

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ЗАКОНОМІРНОСТІ ТА МЕХАНІЗМИ ЕЛЕКТРИЧНОГО ПРОБОЮ КЛІТИН

О. Стріха*, Є. Смольянінова, Є. Гордієнко

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України
вул. Переяславська, 23, Харків 61015, Україна
e-mail: oksana.strikha@mail.ru*

В огляді літератури викладені сучасні уявлення щодо явища електричного пробою клітинних мембран під дією зовнішнього електричного поля або власного мембранного потенціалу клітин. Розглянуті закономірності цього явища та фактори, які суттєво впливають на нього. Стисло описані деякі напрямки використання електричного пробою біомембран в медицині та біології.

Ключові слова: електричний пробій мембрани, електропорація, електрозлиття мембран, біотехнології.

Електричний пробій біомембран – це явище тимчасової або незворотної дестабілізації в певних ділянках клітинної мембрани при дії на неї імпульсу електричного поля високої інтенсивності, в результаті чого різко зростає електропровідність клітинної мембрани [10]. Явище діелектричного пробою клітинної мембрани, тобто стрибкоподібне збільшення її провідності, було відкрито при вимірюванні вольт-амперної характеристики *Chara Australis* Гольдманом в 40-х роках ХХ сторіччя [29]. Під час дестабілізації клітинна мембрана стає високо проникною не тільки до електролітів, але і до великих молекул. Експериментально встановлено, що електричний пробій клітинних мембран здійснюється шляхом утворення в них наскрізних гідрофільних пор [13, 17, 22, 30, 35, 50]. Саме у результаті утворення в мембрані, порівняно, крупних наскрізних пор, заповнених розчинами електролітів, які контактують з мембраною, електропровідність мембрани при її електричному пробіі значно збільшується. Сукупність накопичених до теперішнього часу експериментальних даних показує, що найбільш імовірним місцем, з якого починає розвиватися електричний пробій мембрани, є не інтегральні білки, не зона контакту між білками і ліпідами, а безпосередньо ліпідний матрикс мембрани [10].

На початку 1980-х років уявлення про утворення мембранних пор посередньо

підтвердилося даними про те, що невеликі молекули, такі, як сахароза, деякі барвники, одно- або двохвалентні іони, які у нормі не проникають в клітини, виявляються в них після дії електричного поля. Одразу після цього електричні імпульси почали застосовувати як спосіб внутрішньоклітинної мікроін'єкції, який можна використовувати для введення у клітини ДНК [21, 31, 47, 54], РНК [14, 26], антитіл [16, 49], флуоресцентних зондів [24] і молекул лікарських речовин [46], за рахунок тимчасового підвищення проникності мембран, при дії на них імпульсів електричного поля [44]. У зв'язку з цим процес електричного пробую клітинних мембран має еквівалентну назву – електропорація.

Здебільшого для експериментального вивчення електричного пробую клітин використовують два методичних підходи: вимірювання електропровідності або проникності клітинних мембран для різних речовин, наприклад, проникності еритроцитів людини для сахарози, яка при нормальних умовах не проникає в ці клітини. Вимірювання електропровідності посередньо дає можливість оцінити змінення кількості пор та (або) їх розміру з часом.

