstrapolacijo pri tej frekvenci lahko izvedemo, saj nenadna sprememba zaradi  $\alpha$  disperzije nastopi pri višjih frekvencah, pod njo pa so vrednosti skoraj konstantne [28].

Tabela 2: Območja vrednosti specifične prevodnosti in relativne dielektričnosti obravnavanih tkiv

		SPEC. PREVODNOST (S/m)	REL. DIELEKTRIČNOST
TUMOR		0.22 – 0.4	60 000 (pri 1 kHz)
MAŠČOBA		0.02 – 0.04	10 000 000 (pri 10 Hz)
MIŠICA	transverzalno	0.04 – 0.14	1 500 000 – 40 000 000 (pri 10 Hz)
	longitudinalno	0.3 – 0.8	10 000 000 – 66 000 000 (pri 10 Hz)
KOŽA (SUHA)		0.00002 – 0.0002	1400 – 6600 (pri 10 Hz)
KOŽA (MOKRA)		0.0003 – 0.2 (?)	100 000 – 800 000
stratum corneum		0.0000125	10000 (pri 2 Hz)
nižje plasti		0.227	1 200 000 (pri 2 Hz)
KOST		malo podatkov: $\sim 0.006$	ni podatkov

---

Kot je razvidno iz tabele 2, ima tumor eno izmed večjih prevodnosti, večjo kot tkiva v katerih raste. Pri določevanju prevodnosti tumorja se pojavi veliko razlik, v prvi vrsti poznamo več vrst tumorjev, po drugi strani pa je tudi sam tumor zelo nehomogena struktura. Maščoba je zaradi svoje nizke vsebnosti elektrolitov eden izmed najslabših prevodnikov v človeškem telesu, še nižja pa je prevodnost kosti in kože. Za kost zasledimo v literaturi zelo malo podatkov, zaradi njene nehomogene strukture je namreč težko meriti njene dielektrične lastnosti, lahko jo smatramo tudi kot izolator, saj kljub vsebnosti bolj prevodnega kostnega mozga ne obstaja nobena prevodna pot do njega. K nizki prevodnosti kože največ doprinese njena zunanja plast, stratum corneum, nižje plasti kože izražajo prevodnosti, ki so dosti bolj primerljive z ostalimi tkivi.

Mišica je med obravnavanimi tkivi edino tkivo, ki izraža visoko stopnjo anizotropnosti, (prevodnost je višja v longitudinalni smeri), vendar pa se anizotropne lastnosti pri višjih frekvencah (nad 100 kHz) začnejo zmanjševati.

Razlike med živalskimi vrstami obstajajo, vendar jih je iz podatkov zbranih v literaturi težko določiti, saj so bile meritve narejene v različnih okoliščinah in je težko oceniti kateri izmed dejavnikov ima največji vpliv. Med vsemi bi bilo potrebno izpostaviti predvsem čas med smrtjo osebkov in izvedbo meritev, saj se tu zelo hitro pojavijo spremembe, tkivo s časom postaja vedno bolj prevodno. Seveda pa je tu predvsem pomembna tudi izbira merilne tehnike in geometrije merilne celice, ki v meritve vnaša sistematsko napako. Zato meritve različnih raziskovalcev, narejene v zelo različnih okoliščinah, dostikrat težko primerjamo med sabo in zato tudi težko ocenimo, kateri rezultati so bližje pravim vrednostim.



---

## 4. POTEK ELEKTROPORACIJE V MODELU

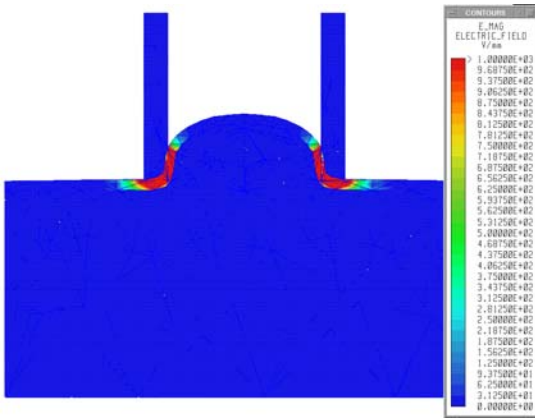
### 4.1. PORAZDELITEV ELEKTRIČNEGA POLJA PRED ELEKTROPORACIJO

Za porazdelitev električnega polja v materialu moramo poznati njegove snovne lastnosti, torej specifično prevodnost in relativno dielektričnost. Vrednosti obeh snovnih konstant za tkiva, ki sestavljajo naš model, smo podali v prejšnjem poglavju, v nadaljevanju pa bomo pri obravnavi matematičnega modela uporabljali le prvo, torej specifično prevodnost, saj je napetost na elektrodah enosmerna, analiza torej poteka v enosmernih razmerah in nam zato pri računanju porazdelitve polja v modelu ni treba upoštevati različnih vrednosti relativne dielektričnosti tkiv.

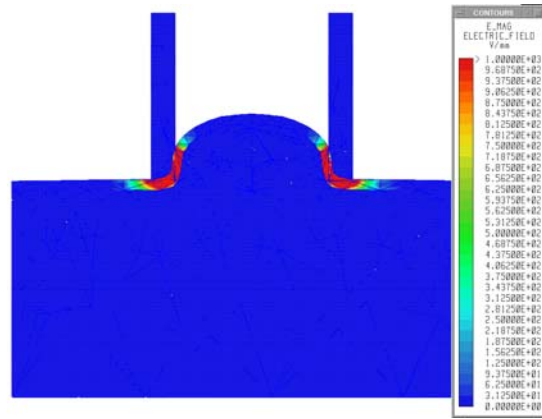
Električno polje se po tkivu porazdeli v skladu z ugotovitvami in izpeljavami, ki smo jih obravnavali v poglavju 3.1. Ko torej na elektrodi pritisnemo napetost, se bo polje porazdelilo po modelu v razmerjih, ki jih narekuje specifična prevodnost tkiv. Polje bo največje v tkivih z najmanjšo vrednostjo specifične prevodnosti, kjer je gradient potenciala največji. V našem primeru se skoraj celoten padec napetosti pojavi na plasti kože, katere specifična prevodnost je kar za 100 do 1000 krat manjša od specifičnih prevodnosti nižje ležečih tkiv.

Na slikah 23 a)-h) vidimo porazdelitve električnega polja, ko na model pritisnemo napetost, torej pred elektroporacijo. Iz prejšnjega poglavja vidimo, da so območja v katerih se gibljejo vrednosti snovnih konstant tkiv, zelo široka, zato smo porazdelitve električnega polja pred elektroporacijo izračunali z različnimi vrednostmi specifičnih prevodnosti posameznih tkiv z roba območij vrednosti, ki jih podajamo na koncu prejšnjega poglavja. Vidimo, da pred elektroporacijo ni opaznih razlik v porazdelitvi polja, saj se celoten padec napetosti pojavi na tkivu z najmanjšo specifično prevodnostjo, torej koži, ki ima približno za faktor 100 do 1000 višjo upornost od ostalih tkiv.

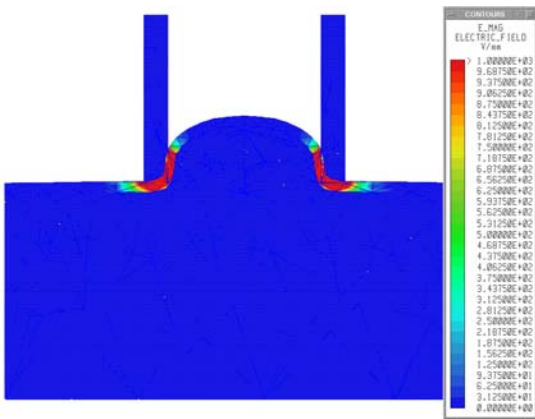
V procesu elektroporacije pa električno polje "prodre" v notranjost modela, saj se pod vplivom visokega električnega polja v koži le-ta elektropermeabilizira, kar se odraža v povečanju specifične prevodnosti kože. V naslednjem koraku, torej ko je koža permeabilizirana, je porazdelitev električnega polja drugačna, tako lahko dovolj visoko polje doseže tudi nižje ležeča tkiva. Predvsem nas pri tem zanima tumor, ki je pravzaprav ciljno tkivo elektrokemoterapije, zato je permeabilizacija tam najbolj pomembna [37]-[42].



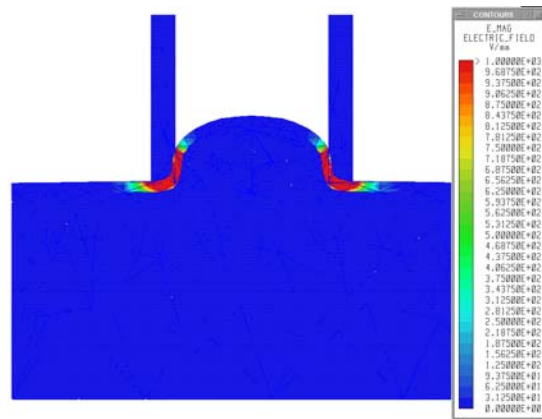
a)



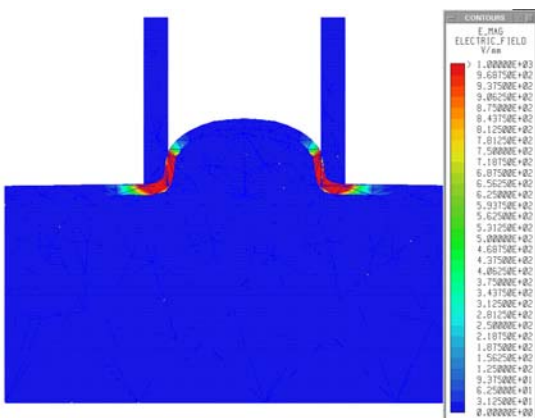
b)



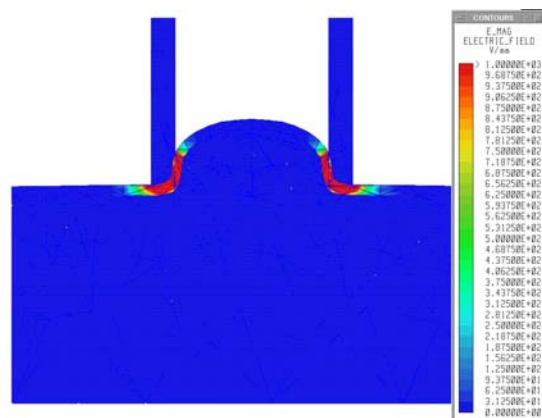
c)



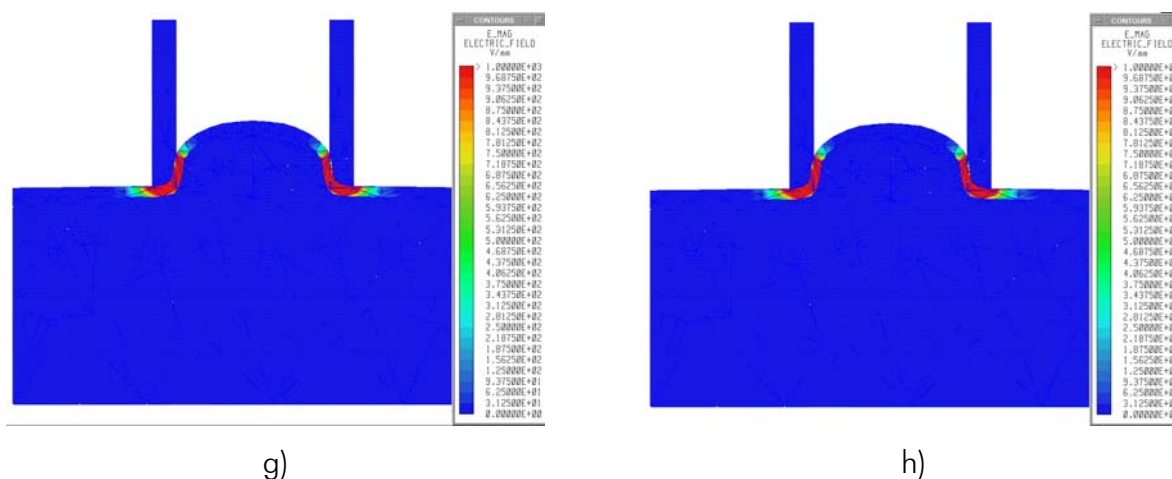
d)



e)



f)



Slika 23: Porazdelitev električnega polja pred elektroporacijo z različnimi vrednostmi začetnih specifičnih prevodnosti a) minimalna vrednost mišica (0,04 S/m prečno, 0,3 S/m vzdolžno) b) maksimalna vrednost mišica (0,14 S/m prečno, 0,8 S/m vzdolžno) c) minimalna vrednost tumor (0,22 S/m) d) maksimalna vrednost tumor (0,4 S/m) e) minimalna vrednost maščevje (0,02 S/m) f) maksimalna vrednost maščevje (0,04 S/m) g) minimalna vrednost koža (0,0002 S/m) h) maksimalna vrednost koža (0,02 S/m)

## 4.2. DOGAJANJE V TKIVU MED ELEKTROPORACIJO

Med analizo dogajanja v tkivu moramo torej spreminjati vrednost specifične prevodnosti posameznih tkiv v skladu s stopnjo permeabiliziranosti tkiva. Takšnega spreminjanja lastnosti tkiv nam program EMAS sicer ne omogoča, zato smo za potrebe sekvenčne simulacije dogajanja v tkivu naredili program [43], ki v vhodni EMAS-ovi datoteki spremeni specifične prevodnosti elementov v katerih je vrednost električne poljske jakosti višja od vnaprej določenega praga. Po predelavi vhodne datoteke nato analizo zaženemo z novimi lastnostmi tkiv, le-ta izračuna električno polje, na podlagi izračuna pa potem spet s programom spremenimo vhodno datoteko. To ponavljamo poljubno dolgo, oziroma dokler se cel proces ne ustavi in električno polje nikjer več ne doseže nadpragovne vrednosti. Proces elektroporacije v modelu je torej zaključen.

Za potrebe sekvenčne analize pa moramo poznati pragovne vrednosti električne napetosti, pri kateri v tkivu pride do permeabilizacije, seveda za vsako tkivo posebej, in pa stopnjo spremembe specifične prevodnosti tkiva po permeabilizaciji. Pri določitvi teh vrednosti smo se opirali na ekperimentalne podatke in tudi na sicer zelo skopo literaturo. Podatke v literaturi smo našli predvsem za kožo [37]-[42].

---

#### 4.2.1. SEKVENČNA ANALIZA V EMAS-U

Za potrebe sekvenčne analize v EMAS-u je potreben ročni postopek priprave modela za analizo. Generirati moramo vhodno datoteko, ki vsebuje vse podatke o modelu in jo lahko uporabimo za izračun brez grafičnega vmesnika, torej s programom, izdelanim posebej za to [43]. V vhodni datoteki programa EMAS se nahaja vsa informacija, potrebna za obdelavo. S tako pripravljeno datoteko lahko analizo poženemo kadarkoli iz ukaznega okna, lahko jo zaženemo celo na drugem računalniku.

Podatki o poteku sekvenčne obdelave so zbrani v datoteki s končnico *spe*, ki je že del skupine spremljajočih datotek programa za sekvenčno obdelavo. Datoteka vsebuje naslednje parametre:

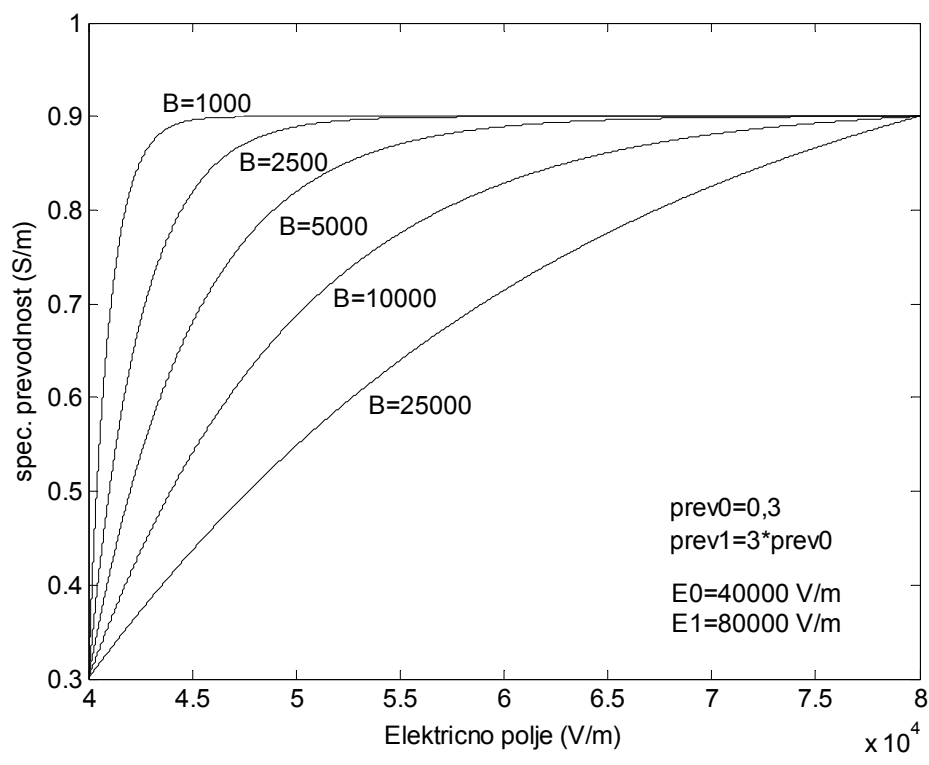
- nov začetni robni pogoj, torej napetost na elektrodah, kar je zelo uporabno pri naših izračunih, saj nas bo zanimal potek toka skozi model pri različnih napetostih na elektrodah, možnost spreminjanja teh začetnih pogojev brez da bi pri tem morali spreminjati model, pa nam prihrani veliko časa.
- seznam vseh materialov, ki nastopajo v modelu, katerim lahko vsakemu posebej določimo več parametrov, ki so pomembni za potek poracije. Ti parametri so:
  - ◊ določitev ali bomo materialu sploh spreminjali specifično prevodnost
  - ◊ tip poracije: imamo več možnosti poracije in sicer: stopničasta, linearna (rampa), dva eksponentna poteka ( $1 - e^x$  in  $e^x - 1$ ), sigmoidna poracija.
  - ◊ faktor za katerega se nad določeno pragovno vrednostjo električnega polja (reverzibilni prag poracije) spremeni specifična prevodnost materiala
  - ◊ prag poracije, ter zgornji, torej ireverzibilni prag poracije pri vseh načinih poracije, razen pri stopničastem.

Pri določitvi tipa poracije lahko spreminjamo tudi strmino funkcije, s katero opisujemo poracijo med reverzibilnim in ireverzibilnim pragom poracije. To seveda velja le za eksponentna in sigmoidni potek. Enačbe teh treh potekov podajajo enačbe 4.1, 4.2 in 4.3. Naklon potekov določamo s konstanto  $B$ , na sliki 24 pa vidimo nekaj potekov za različne vrednosti konstante  $B$ .