Велика кількість експериментальних робіт присвячена вивченню механізмів електропорації у різних типах мембран, починаючи з ліпідних б'шарів [18] до мембран еритроцитів [17, 34]. Проведені дослідження процесів утворення та зникнення пор в результаті дії електричних імпульсів різної інтенсивності та тривалості [15], кінетики електропорації мембран методом петч–кламп [18], проаналізовано рух іонів і флуоресцентних барвників крізь електропоровані мембрани [30]. Існують данні про трансмембранний потенціал, отримані за допомогою чутливих до різниці потенціалів барвників [19]. Здійснена візуалізація пор методом електронної мікроскопії [30]. Комбінуючи методи кріюфіксації та заморожування–сколювання, в роботі [30] вдалось, з точністю до 1 мілісекунди дослідити динаміку утворення, росту та заліковування пор в мембранах еритроцитів людини після дії на клітини короткого (0,3 мс) радіочастотного імпульсу (100кГц) з амплітудою 300-400 кВ/м. Після дії імпульсів електричного поля на мембранах еритроцитів з'являлись вулканоподібні випинання (з клітини назовні), які до дії електричного поля не спостерігались. У перші мілісекунди діаметр пор не перевищував 2 нм. Знімки круглих вулканоподібних випинань на мембрані, які утворюються після дії на еритроцити радіочастотних імпульсів електричного поля за період часу від 0,5 мс до 10 с, коли імпульс безпосередньо вже не діє на клітини, ілюструють динаміку розвитку і заліковування мембранних пор. За час від 0,5 мс до 20 мс розміри вулканоподібних утворень зростають від 2 до 120 нм. Потім за проміжок часу від 20 мс до кількох секунд розміри пор не змінюються, і мають значення від 20 до 120 нм. Після цього вони починають зменшуватись, так що через 10 с пори зникають, а на їхньому місці в мембрані

спостерігаються тільки невеличкі заглиблення, які з плином часу поступово також зникають. Слід підкреслити, що розміри пор, які спостерігаються за допомогою даного методу, значно перевищують розміри пор, які передбачаються переважною кількістю теоретичних досліджень. Іноді ця невідповідність, а також вулканоподібна форма отворів у мембрані, які спостерігаються методом електронної мікроскопії, пояснюються дією потоку внутрішньоклітинних компонентів в зовнішнє середовище, тобто вторинним ефектом [28]. Проте, цей ефект не пов'язаний з рухом води крізь пори, які утворились в результаті електричного пробою, оскільки такий же ефект має місце і у гіпотонічних розчинах, коли потік води спрямований не назовні, а в середину клітин. Можливою причиною вулканоподібних випинань мембрани в області пор, автор роботи [28] вважає спрямований з клітин назовні потік молекул гемоглобіну, що узгоджується з частковим виходом гемоглобіну з клітин біля мембранних пор.

У роботі К. Kinosita [30] досліджено трансмембранний потенціал, який виникає при дії зовнішнього електричного поля на клітинній мембрані яйцеклітин морських їжаків. Візуалізація розподілу трансмембранного потенціалу подовж поверхні мембрани здійснювалась за допомогою потенціал залежного флуоресцентного барвника, який зв'язується з мембраною. У вказаній роботі використовувався барвник RH292, інтенсивність флуоресценції якого зростає при позитивному і зменшується при негативному трансмембранному потенціалі. За відсутності зовнішнього поля спостерігалось однорідна інтенсивність флуоресценції. При дії імпульсу електричного поля інтенсивність флуоресценції за 2 мкс підвищувалась на боці мембрани, наближеному до позитивного електроду, тоді як на боці, наближеному до негативного електроду, вона зменшувалась. Величина трансмембранного потенціалу, експериментально визначена за інтенсивністю флуоресценції досягає значення 0,75 В приблизно за 10 мкс.

За напруги діючого на яйцеклітину морського їжа електричного поля, що дорівнює $4 \cdot 10^4$ В/м, розрахована максимальна величина трансмембранного потенціалу складає біля 3В, проте в процесі експериментів така величина мембранного потенціалу не досягається. Коли мембранний потенціал сягає критичної величини біля 1 В, у мембрані виникають пори і вона починає проводити струм, внаслідок чого подальше зростання мембранного потенціалу зупиняється – його значення деякий час утримується біля критичної величини. При цьому інтенсивність флуоресценції, яка спостерігається, в кілька разів перевищує очікувану у відповідності до (1) величину, і тільки в областях мембрани, прилеглих до електродів, зміни є малими. За 2 мс число пор починає зменшуватись, і як наслідок, інтенсивність флуоресценції падає.