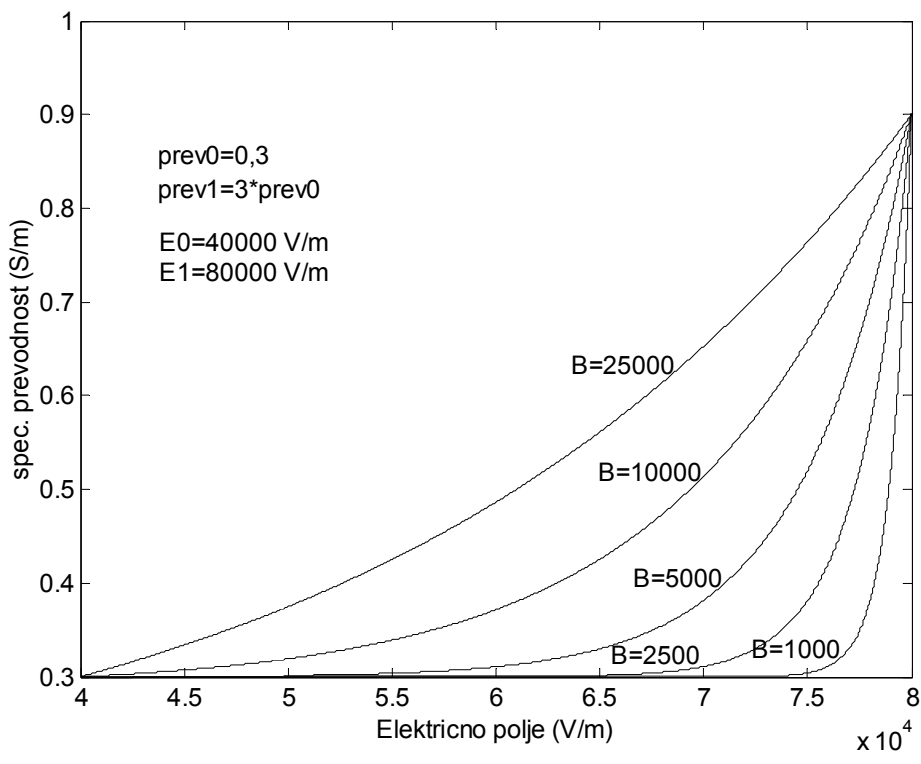
$$f(x) = A(1 - e^{\frac{(x-E_0)}{B}}) + \gamma_0, \quad \text{kjer je} \quad (4.1)$$
$$A = (\gamma_1 - \gamma_0) / (1 - e^{\frac{E_0 - E_1}{B}})$$

$$f(x) = A(e^{\frac{(x-E_1)}{B}} - 1) + \gamma_1, \quad \text{kjer je} \quad (4.2)$$
$$A = (\gamma_0 - \gamma_1) / (e^{\frac{E_0 - E_1}{B}} - 1)$$

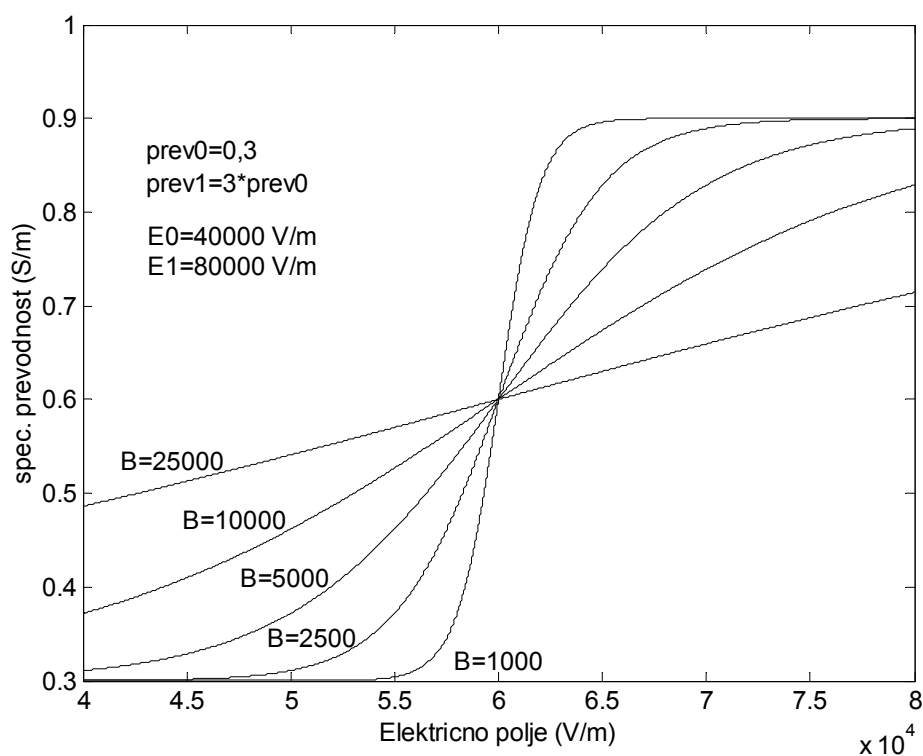
$$f(x) = \gamma_0 + (\gamma_1 - \gamma_0) / (1 + e^{\frac{A-x}{B}}), \quad \text{kjer je} \quad (4.3)$$
$$A = \frac{E_0 + E_1}{2}$$



a)



b)



c)

Slika 24: Vpliv konstante B na poteke poracije med reverzibilnim in ireverzibilnim pragom poracije za: a) eksponentni potek  $1-e^x$ , b) eksponentni potek  $e^x-1$ , c) sigmoidni potek

### 4.3. DOLOČITEV PRAGOVNIH VREDNOSTI ELEKTRIČNEGA POLJA IN SPREMENB PREVODNOSTI

Opravljena je bila obširna študija odgovora različnih živalskih tkiv na visokonapetostne pulze [44]. Visokonapetostni pulzi so bili tkivu dovedeni neposredno ali pa posredno (preko kože). Uporabljene so bile ploščate elektrode na jetrih podgane, mišici podgane in tumorju miši, ter igelne elektrode na jetrih in mišici zajca. Posebej so bile opravljene tudi meritve s ploščatimi elektrodami na sami koži podgane. V vseh eksperimentih je bil za elektroporacijo tkiva uporabljen vlak osmih pulzov z enosekundno pavzo med njimi. Po dovedenih pulzih je bila izmerjena sprememba impedance tkiva, s katero zasledujemo proces elektroporacije.

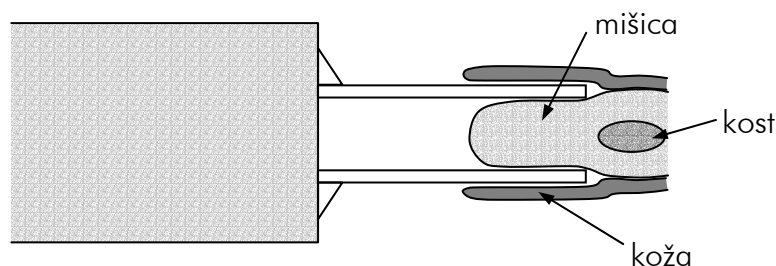
Zanimajo nas pragovne vrednosti električnega polja in spremembe specifične prevodnosti kože, maščobe, tumorja in mišice. V omenjeni raziskavi najdemo vsa omenjena tkiva razen maščobe. V EMAS-u smo zgradili modele mišice, kožne gube in tumorja s katerimi poizkušamo čimbolj verno predstaviti geometrijo realnega objekta meritev. Vzeli smo meritve, ki so bile narejene s ploščatimi elektrodami in 100  $\mu$ s pulzi, saj so bile le-te najbolj reprezentativne.

---

## 4.3.1. MIŠICA

### 4.3.1.1. MERITVE NA PODGANAH

Postavitev elektrod pri elektroporaciji mišice vidimo na sliki 25. Elektrode so bile postavljene neposredno na mišico, torej pod kožo, razmak med elektrodama je bil 5,7 mm.

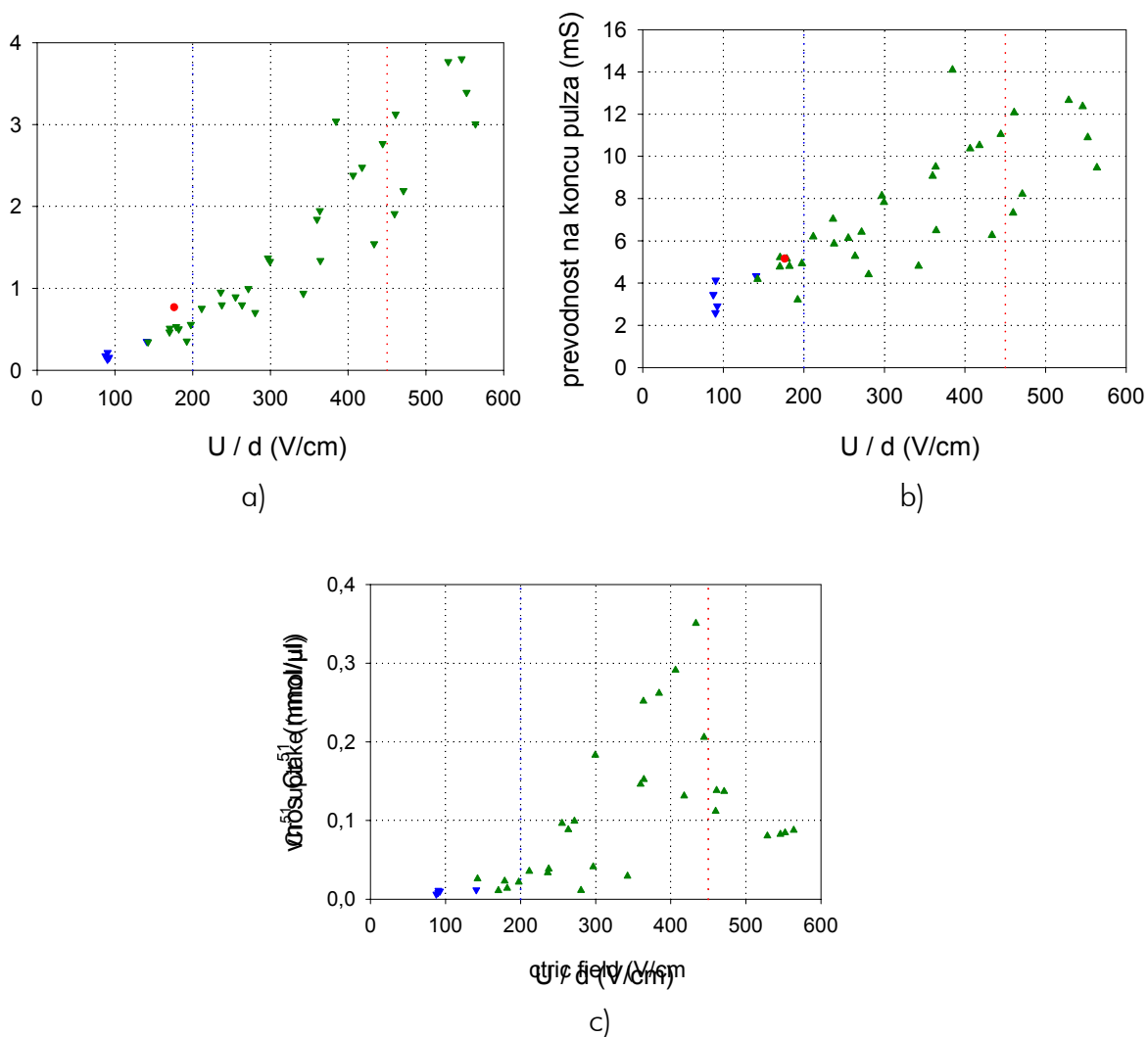


Slika 25: Postavitev elektrod pri elektroporaciji mišice

Za določitev pragovnih vrednosti električnega polja in sprememb specifičnih upornosti nas zanimajo predvsem:

- potek toka v odvisnosti od napetosti na elektrodah; opazujemo tok na koncu pulza. Iz poteka lahko določimo reverzibilni in ireverzibilni prag poracije, saj se pri meji reverzibilne poracije poveča prevodnost objekta, skozenj steče večji tok, kar se odraža v spremembi naklona poteka odvisnosti;
- upornost objekta v odvisnosti od napetosti na elektrodah, ki ga opazujemo na koncu pulza; iz poteka lahko določimo pragove ireverzibilne in reverzibilne poracije (to je tam, kjer opazimo spremembo upornosti) in pa približno stopnjo spremembe upornosti;
- vnos  $\text{Cr}^{51}$  EDTA v odvisnosti od napetosti na elektrodah; tudi tu sta reverzibilni in ireverzibilni prag lepo vidna in sicer takrat, ko vnos naraste oziroma se zmanjša.

Vse tri poteke vidimo na sliki 26 in sicer v odvisnosti od napetosti na elektrodah, normirane z razdaljo med njima. V primeru homogenega električnega polja bi to pomenilo kar jakost homogenega električnega polja med elektrodama. V resnici polje na robu elektrod ni homogeno, poleg tega se zaradi kemičnih reakcij, ki potečejo na stiku tkivo-elektroda, tam pojavi še dodaten padec napetosti. Vseeno pa je polje v večjem delu prostora med elektrodama, kjer je merjenec, homogeno in skoraj enako razmerju med napetostjo in razdaljo med elektrodama. Zato je napaka, ki jo naredimo, če to polje uporabimo za približno določitev pragov elektroporacije v tkivu, zadosti majhna. Na vseh slikah sta vrisana reverzibilni (modra črtkana črta) in ireverzibilni (rdeča črtkana črta) prag poracije.



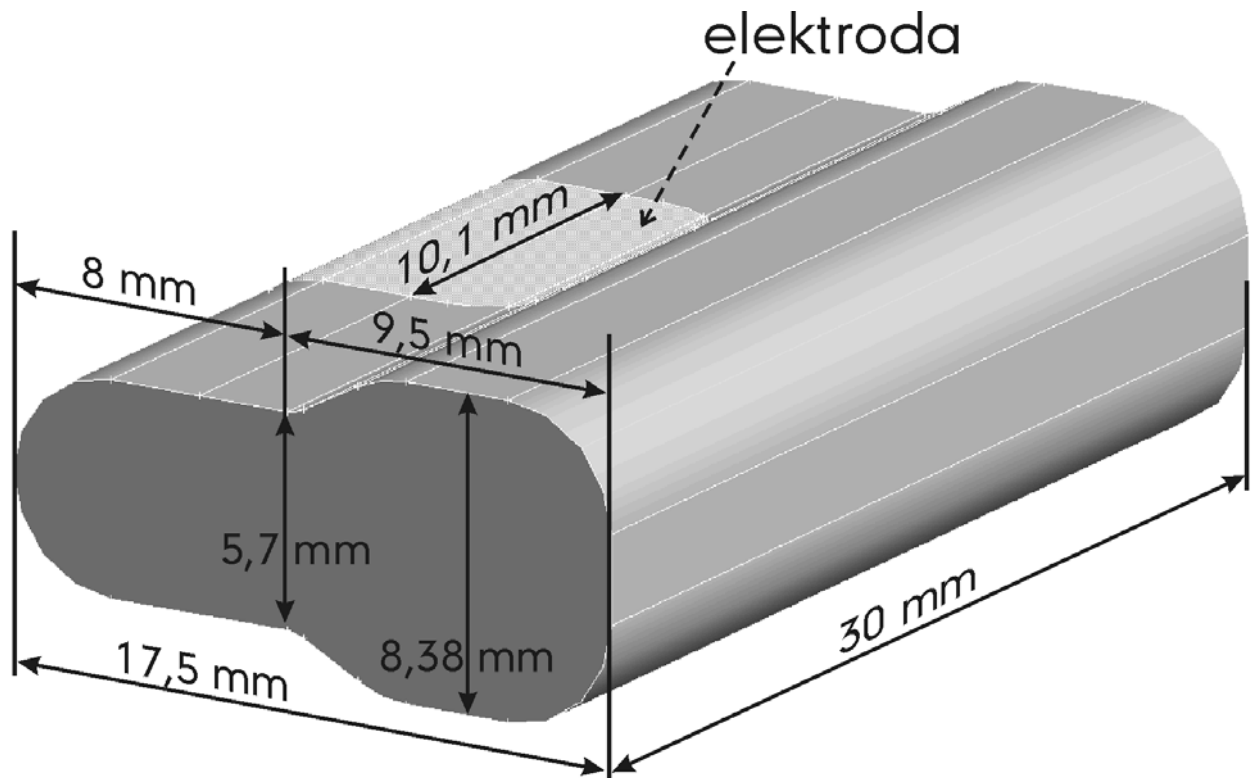
Slika 26: Poteki a) toka, b) upornosti objekta in c) vnosa  $Cr^{51}$  v odvisnosti od teoretičnega električnega polja med elektrodama ( $U/d$ ) pri mišici

Iz potekov je razvidno, da se prag reverzibilne poracije tkiva nahaja nekje pri jakosti teoretičnega električnega polja 200 V/cm, prag ireverzibilne poracije pa pri približno 450 V/cm.

#### 4.3.1.2. MODEL V EMAS-u

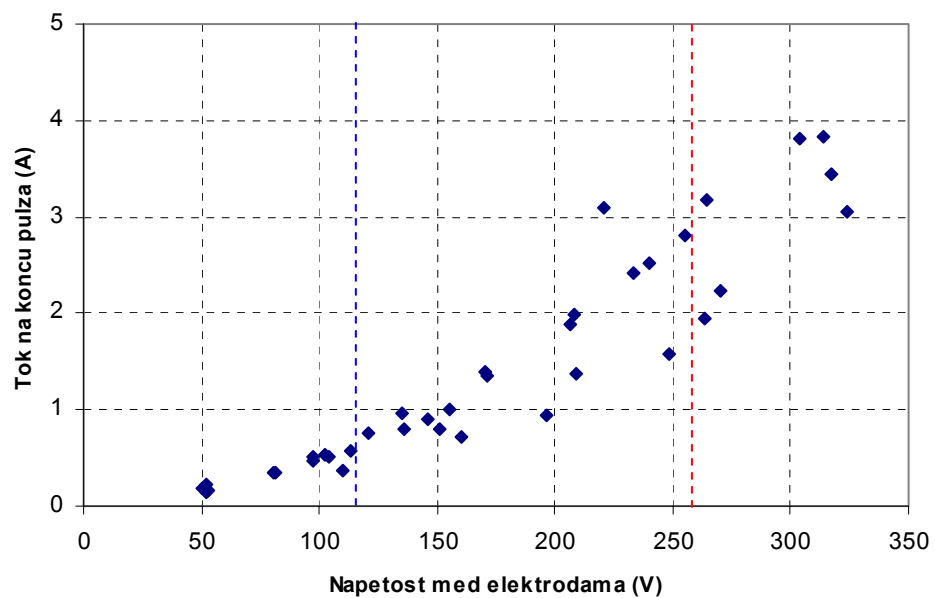
V EMAS-u smo zgradili model elektroporacije mišice brez kože, ki ga vidimo na sliki 27. Elektrod fizično nismo modelirali, saj to poenostavi izračun (zaradi manjšega števila elementov je izračun hitrejši), ne vpliva pa na rezultat. Pritisnjeno napetost smo modelirali kot robni pogoj. Prav tako nismo modelirali kosti, saj zaradi svoje oddaljenosti od vzbujanja in neprevodne narave prav tako ne prispeva bistveno k natančnosti rezultatov.





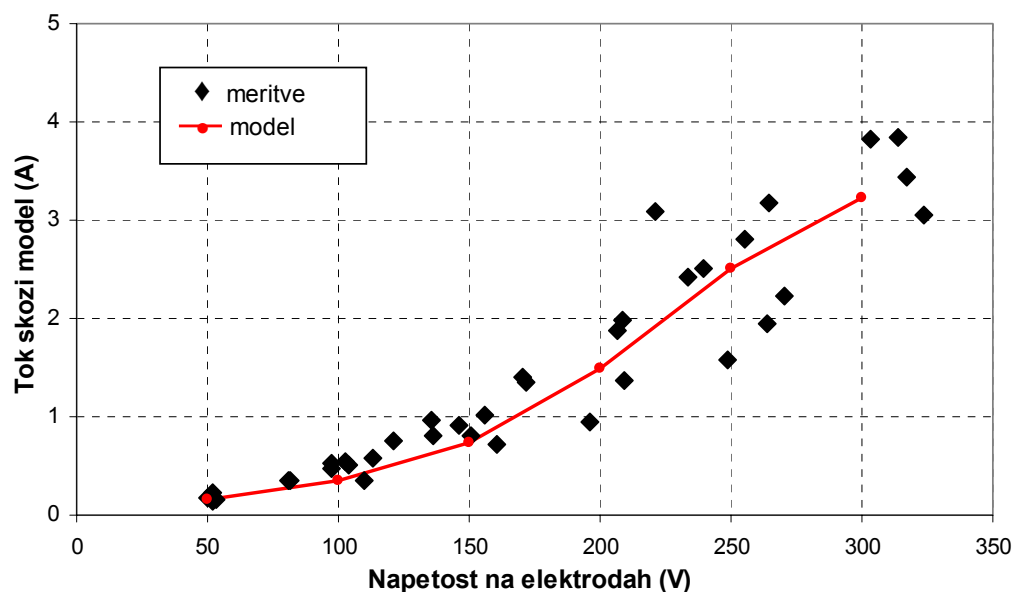
Slika 27: Geometrija modela elektroporacije mišice brez kože

Ker model vzbujamo z napetostjo med ploščatima elektrodama, nas bolj kot odvisnost toka od teoretičnega električnega polja, torej razmerja  $U/d$ , zanima odvisnost od napetosti med elektrodama, zato to odvisnost še enkrat podajamo na sliki 28, kjer sta z modro in rdečo črto označena pragova reverzibilne in ireverzibilne elektroporacije (114 V in 257 V).



Slika 28: Potek toka v odvisnosti od napetosti med elektrodama pri mišici

Sekvenčna obdelava v EMAS-u nam omogoča računanje reakcijskega toka skozi model. Dobljene toke lahko potem neposredno primerjamo z rezultati meritev in prilagajamo parametre poracije pri sekvenčni obdelavi toliko časa, da se oba poteka čimbolj ujemata. Za začetne vrednosti prevodnosti mišice smo po pregledu podatkov iz tretjega poglavja vzeli vrednosti 0,09 in 0,6 S/m za prevodnosti v prečni in vzdolžni smeri. Seveda pa so te vrednosti samo orientacijske in jih bomo po primerjavi rezultatov iz modela in eksperimentalnih podatkov prilagajali, dokler skupaj z drugimi parametri poracije ne dosežemo kar najboljšega ujemanja. Na sliki 29 vidimo končni rezultat modeliranja poteka elektroporacije v mišici.

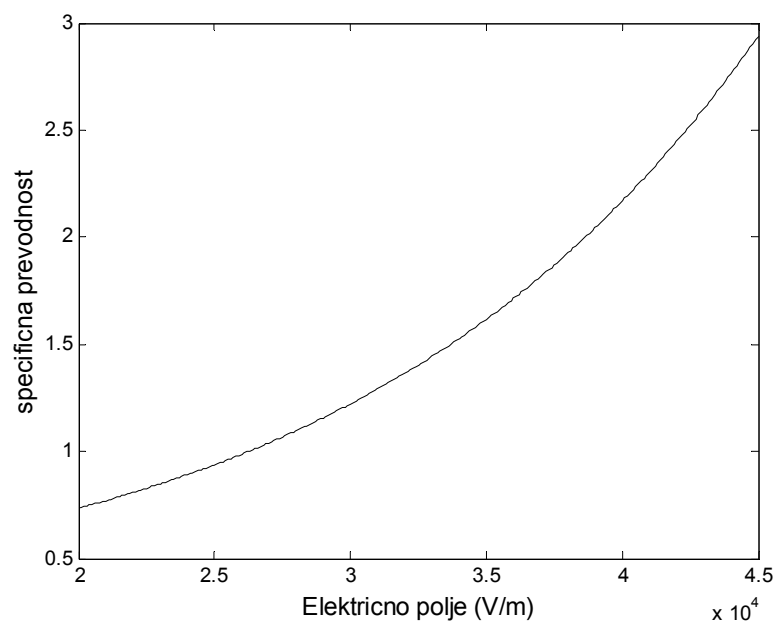


Slika 29: Primerjava poteka odvisnosti reakcijskega toka od napetosti na elektrodah med eksperimentalnimi podatki in matematičnim modelom v EMAS-u – mišica.

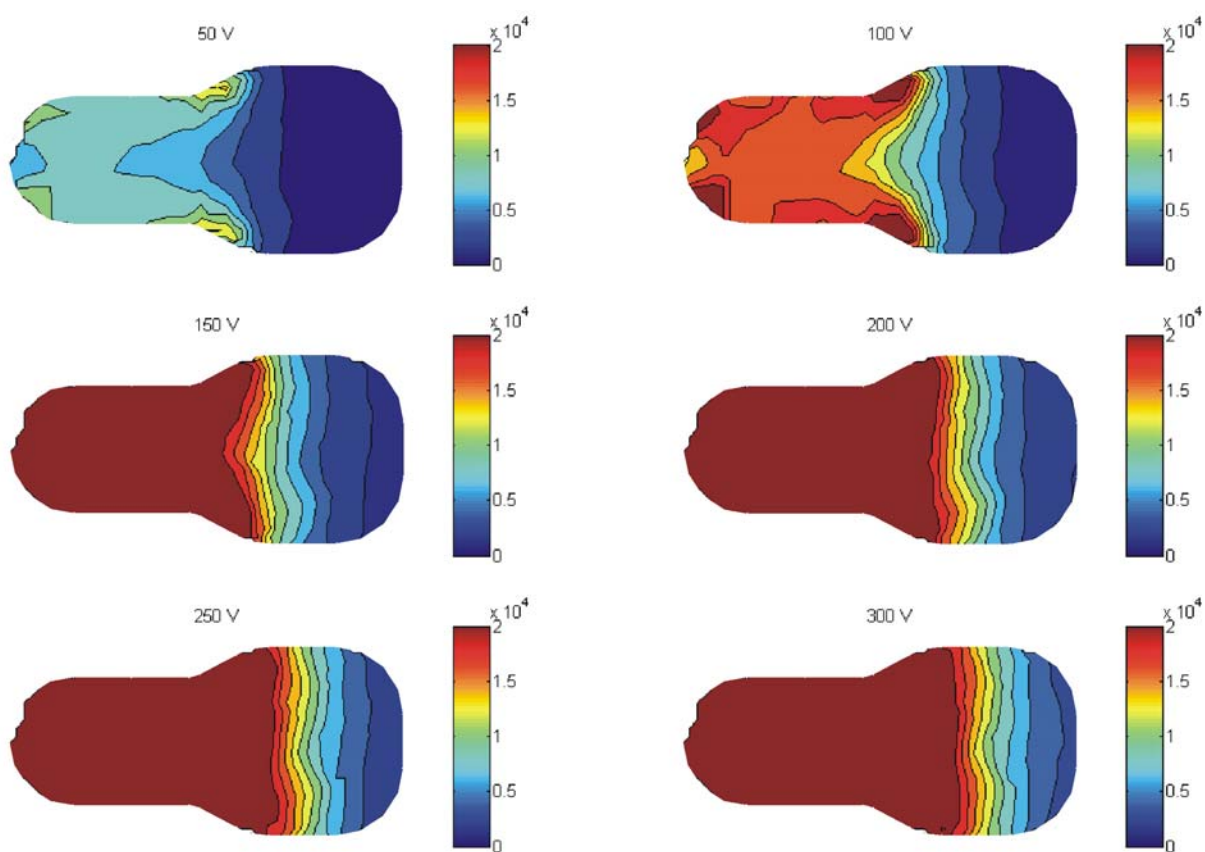
Prileganje modela na eksperimentalne podatke, ki ga vidimo na sliki 29, smo dosegli pri naslednjih vrednostih parametrov:

- Tip poracije:  $\Rightarrow$  funkcija  $e^x - 1$
- Sprememba prevodnosti:  $\Rightarrow$  4 kratno povečanje
- Pragovi poracije:  $\Rightarrow$  reverzibilni: 200 V/cm  
ireverzibilni: 450 V/cm
- Naklon poteka med pragovi:  $\Rightarrow$   $B = 15.000$
- Začetne specifične prevodnosti:  $\Rightarrow$  0,735 S/m vzdolžno; 0,11 S/m prečno

Na sliki 30 vidimo funkcijo poteka poracije, s katero smo dosegli zgornje rezultate, slika 31 pa prikazuje porazdelitve električnega polja v mišici na koncu pulza, torej ko je proces elektroporacije stekel do konca, za različne napetosti na elektrodah. S temno rdečo barvo so označena področja, ki so nad reverzibilnim pragom poracije. Vidimo da se ta območja začnejo pojavljati pri vzbujalni napetosti 100 V, od 150 V naprej pa je celoten del mišice med elektrodama nad reverzibilnim pragom poracije.



Slika 30: Uporabljena funkcija poteka elektroporacije za mišico



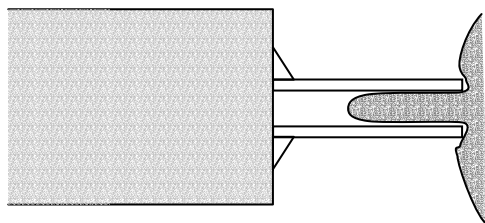
Slika 31: Porazdelitev električnega polja po koncu elektroporacije v mišici za različne napetosti

---

## 4.3.2. KOŽNA GUBA

### 4.3.2.1. MERITVE NA PODGANAH

Postavitev elektrod pri elektroporaciji kožne gube vidimo na sliki 32, razmak med elektrodama je bil 2,8 mm.



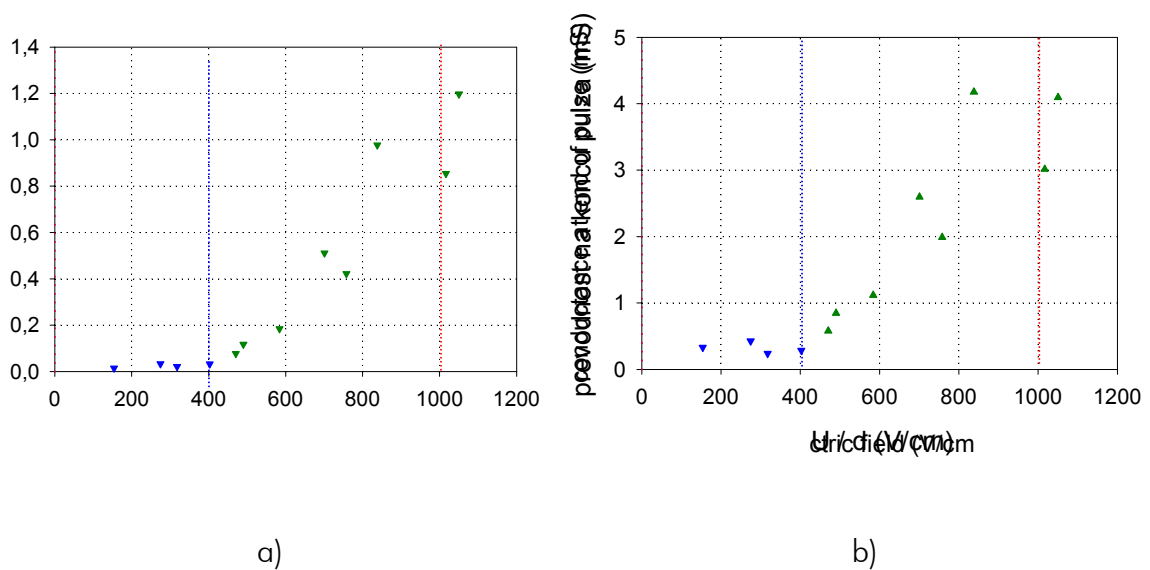
Slika 32: Postavitev elektrod pri elektroporaciji kožne gube

Za določitev pragovnih vrednosti električnega polja in sprememb specifičnih upornosti nas zanimajo isti poteki kot pri mišici, le da tu nimamo podatkov o vnosu  $Cr^{51}$  v odvisnosti od napetosti na elektrodah. Na razpolago sta nam le poteka:

- toka v odvisnosti od napetosti na elektrodah; opazujemo tok na koncu pulza; iz poteka lahko določimo reverzibilni in ireverzibilni prag poracije, saj se pri meji reverzibilne poracije poveča prevodnost objekta, skozenj steče večji tok, kar se odraža v spremembi naklona poteka odvisnosti;
- upornosti objekta v odvisnosti od napetosti na elektrodah, ki ga opazujemo na koncu pulza; iz poteka lahko določimo pragove ireverzibilne in reverzibilne poracije (to je tam, kjer opazimo spremembo upornosti) in pa približno stopnjo spremembe upornosti.

Oba poteka vidimo na sliki 33 in sicer v odvisnosti od napetosti na elektrodah, normirane z razdaljo med njima. V primeru homogenega električnega polja bi to spet pomenilo kar jakost homogenega električnega polja med elektrodama. V resnici polje na robu elektrod ni homogeno, poleg tega se zaradi kemičnih reakcij, ki potečejo na stiku tkivo-elektroda, tam pojavi še dodaten padec napetosti. Vseeno pa je polje v večjem delu prostora med elektrodama kjer je merjenec, homogeno in skoraj enako razmerju med napetostjo in razdaljo med elektrodama. Zato je napaka, ki jo naredimo, če to polje uporabimo za približno določitev pragov elektroporacije v tkivu, zadosti majhna. Na vseh slikah sta vrisana reverzibilni (modra črtkana črta) in ireverzibilni (rdeča črtkana črta) prag poracije.

Iz potekov je razvidno, da se prag reverzibilne poracije pojavi v tkivu nekje pri jakosti teoretičnega električnega polja 400 V/cm, prag ireverzibilne poracije pa pri približno 1000 V/cm.



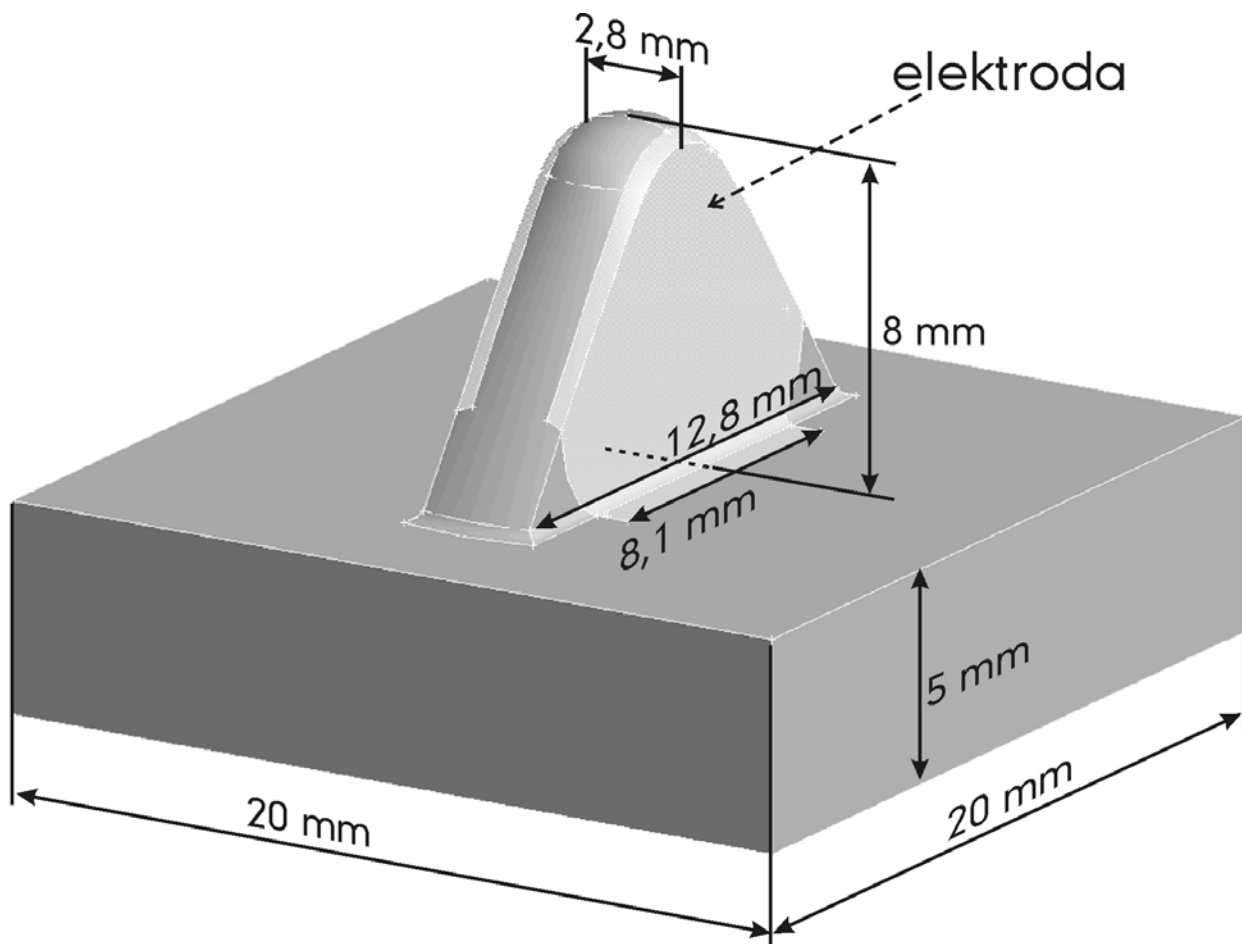
Slika 33: Poteki a) toka in b) upornosti objekta v odvisnosti od teoretičnega električnega polja med elektrodama ( $U/d$ ) pri kožni gubi

#### 4.3.2.2. MODEL V EMAS-U

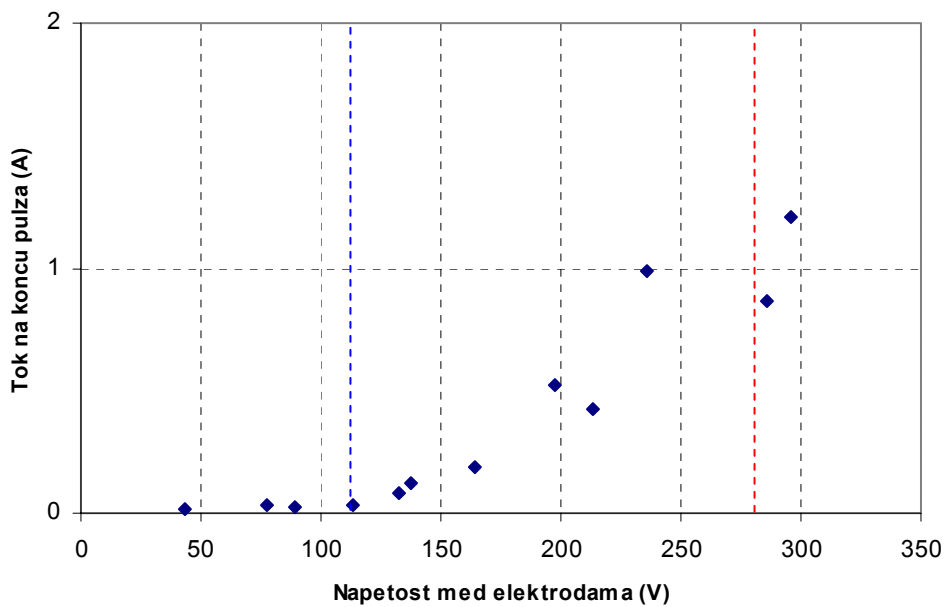
V EMAS-u smo zgradili model elektroporacije kožne gube, ki ga vidimo na sliki 34. Tudi tu elektrod fizično nismo modelirali, zaradi poenostavitve modela in manjšega časa potrebnega za izračun polja zaradi manjšega števila elementov. Pritisnjeno napetost smo modelirali kot robni pogoj. Kožo smo modelirali kot homogeno strukturo in je nismo razdelili na plasti kože, ki smo jih opisali v tretjem poglavju. Zaradi velikih razlik v debelinah posameznih plasti bi namreč model postal preveč kompliciran in lahko bi se pojavljali numerični problemi, ob katerih bi bil izračun celo nemogoč. Zato vzamemo kožo kot homogeno strukturo z neko povprečno specifično prevodnostjo.

Robni pogoj, torej napetost, ki jo pritisnemo na model, smo določili na področju, ki je na sliki 34 označen s svetlejšo sivo barvo. S tem, ko robni pogoj določimo na malce širšem območju, kot je le stik elektrode s kožo, simuliramo vpliv prevodnega gela med elektrodami in merjencem, zaradi katerega se področje stika poveča.

Ker model tudi tu vzbujamo z napetostjo med ploščatima elektrodama, nas spet bolj kot odvisnost toka od teoretičnega električnega polja, torej razmerja  $U/d$ , zanima odvisnost od napetosti med elektrodama, zato to odvisnost še enkrat podajamo na sliki 35, kjer sta z modro in rdečo črto označena pragova reverzibilne in ireverzibilne elektroporacije (112 V in 280 V).

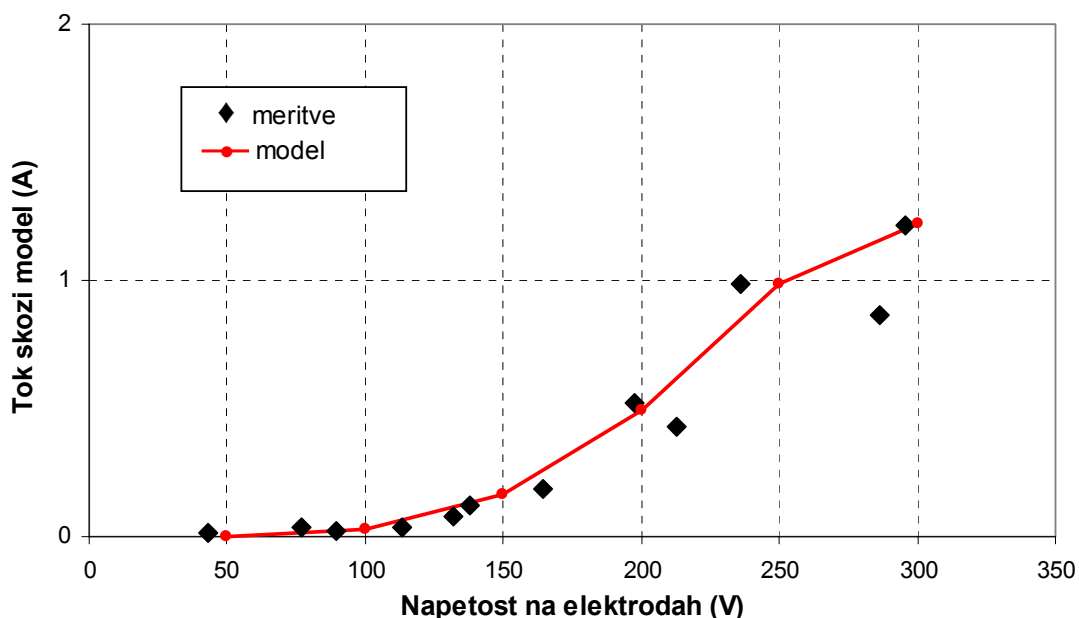


Slika 34: Geometrija modela elektroporacije kožne gube



Slika 35: Potek toka v odvisnosti od napetosti med elektrodama pri kožni gubi

Kot pri mišici smo tudi pri kožni gubi s sekvenčno obdelavo izračunali reakcijski tok skozi model in dobljene toke potem primerjali z rezultati meritev. Parametre poracije pri sekvenčni obdelavi smo prilagajali toliko časa, da sta se oba poteka čimbolj ujemala. Za začetno vrednost prevodnosti kože smo po pregledu podatkov iz tretjega poglavja vzeli vrednost 0,0002 S/m, končna uporabljena vrednost pa je podana v nadaljevanju. Na sliki 36 vidimo končni rezultat modeliranja poteka elektroporacije v kožni gubi.

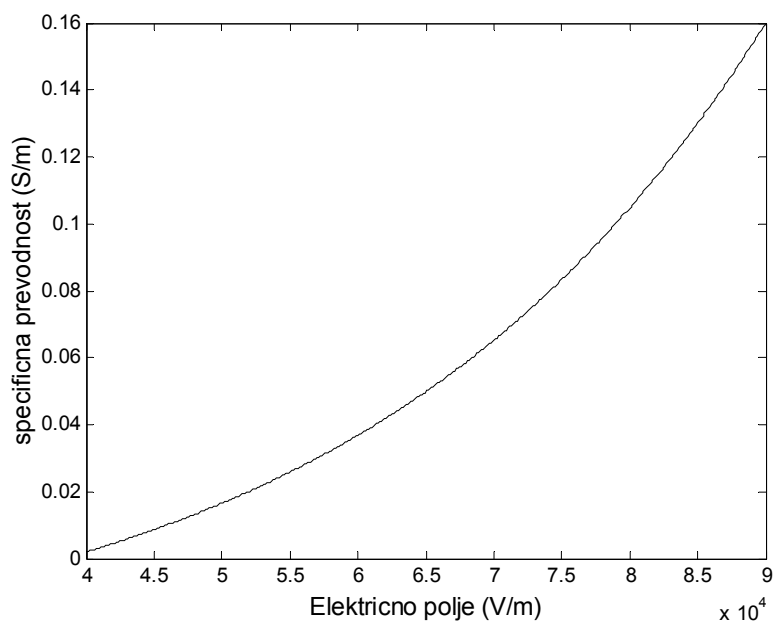


Slika 36: Primerjava poteka odvisnosti reakcijskega toka od napetosti na elektrodah med eksperimentalnimi podatki in matematičnim modelom v EMAS-u – kožna guba.

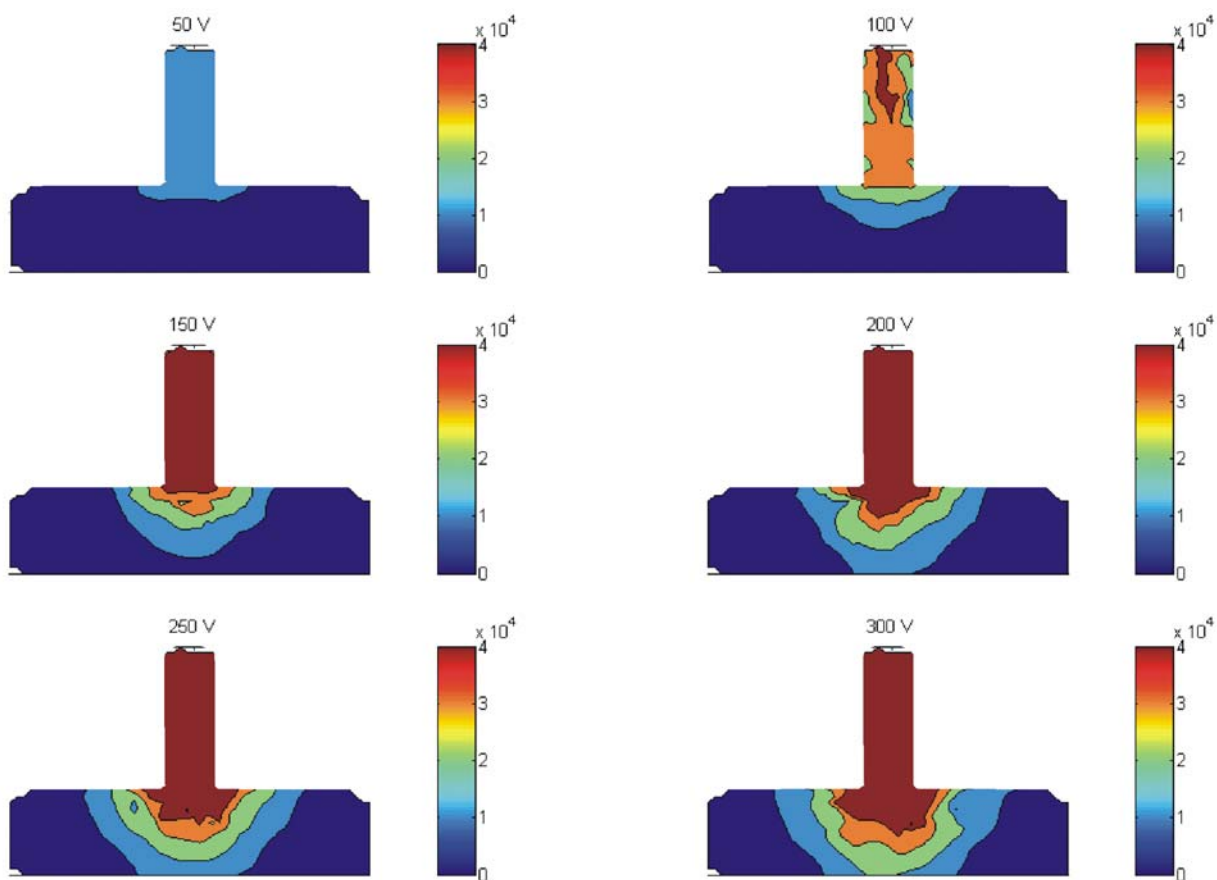
Prileganje modela na eksperimentalne podatke, ki ga vidimo na sliki 36, smo dosegli pri naslednjih vrednostih parametrov:

- Tip poracije:  $\Rightarrow$  funkcija  $e^x - 1$
- Sprememba prevodnosti:  $\Rightarrow$  80 kratno povečanje
- Pragovi poracije:  $\Rightarrow$  reverzibilni: 400 V/cm  
ireverzibilni: 900 V/cm
- Naklon poteka med pragovi:  $\Rightarrow$   $B=30.000$
- Začetna specifična prevodnost:  $\Rightarrow$  0,002 S/m

Na sliki 37 vidimo funkcijo poteka poracije, s katero smo dosegli zgornje rezultate, slika 38 pa prikazuje porazdelitve električnega polja v kožni gubi na koncu pulza, torej ko je proces elektroporacije stekel do konca, za različne napetosti na elektrodah. S temno rdečo barvo so označena področja, ki so nad reverzibilnim pragom poracije. Vidimo da se ta območja začnejo pojavljati pri vzbujačni napetosti 100 V, od 150 V naprej pa je celotna kožna guba nad reverzibilnim pragom poracije.



Slika 37: Uporabljena funkcija poteka elektroporacije za kožni gubo



Slika 38: Porazdelitev električnega polja po koncu elektroporacije v kožni gubi za različne napetosti.

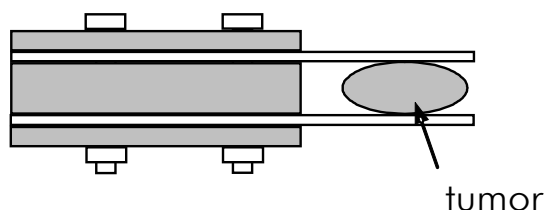


---

### 4.3.3. TUMOR

#### 4.3.3.1. MERITVE NA MIŠIH

Postavitev elektrod pri elektroporaciji tumorja brez kože vidimo na sliki 39, razmak med elektrodama je bil 5,2 mm.



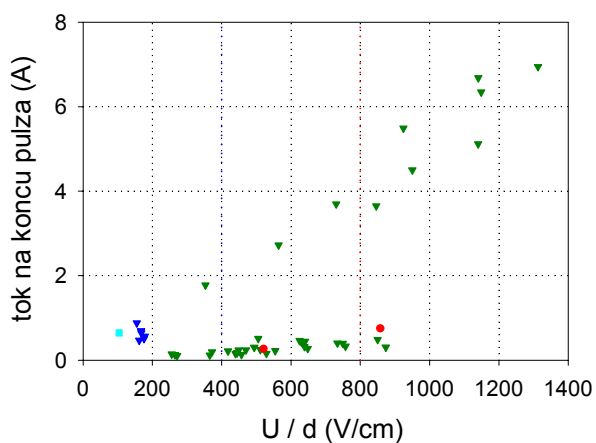
Slika 39: Postavitev elektrod pri elektroporaciji tumorja

Za določitev pragovnih vrednosti električnega polja in sprememb specifičnih upornosti nas zanimajo isti poteki kot pri mišici in kožni gubi. Na voljo so nam iste meritve kot pri mišici, in sicer za dve različni vrsti tumorjev: mišji melanom B16 in mišji LPB sarkom. Opazujemo torej poteke:

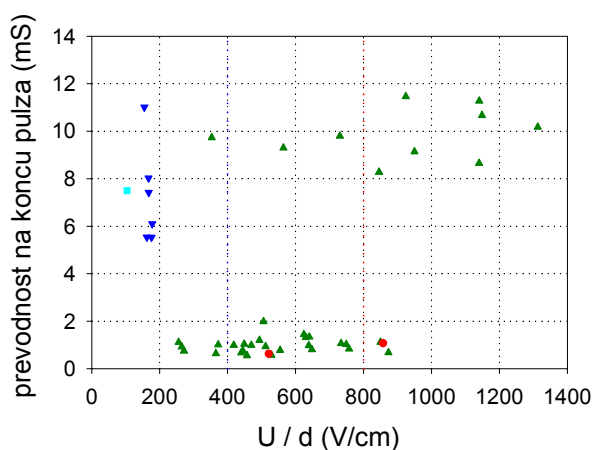
- toka v odvisnosti od napetosti na elektrodah; opazujemo tok na koncu pulza; iz poteka lahko določimo reverzibilni in ireverzibilni prag poracije, saj se pri meji reverzibilne poracije poveča prevodnost objekta, skozenj steče večji tok, kar se odraža v spremembi naklona poteka odvisnosti;
- upornosti objekta v odvisnosti od napetosti na elektrodah, ki ga opazujemo na koncu pulza; iz poteka lahko določimo pragove ireverzibilne in reverzibilne poracije (to je tam, kjer opazimo spremembo upornosti) in pa približno stopnjo spremembe upornosti;
- vnos  $\text{Cr}^{51}$  EDTA v odvisnosti od napetosti na elektrodah; tudi tu sta reverzibilni in ireverzibilni prag lepo vidna in sicer takrat, ko vnos naraste oziroma se zmanjša.

Vse poteke vidimo na sliki 40 in sicer v odvisnosti od napetosti na elektrodah, normirane z razdaljo med njima. V primeru homogenega električnega polja bi tudi pri tumorju to pomenilo kar jakost homogenega električnega polja med elektrodama. V resnici polje na robu elektrod ni homogeno, poleg tega se zaradi kemičnih reakcij, ki potečejo na stiku tkivo-elektroda, tam pojavi še dodaten padec napetosti. Vseeno pa je tudi tu polje v večjem delu prostora med elektrodama kjer je merjenec, homogeno in skoraj enako razmerju med napetostjo in razdaljo med elektrodama. Zato je napaka, ki jo naredimo če to polje uporabimo za približno določitev pragov elektroporacije v tkivu, zadosti majhna. Na vseh slikah sta vrisana reverzibilni (modra črtkana črta) in ireverzibilni (rdeča črtkana črta) prag poracije.

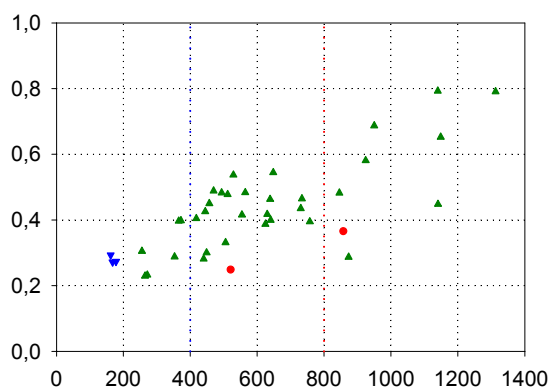
Iz potekov je razvidno, da se prag reverzibilne poracije pojavi v tkivu nekje pri jakosti teoretičnega električnega polja 400 V/cm, prag ireverzibilne poracije pa pri približno 800 V/cm.



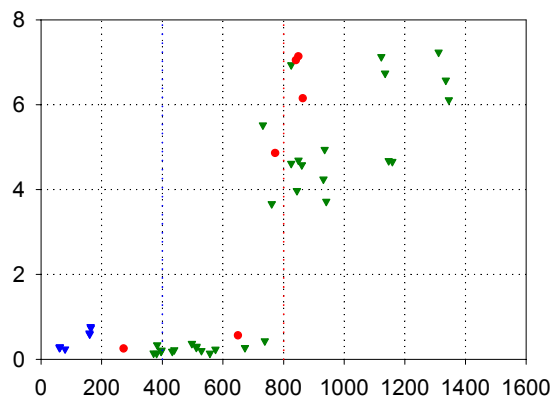
a)



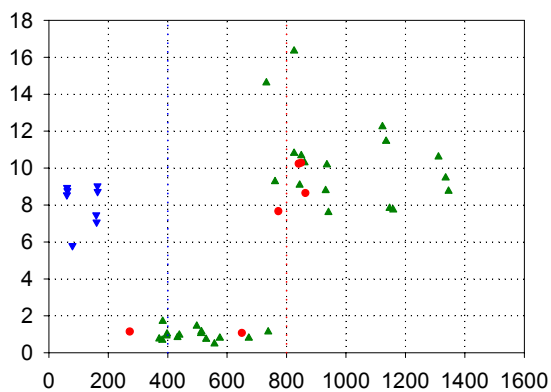
b)



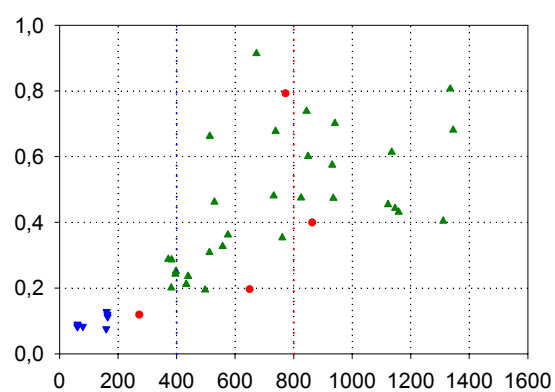
c)



d)



e)

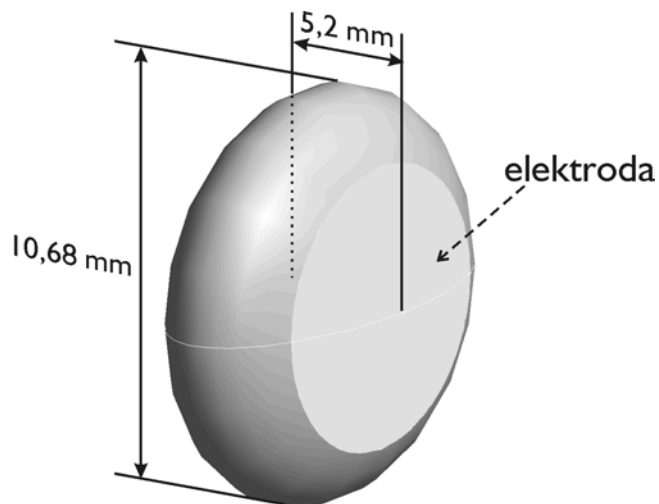


f)

Slika 40: Poteki a) toka (melanom B16), b) upornosti objekta (melanom B16), c) vnosa  $\text{Cr}^{51}$  (melanom B16), d) toka (LPB sarkom), e) upornosti objekta (LPB sarkom), f) vnosa  $\text{Cr}^{51}$  (LPB sarkom) v odvisnosti od teoretičnega električnega polja med elektrodama ( $U/d$ ) pri tumorju

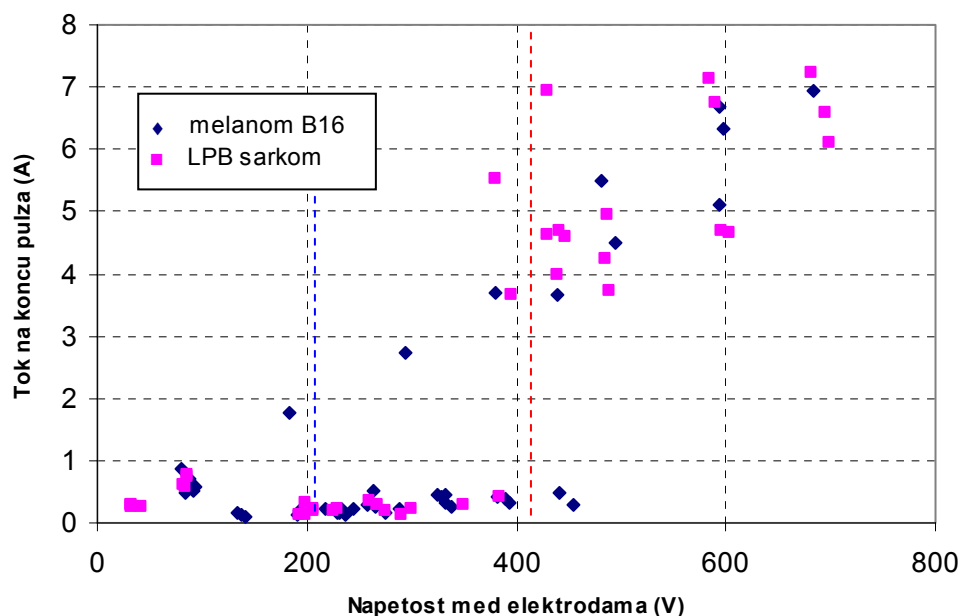
#### 4.3.3.2. MODEL V EMAS-U

V EMAS-u smo zgradili model elektroporacije tumorja, ki ga vidimo na sliki 41. Tudi tu elektrod fizično nismo modelirali, zaradi poenostavitve modela in manjšega časa potrebnega za izračun polja zaradi manjšega števila elementov. Pritisnjeno napetost smo modelirali kot robni pogoj, kjer spet upoštevamo prisotnost prevodnega gela med elektrodami in merjencem, torej je območje, na katerem je robni pogoj, večje kot bi bil dejanski fizični stik med elektrodo in objektom.



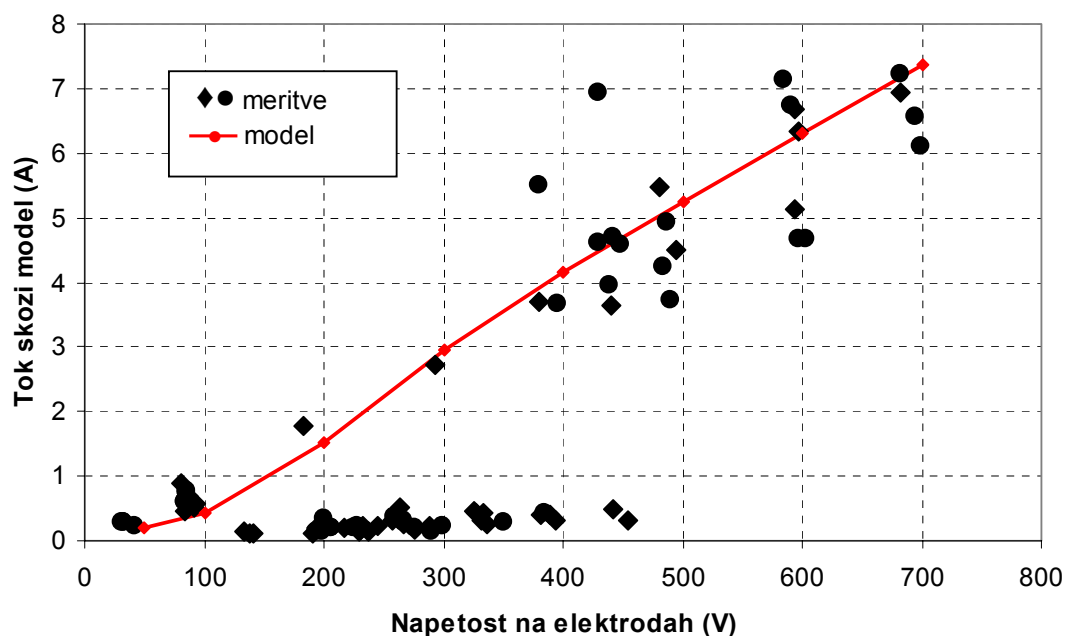
Slika 41: Geometrija modela elektroporacije tumorja

Ker model tudi tu vzbuja z napetostjo med ploščatima elektrodama, nas spet bolj kot odvisnost toka od teoretičnega električnega polja, torej razmerja  $U/d$ , zanima odvisnost od napetosti med elektrodama, zato to odvisnost še enkrat podajamo na sliki 42, kjer sta z modro in rdečo črto označena pragova reverzibilne in ireverzibilne elektroporacije (208 V in 416 V).



Slika 42: Potek toka v odvisnosti od napetosti med elektrodama pri tumorju

Spet smo s sekvenčno obdelavo izračunali reakcijski tok skozi model in dobljene toke potem primerjali z rezultati meritev. Parametre poracije pri sekvenčni obdelavi smo prilagajali toliko časa, da sta se oba poteka čimbolj ujemala. Za začetno vrednost prevodnosti tumorja smo po pregledu podatkov iz tretjega poglavja vzeli vrednost 0,3 S/m.

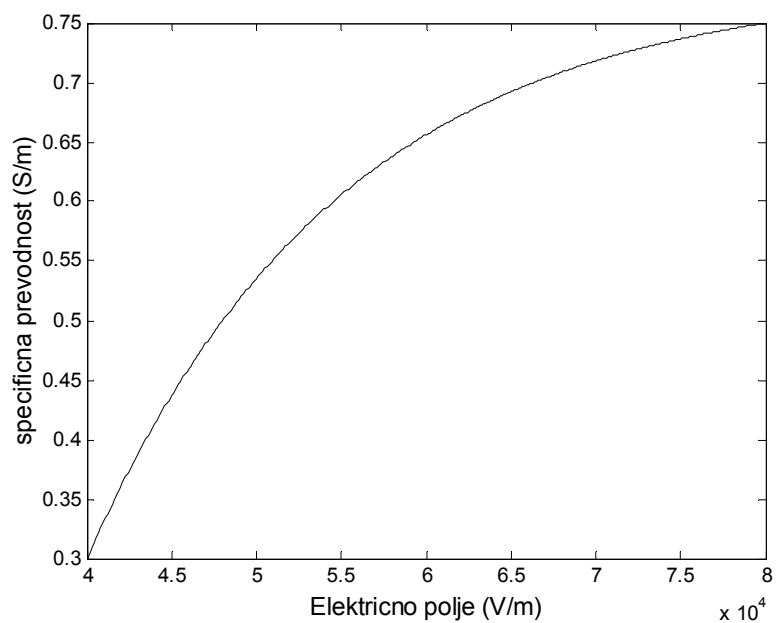


Slika 43: Primerjava poteka odvisnosti reakcijskega od napetosti na elektrodah med eksperimentalnimi podatki in matematičnim modelom v EMAS-u

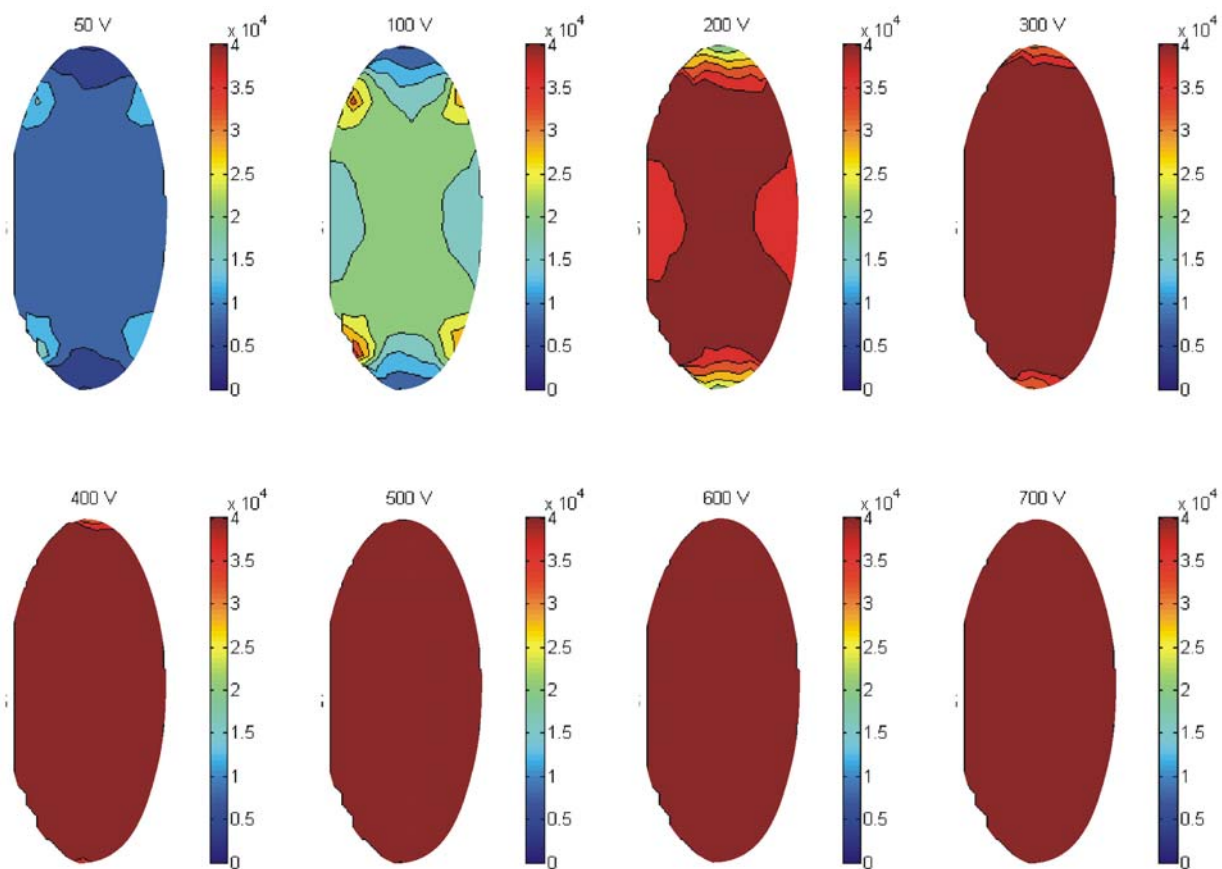
Prileganje modela na eksperimentalne podatke, ki ga vidimo na sliki 43, smo dosegli pri naslednjih vrednostih parametrov:

- Tip poracije: ⇒ funkcija  $1 - e^{-x}$
- Sprememba prevodnosti: ⇒ 2,5 kratno povečanje
- Pragovi poracije: ⇒ reverzibilni: 400 V/cm  
ireverzibilni: 800 V/cm
- Naklon poteka med pragovi: ⇒  $B = 15.000$
- Začetna specifična prevodnost: ⇒ 0,3 S/m

Na sliki 44 vidimo funkcijo poteka poracije, s katero smo dosegli zgornje rezultate, slika 45 pa prikazuje porazdelitve električnega polja v tumorju na koncu pulza, torej ko je proces elektroporacije stekel do konca, za različne napetosti na elektrodah. S temno rdečo barvo so označena področja, ki so nad reverzibilnim pragom poracije. Vidimo da je lep del tumorja permeabiliziran pri vzbujalni napetosti 200 V, od 300 V naprej pa je praktično cel tumor nad reverzibilnom pragom poracije.



Slika 44: Uporabljena funkcija poteka poracije za tumor



Slika 45: Porazdelitev električnega polja po koncu elektroporacije v tumorju za različne napetosti

#### 4.3.4. PODKOŽNO MAŠČEVJE

Eksperimentalnih podatkov o potekih tokov in upornosti, iz katerih bi lahko določili pragove elektroporacije in spremembe specifičnih upornosti mišice, nimamo. Zato smo te parametre določili sami. Vzeli smo najpreprostejši tip elektroporacije, torej stopničasto.

- Tip poracije:  $\Rightarrow$  funkcija: stopnica
- Sprememba prevodnosti:  $\Rightarrow$  3 kratno povečanje
- Prag poracije:  $\Rightarrow$  reverzibilni: 200 V/cm
- Začetna specifična prevodnost:  $\Rightarrow$  0,03 S/m

#### 4.3.5. FUNKCIJE POTEKOV ELEKTROPORACIJE ZA VSA TKIVA

Tabela 3: Pragovi poracije, povečanje specifičnih prevodnosti in funkcije potekov za vsa tkiva

Tkivo	Tip poracije	Povečanje prevodnosti	Pragovi poracije (V/m)	Naklon funkcije	Začetne spec. prevod. (S/m)
mišica	funkcija $e^x-1$	4 kratno	rev.: 20.000; irev.: 45.000	B=15.000	0,735 / 0,11
koža	funkcija $e^x-1$	80 kratno	rev.: 40.000; irev.: 90.000	B=30.000	0,002
tumor	funkcija $1-e^x$	2,5 kratno	rev.: 40.000; irev.: 80.000	B=15.000	0,3
maščoba	stopnica	3 kratno	reverz.: 20.000	/	0,03

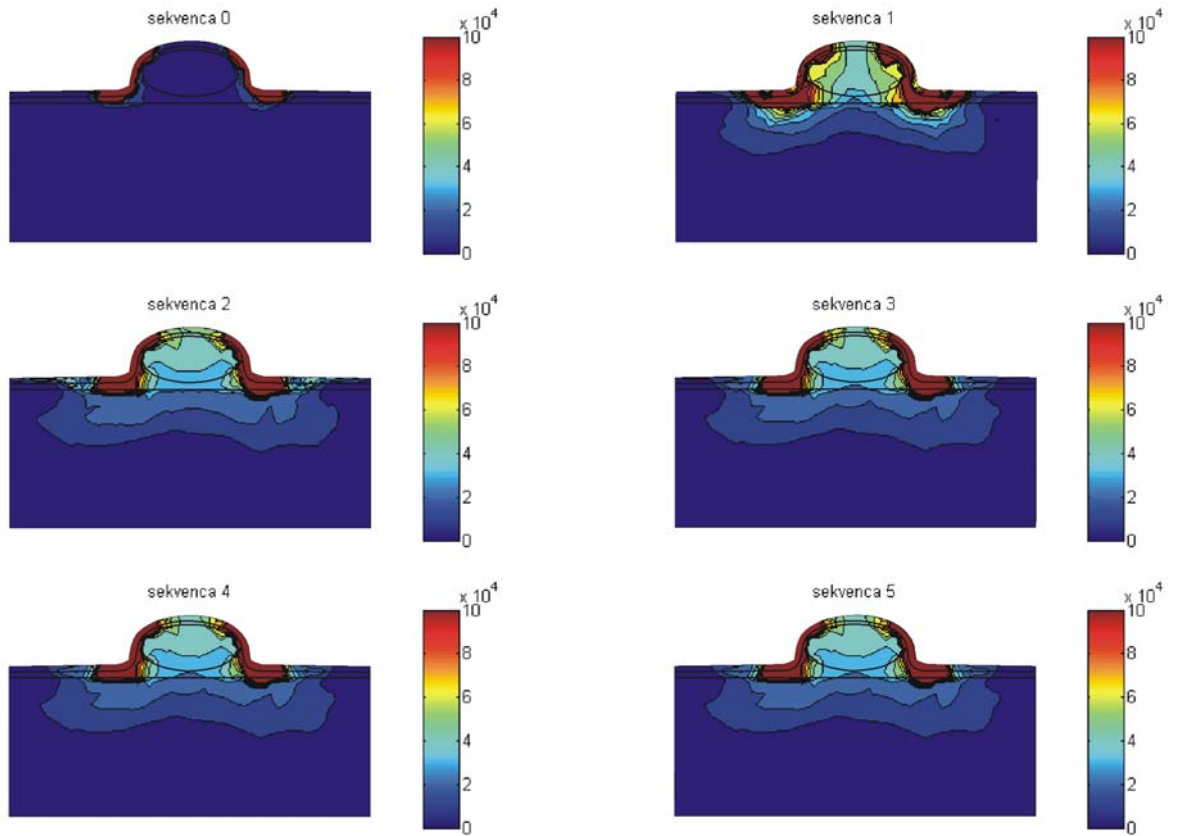
#### 4.4. PORAZDELITEV ELEKTRIČNEGA POLJA PO ELEKTROPORACIJI

Dobljene pragove poracije in spremembe specifičnih prevodnosti uporabimo v modelu podkožnega tumorja, ki smo ga opisali v poglavju 2.3. in ga vidimo na sliki 1.

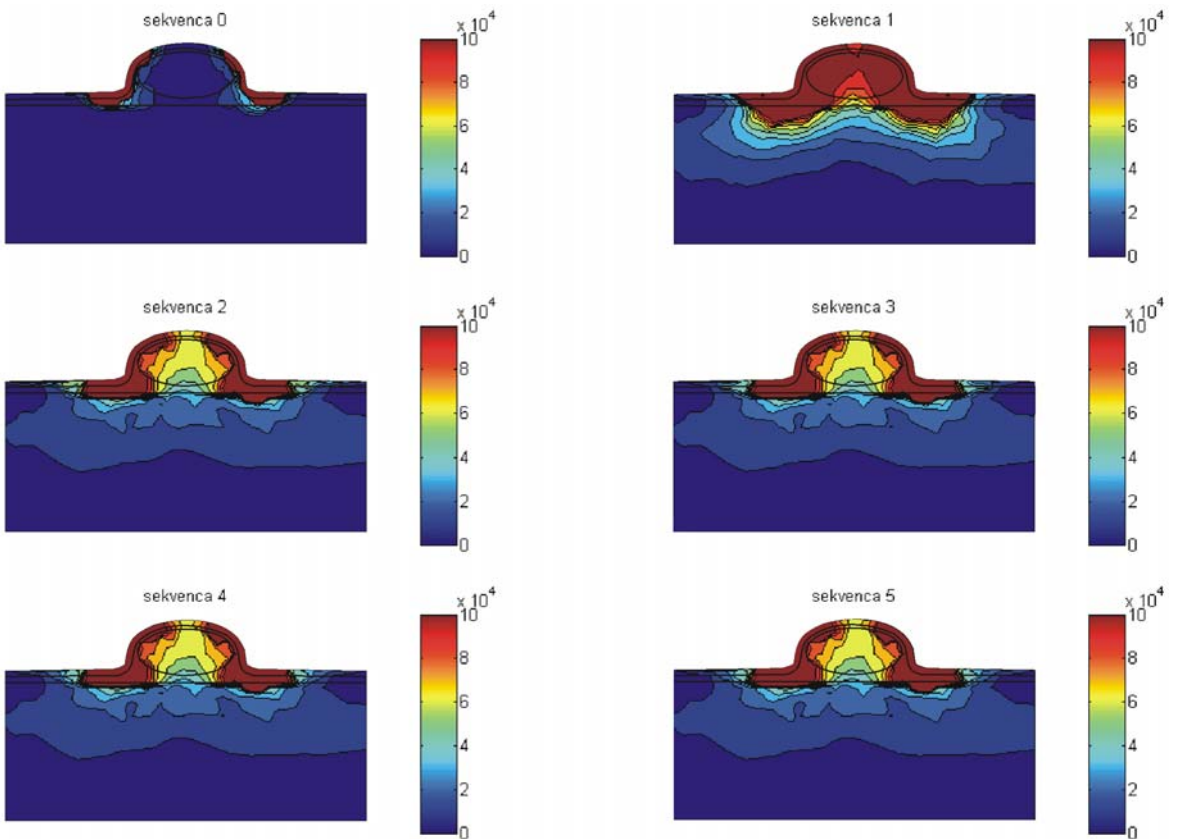
Sekvenčno analizo smo zagnali trikrat in sicer s tremi različnimi napetostmi med elektrodama: 500 V, 1000 V in 1500 V. Na sliki 46 vidimo šest stopenj sekvenčne analize poteka elektroporacije v modelu za različne napetosti med elektrodama. Sekvenca 0 pomeni porazdelitev električnega polja v modelu pred zagonom sekvenčne analize, torej ko imajo tkiva še začetne specifične prevodnosti. Vsi prikazi polja so omejeni z enako najvišjo vrednostjo polja, da jih med sabo lažje primerjamo. Najtemnejša rdeča barva torej pomeni, da v tistem področju polje presega vrednost 1000 V/cm.

Če opazujemo zadnjo, peto sekvenco, torej ko naj bi elektroporacija potekla do konca, vidimo da se tumor v modelu delno permeabilizira že pri pritisnjeni napetosti 500 V. Za mejo reverzibilne elektroporacije v tumorju smo spet vzeli jakost polja 400V/cm. Pri pritisnjeni napetosti 1000 V je tumor v celoti permeabiliziran, nekatera območja v njem pa so tudi že nad mejo ireverzibilne elektroporacije, ki je v tumorju 800 V/cm. Pri napetosti 1500 V pa je skoraj cel tumor nad ireverzibilnim pragom elektroporacije.

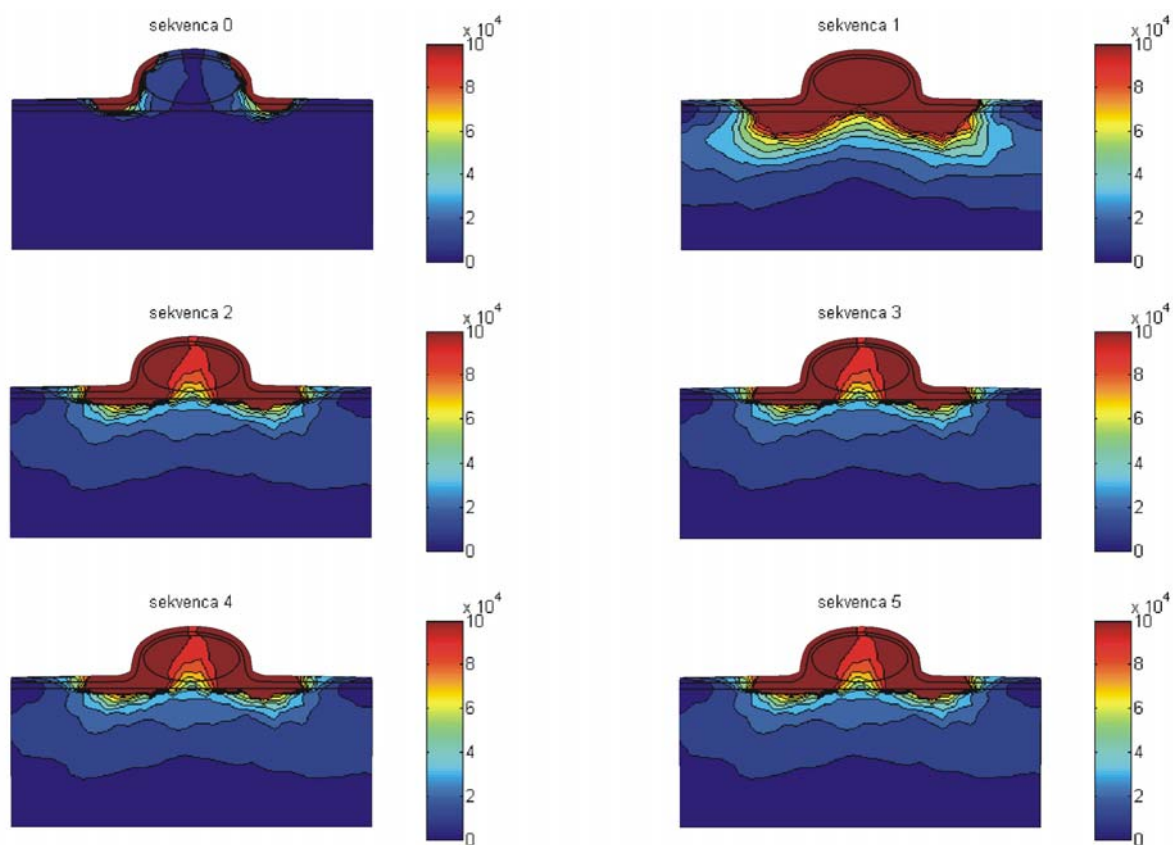
Če pogledamo posamezne stopnje poteka elektroporacije, vidimo da je na začetku polje najvišje v koži, ki ima takrat kar za faktor 10-100 višjo specifično prevodnost kot ostala tkiva. V prvi sekvenci se najprej permeabilizira koža in električno polje prodre v notranjost, kar povzroči permeabilizacijo tudi ostalih tkiv. Vidimo, da se že takoj v tretjem koraku vzpostavi skoraj končno stanje, saj so zadnje štiri sekvence skoraj enake.



a)



b)



c)

Slika 46: Šest stopenj sekvenčne analize poteka elektroporacije v modelu podkožnega tumorja za različne napetosti med elektrodama (razdalja je 8 mm): a) 500 V, b) 1000 V, c) 1500 V

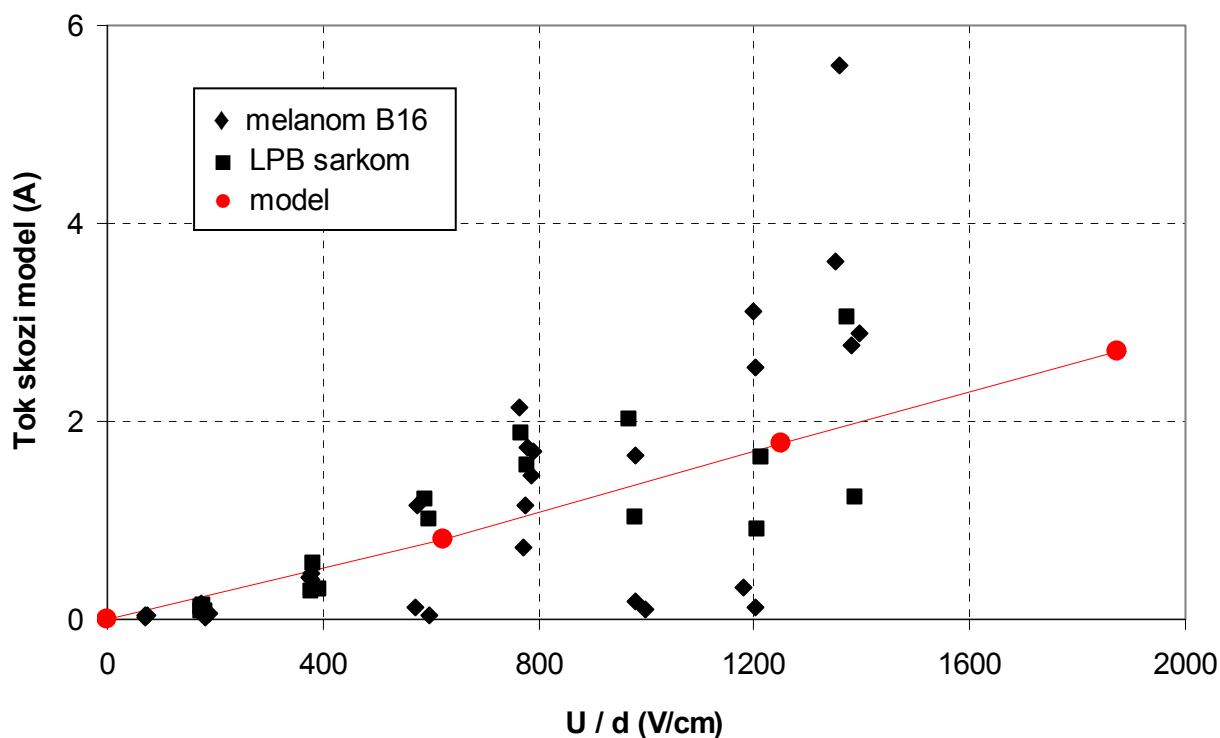
Izračunali smo tudi reakcijski tok skozi model ko je elektroporacija potekla do konca in ta rezultat primerjali z nekaterimi eksperimentalnimi podatki.

Tabela 4: Reakcijski toki skozi model podkožnega tumorja ob koncu elektroporacije

NAPETOST	REAKCIJSKI TOK (A)
500 V	0,806
1000 V	1,775
1500 V	2,71

Reakcijske tokove, dobljene iz modela lahko spet primerjamo z meritvami, ki so bile opravljene na tumorjih [44]. Tokrat tumor ni bil izrezan, ampak je bila napetost dovedena s ploščatimi elektrodami preko kože. Na sliki 47 vidimo primerjavo meritev toka na koncu pulza in reakcijskih tokov iz modela.

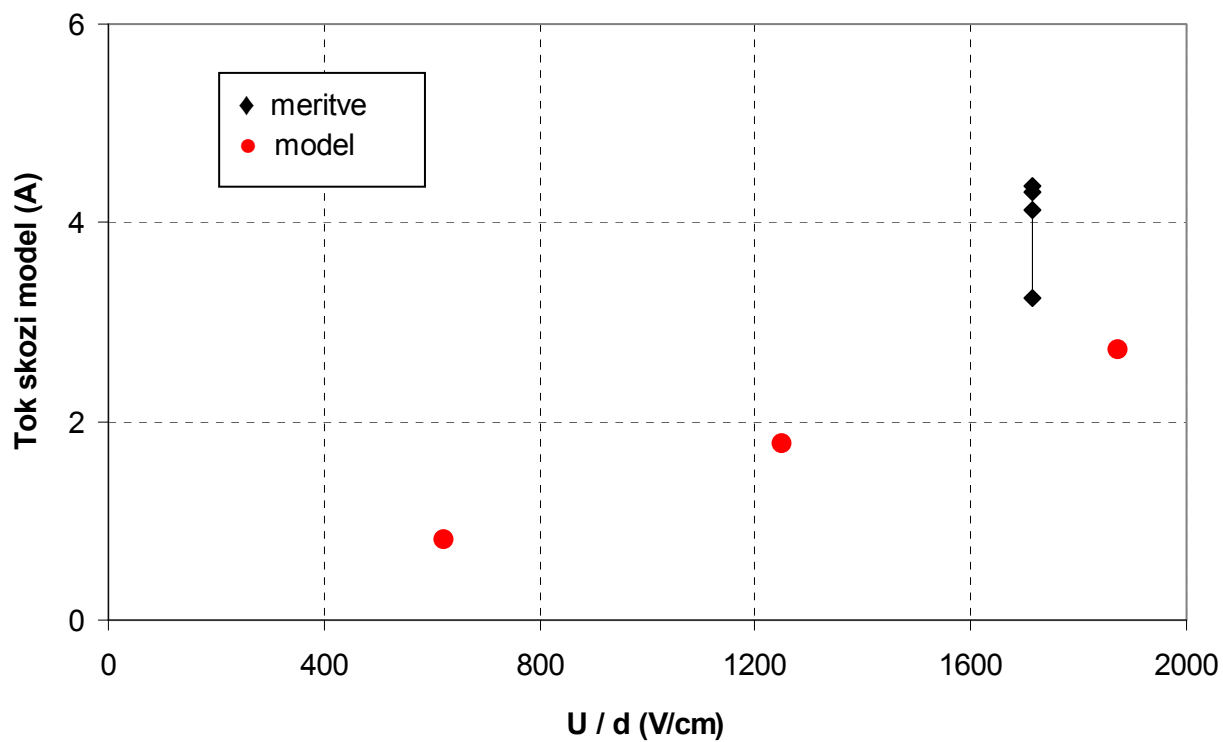




Slika 47: Primerjava izmerjenih tokov skozi tumor in reakcijskih tokov, dobljenih iz modela

Opazimo kar dobro ujemanje izmerjenih in izračunanih tokov. Potrebno pa je poudariti, da je ta primerjava samo orientacijska, saj smo tako pri izmerjenih podatkih, kot tudi podatkih, dobljenih iz modela, na abscisni osi podali napetost na elektrodah, normirano z razdaljo med elektrodama. Pri meritvah je bila le-ta 5,2 mm, v numeričnem modelu pa je razdalja med elektrodama 8 mm. S takšnim normiranjem in primerjanjem rezultatov seveda naredimo napako, saj polje med elektrodama tako pri meritvah, kot tudi v modelu, ni homogeno.

Na voljo imamo še nekatere druge meritve, ki so bile na podkožnih tumorjih opravljene v sodelovanju s sodelavci Oddelka za tumorsko biologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani v zadnjih letih. Na sliki 48 vidimo še eno primerjavo modela z meritvami, kjer normiranje vzbujalne napetosti z razdaljo med elektrodama kaže realnejšo sliko, saj je bila razdalja med elektrodama tokrat 8,1 mm, torej neposredno primerljiva z našim modelom (8 mm). Vseeno pa ta vrednost še vedno ne pomeni vrednosti električnega polja med elektrodama. Vendar pa so meritve tu skopejše, saj imamo podatke le za eno napetost, in sicer 1390 V, oziroma 1716 V/cm napetosti normirane z razdaljo. Tudi tu opazimo kar dobro ujemanje meritev in modela, vseeno pa so vrednosti reakcijskega toka skozi model nekoliko nižje v obeh primerih.



Slika 48: Primerjava izmerjenih tokov skozi tumor in reakcijskih tokov, dobljenih iz modela

---

## 5. PARAMETRIZACIJA

Po izgradnji numeričnega modela nas je zanimalo tudi, kako je le-ta občutljiv na spremembe parametrov, kot so začetne vrednosti specifičnih prevodnosti tkiv, način poteka elektroporacije, spremembe geometrije. Opazovali smo kako se spreminja reakcijski tok skozi model in kakšna je porazdelitev električnega polja po poteku elektroporacije.

### 5.1. ZAČETNE VREDNOSTI SPECIFIČNIH PREVODNOSTI TKIV

V modelu smo spreminjali začetne vrednosti specifičnih prevodnosti tkiv in opazovali kako to vpliva na izhodni tok. Vzeli smo vrednosti z roba območij vrednosti specifičnih prevodnosti, ki smo jih našli v literaturi in so podane v tretjem poglavju. Sekvenčne analize za vse tri vzbujaalne napetosti (500, 1000 in 1500 V) smo zagnali še osemkrat in sicer:

- model 1: minimalna vrednost spec. prev. tumorja – 0,22 S/m
- model 2: maksimalna vrednost spec. prev. tumorja – 0,4 S/m
- model 3: minimalna vrednost spec. prev. kože – 0,0002 S/m
- model 4: maksimalna vrednost spec. prev. kože – 0,02 S/m
- model 5: minimalna vrednost spec. prev. maščobe – 0,02 S/m
- model 6: maksimalna vrednost spec. prev. maščobe – 0,04 S/m
- model 7: minimalna vrednost spec. prev. mišice – 0,3 S/m vzdolžno; 0,04 S/m prečno
- model 8: maksimalna vrednost spec. prev. mišice – 0,8 S/m vzdolžno; 0,14 S/m prečno

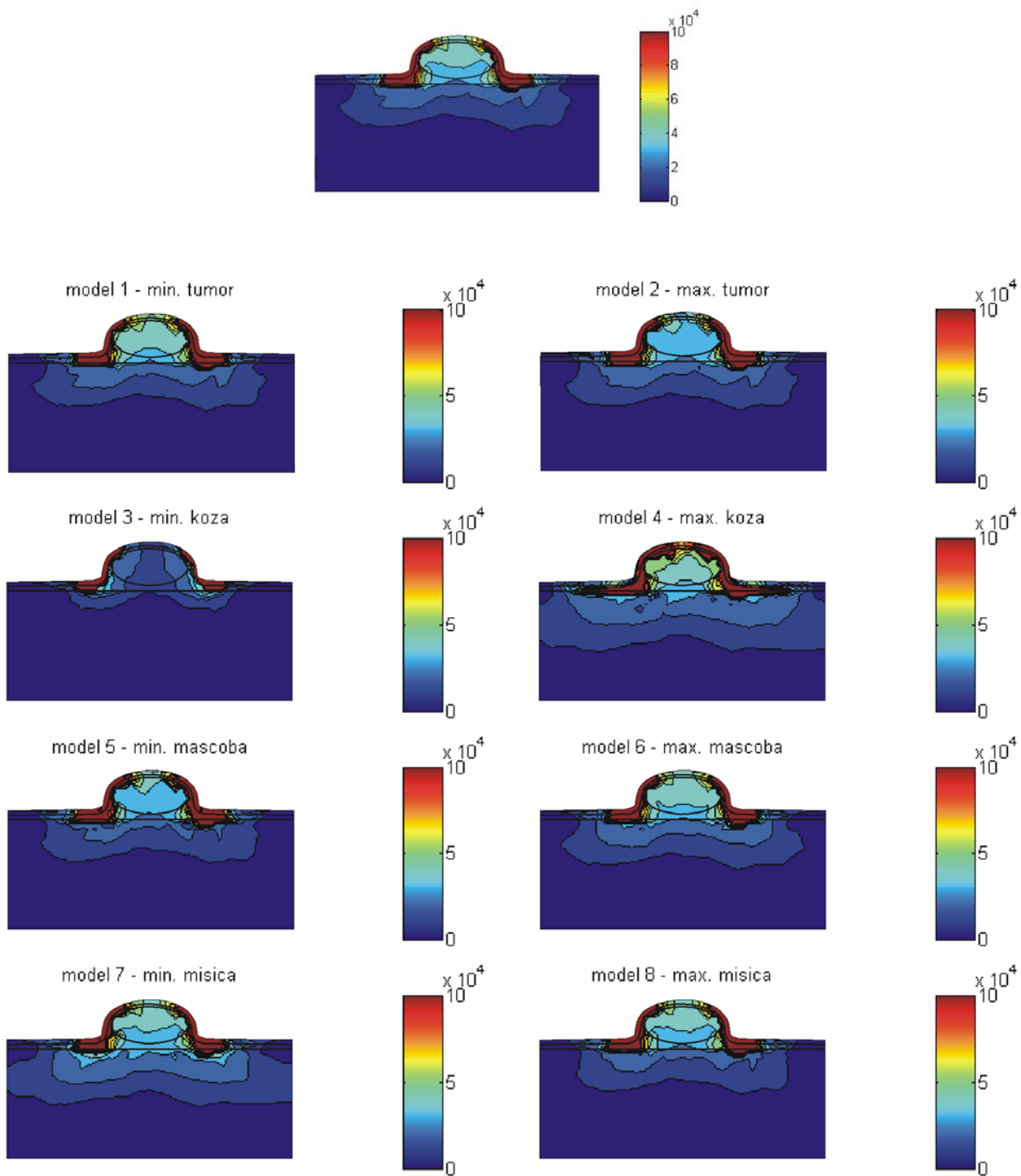
Ostalim tkivom smo vrednosti specifičnih prevodnosti v posameznih modelih pustili takšne, kot smo jih podali v prejšnjem poglavju. Funkcij potekov elektroporacije, povečanj prevodnosti, ter reverzibilnih in ireverzibilnih pragov pri sekvenčnih analizah nismo spreminjali. Reakcijski toki osnovnega modela za različne napetosti so podani v tabeli 4, v tabeli 5 pa so zbrani reakcijski tokovi in njihovo odstopanje od tokov skozi osnovni model pri modelih s spremenjenimi začetnimi vrednostmi specifičnih prevodnosti tkiv.

Tabela 5: Reakcijski toki skozi modele s spremenjenimi začetnimi vrednostmi spec. prevodnosti tkiv

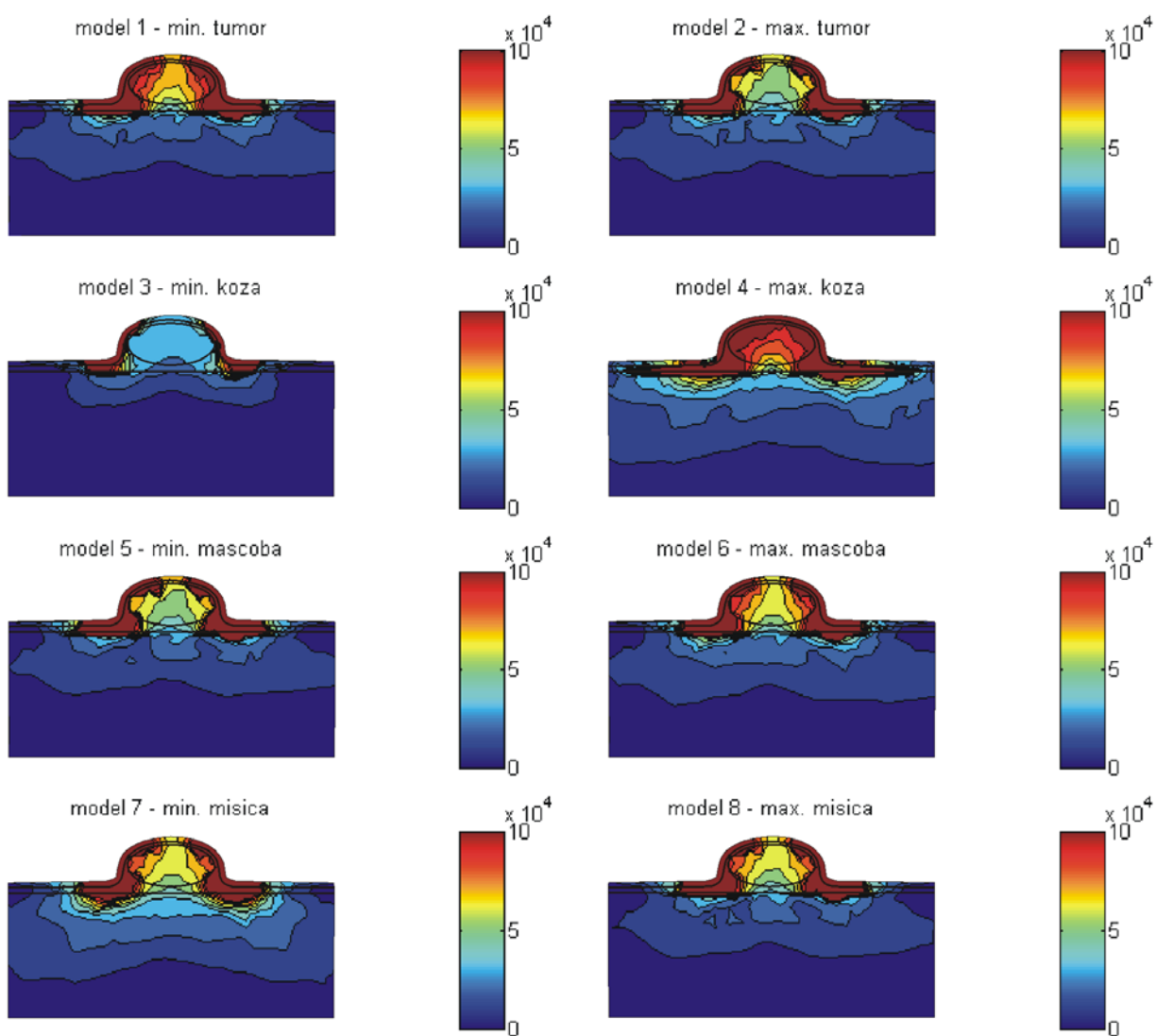
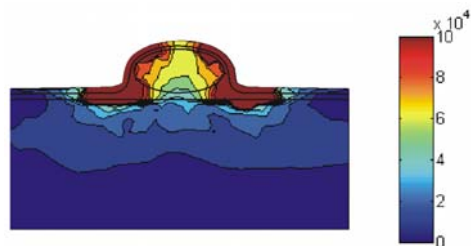
NAPETOST	ŠT. MODELA	REAKCIJSKI TOK (A)	ODSTOPANJE OD OSNOVNEGA MODELA (%)
500 V	1 (min. tumor)	0,779643	-3,232
	2 (max. tumor)	0,829796	2,993
	3 (min. koža)	0,18784	-76,686
	4 (max.koža)	2,271125	181,890
	5 (min. maščoba)	0,699255	-13,209
	6 (max. maščoba)	0,8796	9,175
	7 (min. mišica)	0,729029	-9,514
	8 (max. mišica)	0,815336	1,199
1000 V	1 (min. tumor)	1,707672	-3,793
	2 (max. tumor)	1,836542	3,467
	3 (min. koža)	0,390104	-78,022
	4 (max.koža)	4,999328	181,653
	5 (min. maščoba)	1,530287	-13,786
	6 (max. maščoba)	1,94619	9,645
	7 (min. mišica)	1,606253	-9,507
	8 (max. mišica)	1,791049	0,904
1500 V	1 (min. tumor)	2,606334	-3,811
	2 (max. tumor)	2,801451	3,390
	3 (min. koža)	0,608394	-77,547
	4 (max.koža)	7,665286	182,893
	5 (min. maščoba)	2,340059	-13,638
	6 (max. maščoba)	2,970161	9,616
	7 (min. mišica)	2,450021	-9,580
	8 (max. mišica)	2,740417	1,137

Opazimo, da do večjega odstopanja pride samo pri spreminjanju specifičnih prevodnosti kože, kar je bilo tudi za pričakovati, saj se le-ta močno razlikuje od ostalih tkiv, območje vrednosti v katerem se gibljejo vrednosti, pa je tudi zelo široko. Nekoliko večje odstopanje opazimo tudi pri spreminjanju specifične prevodnosti maščobe, ki je tik pod kožo in ima prav tako dokaj nizko prevodnost. Zanimivo je tudi nekoliko večje odstopanje pri modelu z minimalno specifično prevodnostjo mišice.

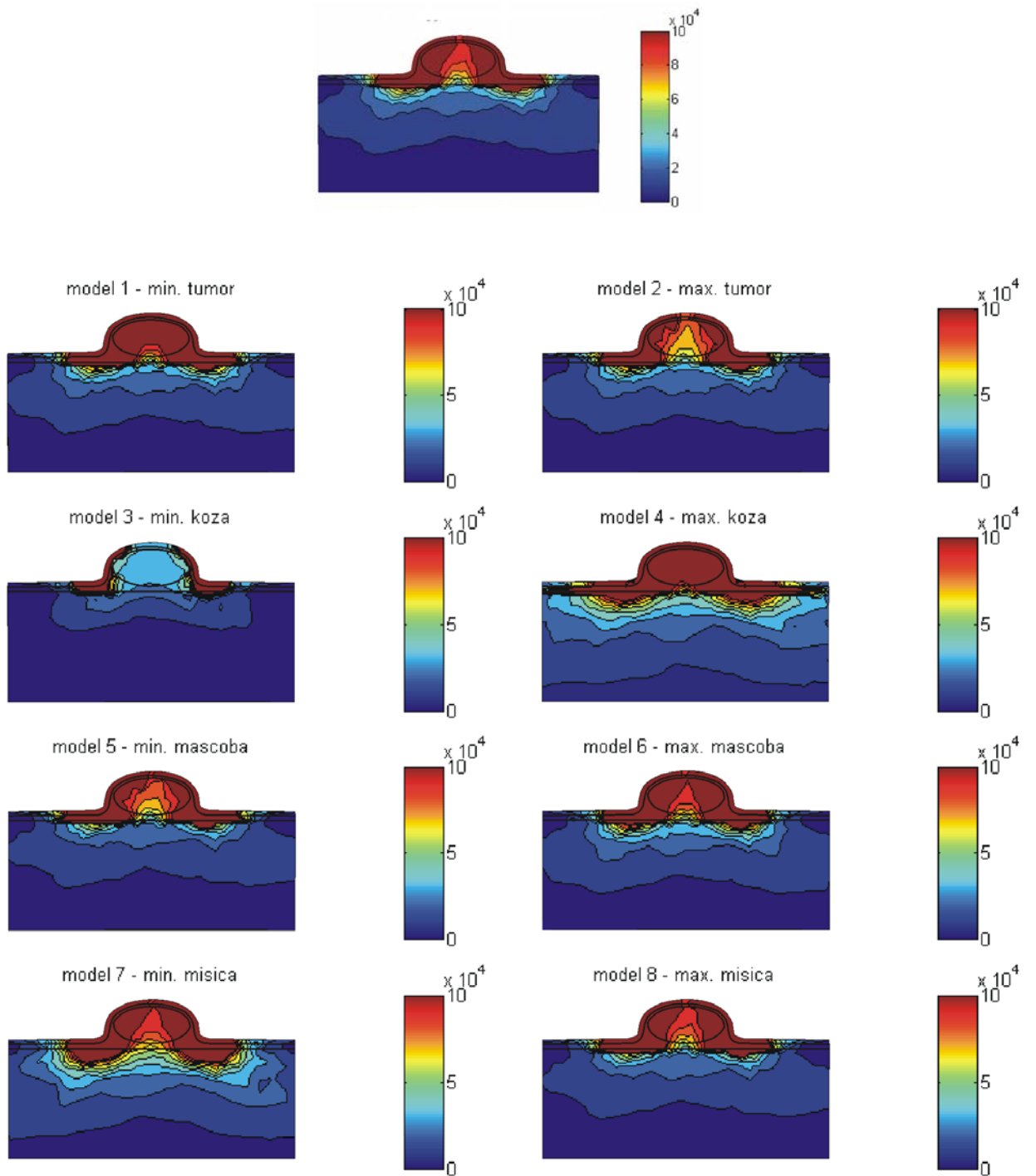
Na slikah 49 – 51 vidimo primerjavo porazdelitev električnega polja po poteku procesa elektroporacije v modelu, torej na koncu sekvenčnih analiz na zgoraj naštetih modelih s spremenjenimi začetnimi specifičnimi prevodnostmi tkiv.



Slika 49: Primerjava porazdelitve električnega polja na koncu sekvenčnih analiz v modelih s spremenjenimi začetnimi specifičnimi prevodnostmi tkiv z osnovnim modelom, pri napetosti med elektrodama 500V.



Slika 50: Primerjava porazdelitve električnega polja na koncu sekvenčnih analiz v modelih s spremenjenimi začetnimi specifičnimi prevodnostmi tkiv z osnovnim modelom, pri napetosti med elektrodama 1000V.



Slika 51: Primerjava porazdelitve električnega polja na koncu sekvenčnih analiz v modelih s spremenjenimi začetnimi specifičnimi prevodnostmi tkiv z osnovnim modelom, pri napetosti med elektrodama 1500V.

## 5.2. NAČIN POTEKA ELEKTROPORACIJE

V poglavju 4.3. smo določili pragovne vrednosti električnega polja, spremembe specifičnih prevodnosti tkiv in funkcije poteka elektroporacije v posameznih tkivih, ki smo jih uporabili v numeričnem modelu. Opazili pa smo, da lahko do ujemanja modelne funkcije elektroporacije v posameznih tkivih in meritev pridemo ob uporabi različnih funkcij potekov z različnimi robnimi pogoji. Zanimalo nas je, kolikšen vpliv ima to na izhodne toke in porazdelitev električnega polja v modelu podkožnega tumorja. Sekvenčno analizo elektroporacije v modelu smo zagnali še enkrat, tokrat z malo spremenjenimi poteki elektroporacije, pragovi poracije, povečanjem prevodnosti tkiv in njihovimi začetnimi vrednostmi. Pri čemer se torej izhodi takšnih modelov elektroporacij v posameznih tkivih še vedno prilegajo tokovno-napetostnim karakteristikam tkiv, ki jih dobimo iz meritev. V tabeli 6 so zbrani podatki o poteku elektroporacije v tem modelu, pri čemer so parametri za tumor in maščobo isti kot pri osnovnem modelu, spremenjeni so le za mišico in kožo.

Tabela 6: Parametri poteka elektroporacije pri opazovanju vpliva spremembe parametrov na izhod modela.

Tkivo	Tip poracije	Povečanje prevodnosti	Pragovi poracije (V/m)	Naklon funkcije	Začetne spec. prevod. (S/m)
mišica	sigmoida	3,5 kratno	rev.: 23.871; irev.: 45.000	B=10.000	0,75 / 0,135
koža	funkcija $e^x-1$	20 kratno	rev.: 48.000; irev.: 105.000	B=50.000	0,008
tumor	funkcija $1-e^x$	2,5 kratno	rev.: 40.000; irev.: 80.000	B=15.000	0,3
maščoba	stopnica	3 kratno	rev.: 20.000	/	0,03

Opazimo zelo majhna odstopanja reakcijskih tokov po končanem procesu elektroporacije (tabela 7). Iz vsega do sedaj ugotovljenega lahko sklepamo, da je za vrednost izhoda modela, torej velikost reakcijskih tokov in porazdelitve električnega polja v modelu pomembna predvsem vrednost specifične prevodnosti tkiv na koncu procesa elektroporacije. Zaradi majhnih odstopanj tudi niso prikazane slike porazdelitev električnega polja na koncu procesa elektroporacije, saj se le-te skoraj ne razlikujejo od porazdelitev pri osnovnem modelu.

Tabela 7: Reakcijski toki pri spremenjenih parametrih poteka elektroporacije v modelu

NAPETOST	REAKCIJSKI TOK (A)	ODSTOPANJE OD OSNOVNEGA MODELA (%)
500 V	0,820406	1,828
1000 V	1,781285	0,354
1500 V	2,713435	0,141

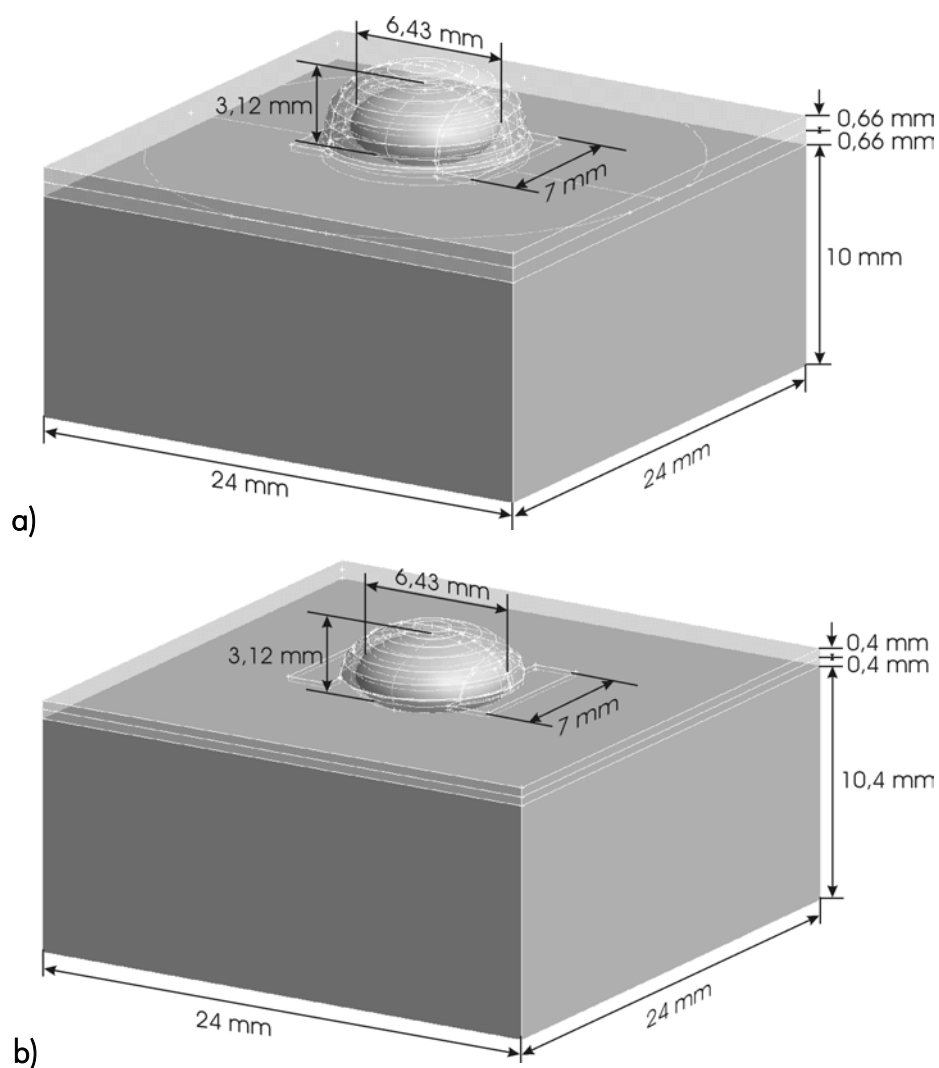


### 5.3. SPREMEMBA GEOMETRIJE MODELA

Pri meritvah na realnih objektih, torej pri poskusih na živalih je ponovljivost geometrije meritve skoraj nemogoča. Različne velikosti, oblike in pozicije tumorjev ter različne debeline kože in podkožnega maščevja seveda povzročijo razlike v rezultatih meritev že zgolj zaradi različne geometrije meritev. Zato smo z našim modelom preverili kako spremembe nekaterih od teh parametrov vplivajo na izhod modela. Zgradili smo dva modela, ki se od osnovnega (slika 1) razlikujeta po:

- debelini plasti kože in podkožnega maščevja. Debelina teh plasti je pri osnovnem modelu 0,4 mm, pri spremenjenem modelu pa sta obe plasti debeli 0,66 mm.
- globini na kateri se nahaja tumor. Pri spremenjenem modelu smo glede na osnovni model tumor poglobili za 1,2 cm.

Začetne vrednosti specifičnih prevodnosti vseh tkiv in potek elektroporacije pri obeh modelih ostajata ista. Na sliki 52 vidimo geometriji spremenjenih modelov.



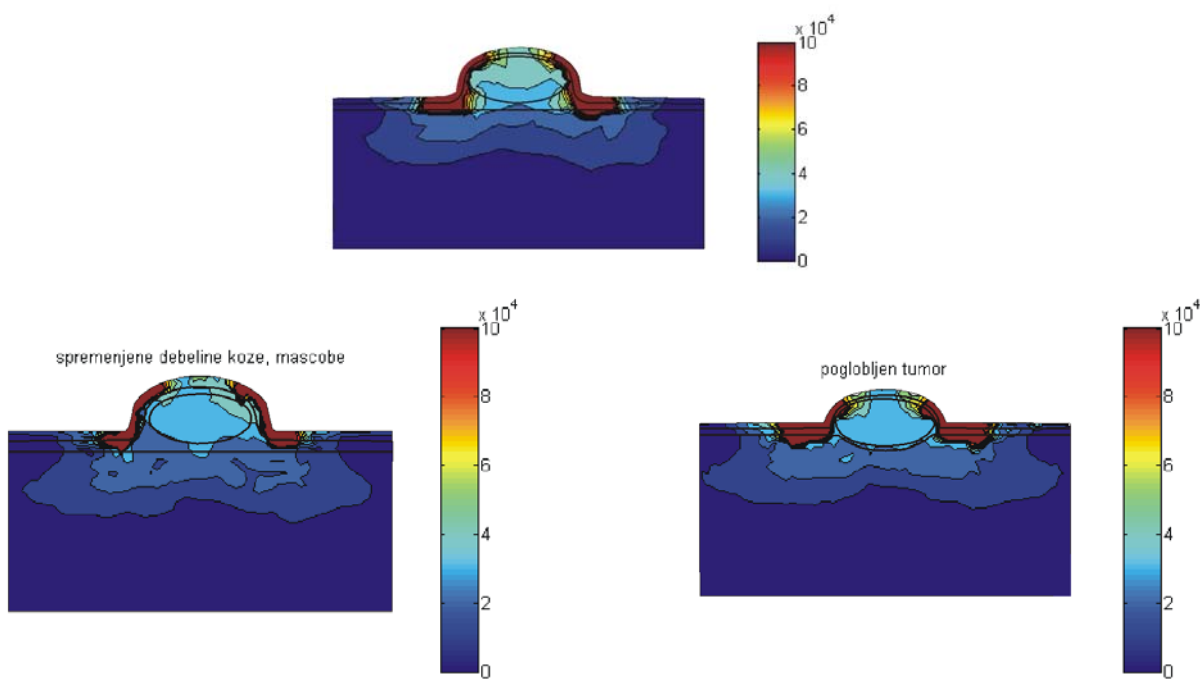
Slika 52: Geometriji spremenjenih modelov. a) debelejši plasti kože in podkožnega maščevja (0,66 mm namesto 0,4 mm), b) poglobljen tumor

Sekvenčno analizo smo spet zagnali za napetosti 500, 1000 in 1500 V in v tabeli 8 so zbrani podatki o reakcijskih tokovih skozi modela na koncu sekvenčne analize, torej ko je v modelu elektroporacija potekla do konca, ter odstopanja od reakcijskih tokov skozi osnovni model.

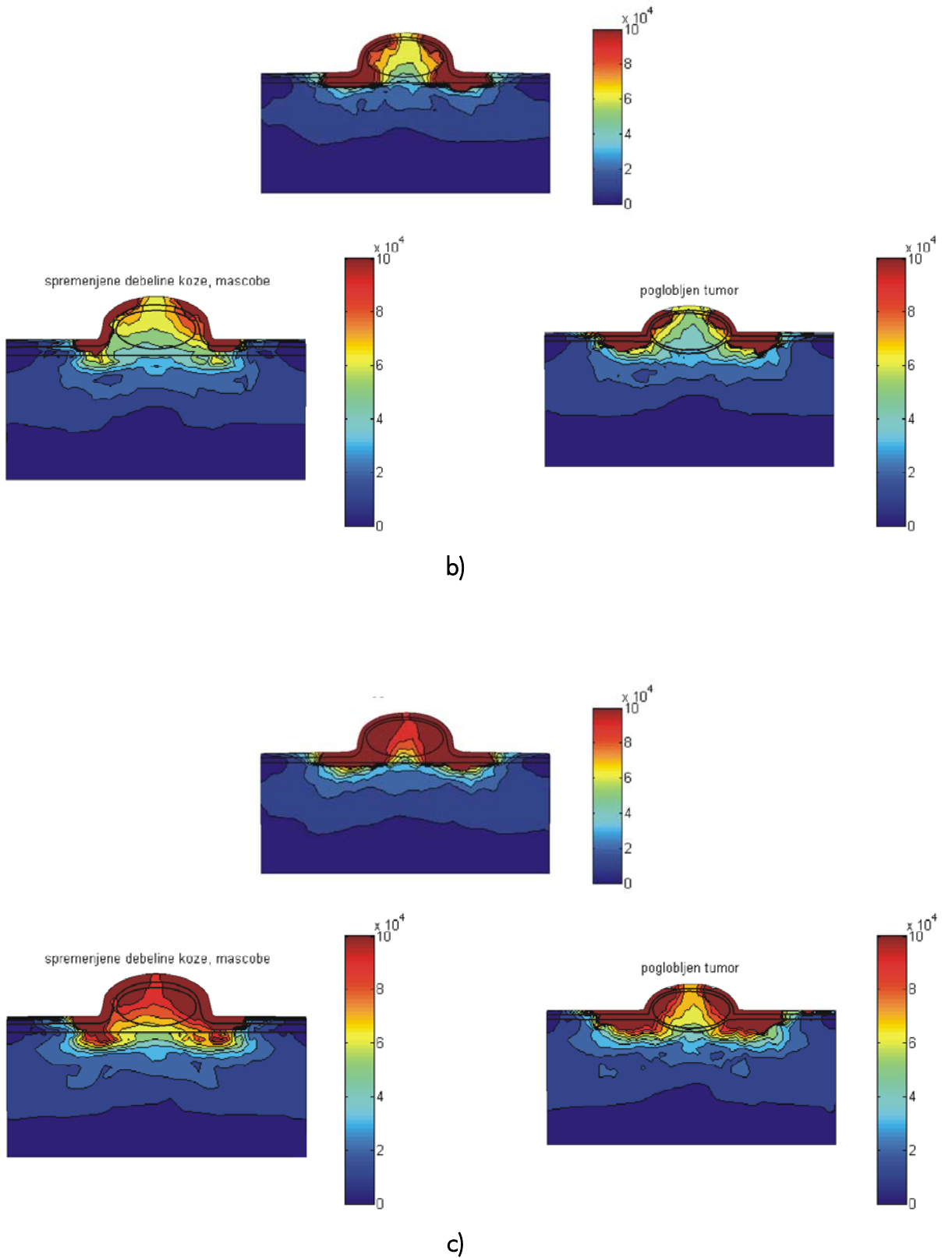
Tabela 8: Reakcijski toki pri spremenjenih debelinah kože in maščobe ter pri spremenjeni globini tumorja

NAPETOST	MODEL	REAKCIJSKI TOK (A)	ODSTOPANJE OD OSNOVNEGA MODELA (%)
500 V	sprem. debeline	1,332338	65,368
	sprem. globina	0,739761	-8,182
1000 V	sprem. debeline	2,858949	61,068
	sprem. globina	1,643782	-7,392
1500 V	sprem. debeline	4,355561	60,745
	sprem. globina	2,522831	-6,893

Na sliki 53 vidimo primerjavo porazdelitev električnega polja po poteku procesa elektroporacije, torej na koncu sekvenčnih analiz na modelih s spremenjeno geometrijo. Za primerjavo vidimo tudi porazdelitev električnega polja v osnovnem modelu.



a)



Slika 53: Primerjava porazdelitev električnega polja na koncu sekvenčnih analiz v modelih s spremenjenimi geometrijami z osnovnim modelom, pri napetosti med elektrodama a) 500V, b) 1000V, c) 1500V

---

Opazimo kar veliko odstopanje reakcijskega toka pri modelu s spremenjenimi debelinami kože in maščobe, kar že spet kaže na to, da nam ti dve zunanji plasti največ prispevata k napaki zaradi svoje neprevodne narave ter zunanje lege. Pri pregledu vrednosti reakcijskih tokov pred in med procesom elektroporacije, torej v posameznih korakih sekvenčne analize smo ugotovili, da je tok pred elektroporacijo seveda manjši, saj sta plasti nizkoprevodnih tkiv debelejši in je torej celotna prevodnost modela manjša. Med elektroporacijo pa ta tok hitreje naraste in konča na vrednosti, ki je za približno 60% višja kot pri osnovnemu modelu.

Pri modelu poglobljenega tumorja pa po pregledu reakcijskih tokov pred in med procesom elektroporacije vidimo, da so tokovi dosledno nekoliko manjši kot pri osnovnemu modelu. Končen tok skozi model po končanem procesu elektroporacije je za približno 7% manjši kot tok skozi osnovni model. Zaradi globlje lege tumorja je namreč vrednost električnega polja v tumorju nižja kot pri osnovnemu modelu, s tem pa je nižja tudi stopnja permeabilizacije tumorja. Prevodnosti tumorja in nižje ležečih tkiv se ne povišajo veliko, kar pomeni, da tudi prevodnost celotnega modela ostane zadosti nizka. To pa se seveda odraža na nizki vrednosti toka skozi model. Opazimo tudi, da je odstopanje od osnovnega modela, pri višanju napetosti med elektrodama, nižje. Pri dovolj visoki napetosti namreč električno polje "prodre" v notranjost, in stopnja permeabiliziranosti tkiv, s tem pa povečanje njihovih prevodnosti, se poveča.

---

## 6. RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI

V prvem delu naše študije smo naredili pregled literature na področju dielektričnih lastnosti bioloških materialov. Zbrali smo podatke o specifični prevodnosti in relativni dielektričnosti za tumor, maščobo, mišico, kožo in kost. Opazili smo velike razlike med podatki, ki jih navajajo različni raziskovalci. Le-te so vzrok mnogih faktorjev, kot so: različne merilne tehnike, uporaba vzorcev različnih živalskih vrst, okolščine v katerih so bile izvedene meritve (*in vivo*, *ex vivo*, čas med smrtjo živali in izvedbo meritev, temperatura tkiva...) in nekaterih drugih faktorjev: sezonske spremembe tkiva, starost živali, morebitna bolezenska stanja osebka in drugi. Za vsako od zgoraj omenjenih tkiv smo iz celotnega območja vrednosti, ki jih najdemo v literaturi zbrali tiste, ki so se med seboj kar najbolj ujemali v zgoraj naštetih okoliščinah izvedbe meritev.

V nadaljevanju smo pri modeliranju uporabljali le prvo od obeh obravnavanih snovnih lastnosti tkiv, torej specifično prevodnost, saj je analiza potekala v enosmernih razmerah in pri računanju porazdelitve polja v modelu ni potrebno upoštevati različnih relativnih dielektričnosti tkiv. Za preučevanje poteka elektroporacije in vpliva nekaterih parametrov nanjo, pa nas ne zanimajo le začetne vrednosti specifične prevodnosti posameznih tkiv, ki v modelu nastopajo, ampak tudi spremembe specifičnih prevodnosti med potekom elektroporacije, oblika njenega poteka in pragovne vrednosti električnega polja pri katerem le-ta nastopi.

Uporabili smo pristop sekvenčnega modeliranja, in na podlagi izračunanega električnega polja v modelu in znanju o obnašanju posameznih tkiv med elektroporacijo, smo z zato narejenim programom spreminjali vrednosti specifične prevodnosti v tistih elementih modela, kjer je vrednost električnega polja dosegla nek vnaprej določen prag. Tak, spremenjen model nato vstopi v naslednji korak sekvenčne analize, kjer zopet izračunamo električno polje in na podlagi njegovih vrednosti spremenimo specifične prevodnosti v elementih, ki dosegajo nadpragovno vrednost električnega polja. To ponavljamo, dokler se celoten proces ne ustavi in električno polje v nobenem elementu več ne doseže oziroma preseže nadpragovne vrednosti. Proces elektroporacije v modelu je s tem zaključen.

---

Ker v modelu nastopa več tkiv, vsak pa se na električno polje odziva drugače, moramo za vsako tkivo posebej določiti pragovne vrednosti električnega polja, pri katerih se tkivo permeabilizira, stopnjo spremembe specifične prevodnosti, ki pri tem nastopi in samo obliko poteka elektroporacije v obravnavanem tkivu. Na voljo smo imeli več meritev na tkivih živali, opazovali smo njihove tokovno-napetostne karakteristike, in parametre elektroporacije v modelu prilagajali toliko časa, da sta se tokovno-napetostni karakteristiki meritev in modela čimbolj ujemali.

Na razpolago smo imeli več različnih funkcij potekov elektroporacije med reverzibilnim in ireverzibilnim pragom permeabilizacije in sicer: stopničasto, linearno, dva eksponentna poteka ( $1-e^x$  in  $e^x-1$ ) in sigmoidno elektroporacijo. V programu za sekvenčne analize smo lahko spreminjali še faktor spremembe specifičnih prevodnosti tkiv, pragove permeabilizacije in strmino oziroma obliko funkcije poteka (zadnje le za oba eksponentna in sigmoidni potek).

Za začetne vrednosti specifičnih prevodnosti tkiv smo vzeli podatke iz literature, ki smo jih podali v tretjem poglavju. Vendar pa smo jih po primerjavi tokovno-napetostnih karakteristik modela in meritev v področju pred permeabilizacijo tkiva spremenili tako, da so se tudi v tem področju kar najbolje ujemali z rezultati meritev. Tako smo vrednosti specifičnih prevodnosti mišice po primerjavi z meritvami vzeli nekoliko višje kot smo jih dolčili na začetku, prav tako specifično prevodnost kože. Začetno vrednost prevodnosti tumorja smo tudi po primerjavi z meritvami pustili takšno kot smo jo našli v literaturi, za podkožno maščevje pa nismo imeli eksperimentalnih podatkov, zato smo parametre elektroporacije določili sami. Opazimo, da moramo za prileganje na eksperimentalne podatke za različna tkiva uporabiti različne funkcije potekov elektroporacije med reverzibilnim in ireverzibilnim pragom permeabilizacije. Sklepamo, da se različna tkiva na električno polje odzivajo različno.

Na koncu smo sekvenčno analizo zagnali še na modelu podkožnega tumorja s parametri elektroporacije, ki smo jih dobili za posamezna tkiva. Po primerjavi reakcijskih tokov modela s podatki nekaterih meritev, smo ugotovili zelo dobro ujemanje, izhod modela je bil sicer nekoliko nižji kot tokovi, dobljeni pri meritvah.

Pri izgradnji takšnega numeričnega modela nas zanima tudi, kako je le-ta občutljiv na spremembe nekaterih parametrov modela in poteka elektroporacije. Naredili smo nekaj sprememb in opazovali, kako se spreminjata reakcijski tok skozi model in porazdelitev električnega polja po poteku elektroporacije.

Najprej smo preizkusili vpliv določitve začetnih specifičnih prevodnosti tkiv. Tkivom smo izmenično določevali vrednosti prevodnosti z roba območij vrednosti, ki smo jih podali v tretjem poglavju, pri čemer so vrednosti prevodnosti ostalih tkiv ostale iste, prav tako potek elektroporacije, in opazovali njihov vpliv. Opazimo, da do večjega odstopanja pride pri spreminjanju specifične prevodnosti kože, kar smo tudi pričakovali, saj se le-ta močno razlikuje od ostalih tkiv, območje vrednosti, v katerem se gibljejo vrednosti, pa je tudi zelo široko. Nekoliko večje odstopanje je opaziti tudi pri spreminjanju specifične prevodnosti maščobe, ki ima prav tako dokaj nizko začetno prevodnost. V obeh primerih gre za najbolj zunanji tkivi, z najnižjima vrednostima specifične prevodnosti, ki za prodor električnega polja v notranjost predstavljata bariero, zato imata tudi največji vpliv na izhod modela. Zanimivo je tudi nekoliko večje odstopanje pri modelu z minimalno specifično prevodnostjo mišice. To si lahko razlagamo z oddaljenostjo mišice od elektrod. Jakost električnega polja in s tem

---

stopnja permeabilizacije v mišici je namreč nizka in do velikega povečanja prevodnosti v mišici ne pride. Ker pa to tkivo zavzema večji del modela, ima velik vpliv na skupno prevodnost modela, zato je prevodnost celotnega modela nizka zaradi nizke prevodnosti mišice in tudi tok skozi model je majhen.

Preizkusili smo tudi vpliv spremembe parametrov poteka elektroporacije, saj smo opazili, da lahko ujemanje tokovno-napetostnih karakteristik modela in meritev dosežemo pri različnih vrednostih teh parametrov. Uporabili smo druge podatke o poteku elektroporacije za tkivi mišice in kože, ki smo jih dobili neodvisno od naše študije. Podatki za tumor in maščobo so ostali isti. Tu opazimo zelo majhna odstopanja reakcijskih tokov in porazdelitve električnega polja od osnovnega modela. Sklepamo lahko, da so za izhod modela po končanem procesu elektroporacije pomembne predvsem vrednosti specifičnih prevodnosti tkiv na koncu poteka elektroporacije. Parametri poteka elektroporacije pa določajo predvsem vmesne stopnje procesa.

Zanima nas tudi, kakšen vpliv ima na izhod modela sprememba geometrije, saj je tudi pri meritvah na realnih objektih popolna ponovljivost geometrije skoraj nemogoča. Različne velikosti, oblike in pozicije tumorjev, ter različne debeline pozameznih plasti v modelu imajo za posledico seveda razlike v rezultatih meritev. Zgradili smo dva modela, ki se od osnovnega razlikujeta v:

- debelini plasti kože in podkožnega maščevja (večji kot pri osnovnem modelu); in
- globini, na kateri se nahaja tumor (globlje kot pri osnovnem modelu).

Opazimo kar veliko odstopanje reakcijskega toka na koncu elektroporacije pri modelu s spremenjeno debelino kože in maščobe, kar že spet kaže na to da ti dve zunanji plasti največ prispevata k napaki zaradi svoje "neprevodne" narave ter zunanje lege. Pri modelu poglobljenega tumorja pa je končen tok skozi model po končanem procesu elektroporacije nekoliko manjši kot tok skozi osnovni model. Zaradi globlje lege tumorja je namreč vrednost električnega polja v tumorju nižja kot pri osnovnem modelu s tem pa je nižja tudi stopnja permeabilizacije tumorja. Prevodnosti tumorja in nižje ležečih tkiv se ne povečajo veliko, kar pomeni da tudi prevodnost celotnega modela ostane zadosti nizka. To pa se seveda odraža na nizki vrednosti toka skozi model.

Za popolno verifikacijo modela podkožnega tumorja in modelov potekov elektroporacije posameznih tkiv bi potrebovali še več različnih meritev s natančnimi podatki o geometriji meritev, predvsem na najbolj kritičnih tkivih, kot sta koža in maščoba, za katero nismo imeli na voljo nobenih meritev. Po primerjavi reakcijskih tokov modela z reakcijskimi tokovi meritev na realnih podkožnih tumorjih vidimo, da daje model nekoliko nižje rezultate, kar pomeni da bi se ga z več podatki o odzivih realnih sistemov pod različnimi okoliščinami dalo še izboljšati.

---



---

## Literatura

- [1] Maček-Lebar A., Serša G., Čemažar M., Miklavčič D., Elektroporacija, Medicinski razgledi, 1998, 37:339-354
- [2] Weaver J.C., Chizmadzhev Yu.A., Theory of electroporation: A review, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 41 (1996), 135-160
- [3] Tsong T.Y., Electroporation of cell membranes, Biophysical Journal, Vol. 60, August 1991, 297-306
- [4] DeBruin K.A., Krassowska W., Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential, Biophysical Journal, Vol. 77, September 1999, 1213-1224
- [5] Miklavčič D., Beravs K., Šemrov D., Čemažar M., Demšar F., Serša G., The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues, Biophysical Journal, Vol. 74, May 1998, 2152-2158
- [6] Šemrov D., Analiza in optimizacija porazdelitve električnega polja pri elektrokemoterapiji tumorjev, Doktorska disertacija, Ljubljana, 1998
- [7] EMAS User's manual, Ansoft Corporation, July 1997
- [8] Irons B., Ahmad S., Techniques of finite elements, John Wiley & Sons, NY, USA, 1986
- [9] Šemrov D., Miklavčič D., Numerical modeling for in vivo electroporation, from: Methods in molecular medicine, vol.37: Electrically mediated delivery of molecules to cells, Humana press, NJ, USA, 2000
- [10] Šemrov D., Miklavčič D., Calculation of the electrical parameters in electrochemotherapy of solid tumours in mice, Computers in Biology and Medicine 28 (1998) 439-448
- [11] Tungjitkusolmun S., Woo E.J., Cao H., Tsai J.-Z., Vorperian V.R., Webster J.G., Thermal-Electrical finite element modelling for radio frequency cardiac ablation: effects of changes in myocardial properties, Medical & Biological Engineering & Computing 2000, vol. 38, 562-568
- [12] A. Sinigoj, Osnove elektromagnetike, Založba FE in FRI, 1999
- [13] S Grimnes, O.G.Martinsen, Bioimpedance & Bioelectricity Basics, Academic Press, 2000
- [14] Handbook of biological effects of electromagnetic fields, Charles Polk, Elliot Postow, CRC Press, 1996
- [15] Applied Bioelectricity, From electrical stimulation to electropathology, J. Patrick Reilly, Springer-Verlag New York, 1998

- 
- [16] Geddes L.A. and Baker L.E., 1967, The specific resistance of biological material-a compendium of data for the biomedical engineer and physiologist, *Med. Biol. Eng.*, 5, 271-93
- [17] Schwan H.P. and Kay C.F., Specific resistance of body tissues, *Circ. Res.*, 4, 664, 1956
- [18] B.R. Epstein and K.R. Foster, Anisotropy in the dielectric properties of skeletal muscle, *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 21:1, pp. 51-55, 1983
- [19] Gabriel C., Gabriel S., Compilation of the dielectric properties of body tissues at RF and microwave frequencies, final report on CD ROM, 1996
- [20] Burger H.C. and Van Dongen R., 1960, Specific resistance of body tissues, *Phys. Med. Biol.* 5, 431-47
- [21] Rush S., Abildskov J.A. and McFee R., Resistivity of body tissues at low frequencies, *Circ. Res.*, 12, 40, 1963
- [22] Hart, F.X., The impedance spectroscopy of skeletal muscle, *Zbornik desete Elektrotehniške in računalniške konference ERK 2001*, Vabljeno predavanje, 13-16
- [23] Gabriel C, Gabriel S and Corthout E, 1996, The dielectric properties of biological tissue: I. Literature survey, *Phys. Med. Biol.* 41, 2231-49
- [24] Gabriel S., Lau R.W. and Gabriel C., 1996, The dielectric properties of biological tissue: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20GHz, *Phys. Med. Biol.*, 41, 2251-69
- [25] Gabriel S., Lau R.W. and Gabriel C., 1996, The dielectric properties of biological tissue: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues, *Phys. Med. Biol.*, 41, 2271-93
- [26] Smith S.R., Foster K.R. and Wolf J.L., Dielectric properties of VX-2 carcinoma vs. normal liver tissues, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, BME-33:5, 522-4, 1986
- [27] Surowiec A.J., Stuchly S.S., Barr J.R. and Swarup A., Dielectric properties of breast carcinoma and the surrounding tissues, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* BME-35:4, 257-63, 1988
- [28] Schwan H.P. and Kay C.F., The conductivity of living tissues, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 65, 1007, 1957
- [29] Gielen, F.L.H., Wallinga-de Jonge, W. and Boon, K.L., 1984, Electrical conductivity of skeletal muscle tissue: Experimental results from different muscles in vivo, *Medical and Biological engineering*, 22, 569-577
- [30] Bodakian, B. and Hart, F.X., 1994, The dielectric properties of meat, *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 1, 2, 181-187
- [31] Kaufman W. in Johnston F.D., The Electrical Conductivity of the tissues near the heart and its bearing on the distribution of cardiac action currents, *Am. Heart J.*, 26:42, 1943
- [32] Hemingway A., McLendon J.F., The high frequency resistance of human tissue, *Am. J. Physiol.* 102, 56-59, 1932

- 
- [33] Schwan, H.P., Li K., Capacity and conductivity of body tissues at ultrahigh frequencies, Proc. I.R.E. 41, 1735-40, 1953
- [34] Kinnen E., Kubicek W., Hill P., Turton G., Thoracic cage impedance measurements. (Tissue resistivity in vivo and transthoracic impedance at 100 kc/s) Tech. Doc. Rep. SAM-TDR 64-5, 1964, School of Aerospace Medicine, Brooks AFB, Texas
- [35] Yamamoto T. and Yamamoto Y., 1976, Electrical properties of the epidermal stratum corneum, Med. Biol. Eng., 14:2, 151-8
- [36] Yamamoto T. and Yamamoto Y., 1976, Dielectric constant and resistivity of epidermal stratum corneum, Med. Biol. Eng., 14:5, 494-500
- [37] Pliquett U., Langer R., Weaver J.C., Changes in the passive electrical properties of human stratum corneum due to electroporation, BBA 1239, 1995, 111-121
- [38] Pliquett U., Weaver J.C., Electroporation of human skin: simultaneous measurement of changes in the transport of two fluorescent molecules and in the passive electrical properties, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 39, 1996, 1-12
- [39] Pliquett U., Mechanistic studies of molecular transdermal transport due to skin electroporation, Advanced Drug Delivery Reviews, 35, 1999, 41-60
- [40] Prausnitz M.R., Bose V.G., Langer R., Weaver J.C., Electroporation of mammalian skin: A mechanism to enhance transdermal drug delivery, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90, november 1993, pp. 10504-10508
- [41] Chizmadzhev Y.A., Indenbom A.V., Kuzmin P.I., Galichenko S.V., Weaver J.C., Potts R.O., Electrical properties of skin at moderate voltages: Contribution of appendageal macropores, Biophysical Journal, Vol. 74, februar 1998, 843-856
- [42] Gallo S.A., Oseroff A.R., Johnson P.G., Hui S.W., Characterization of electric-pulse-induced permeabilization of porcine skin using surface electrodes, Biophysical Journal, Vol. 72, junij 1997, 2805-2811
- [43] Bregar Z., Sekvenčne obdelave, dokumentacija programa za popravljanje vhodnih EMAS-ovih datotek, junij 2001
- [44] Cukjati D., Mir L.M., System for follow-up of electroporation process, Voltage/current acquisition during electroporation pulses and time domain impedance estimator, poročilo, november 2001

---