Експерименти показують [48], що проникність мембрани, в якій утворилися пори, для

іонів у верхньому та нижньому полюсах мембрани не зовсім однакова. Це пояснюється тим, що на одному з полюсів мембранний потенціал спокою сумується з потенціалом, який індукує зовнішнє електричне поле, а на протилежному полюсі віднімається.

Процес електропорації, значною мірою, залежить від ліпідного складу мембрани, що свідчать про дані вимірювання різних мембран при їх електричному пробі. Крім того, наявність у клітини глікокаліксу та цитоскелету, можливо, також модулює відповідь клітини на електричний імпульс. Так, наприклад, показано, що у випадку мембрани еритроциту глікокалікс підвищує, а натяг цитоскелету зменшує імовірність електропорації.

Експериментально встановлено, що проникність мембрани є максимальною при температурі, за якої одна половина ліпідів знаходиться в транс – конформації, а друга в цис– конформації. При цьому, іони проходять крізь дефекти бішару [1].

Електричне поле також може спричинити фазове перетворення в біомембранах. Події на молекулярному рівні, які відбуваються при дії поля, пов'язані з різними видами руху молекул у бішарі. Транс / цис ізомеризація $\text{CH}_3\text{--CH}_3$ відбувається за 5 нс. Дефект у бішарі виникає, коли у сусідніх ліпідних молекулах виникають кінк–формації. Цей процес триває біля мікросекунди. Інші види руху – латеральна дифузія і фліп–флоп переходи – тривають від декількох годин до кількох діб.

Обертання ліпідів відбувається упродовж нано– або мікросекунд. Утворення пор, яке зумовлене наявністю достатньо великого мембранного потенціалу відбувається на існуючих дефектах ліпідного бішару. Крізь утворену малу пору починає протікати електричний струм, який викликає локальний нагрів. Розмір пори зростає на протязі 50 мкс, після припинення дії поля, розмір пори зменшується.

Наприкінці 1990-х років в результаті надзвичайно точних вимірювань електропровідності бішарових ліпідних мембран була зареєстрована поява поодиноких пор, які виникають в цих мембранах внаслідок їх електричного пробі.

Як відомо, за нормальних, для життєдіяльності клітин умов клітинні мембрани мають унікальні електроізолюючі властивості. Їх електропровідність є близькою до значення $5 \times 10^{-7} \text{С/м}$ і на кілька порядків перевищує електропровідність оточуючих мембрану водних розчинів електролітів [20, 44]. Типове значення трансмембранної напруги, за якої різко падає електричний опір біологічних мембран, як правило, перевищує напругу пробію рідких ізоляторів, які використовуються у техніці, зокрема рідких вуглеводневих плівок, товщина яких дорівнює товщині мембранних бішарів [10]. Оскільки домішки води та електролітів у вуглеводневій плівці суттєво знижує напругу її пробію, можна стверджувати, що біомембрани в живих клітинах функціонують на межі умов, які ведуть до їх електричного пробію, навіть при типових нормальних значеннях мембранного потенціалу. Наприклад, у

нормі на внутрішніх мембранах енергизованих мітохондрій деяких прісноводних водоростей і бактерій перепад електричного потенціалу складає біля 200 мВ і є співмірним з потенціалом пробою цих мембран, а саме, є нижче потенціалу пробою, лише, на 20–30 мВ [4]. Ризик електричного пробою клітин, який виникає при цьому, навіть за відсутності дії зовнішніх несприятливих факторів, напевно, є виправданим, бо енергія, яку клітина запасє у вигляді мембранного потенціалу, використовується клітиною для реалізації багатьох життєво важливих функцій, таких, наприклад, як передача інформації, клітинне дихання, рецепція та механічна робота.

Первісною причиною, яка веде до утворення пор у мембрані при дії на неї електричного поля, вважається виникнення достатньо великого і тривало діючого трансмембранного перепаду електричного потенціалу. Електричний пробій біомембран можливо викликати штучно, діючи на клітини зовнішнім електричним полем [41, 52]. При цьому зовнішнє поле індукує додатковий трансмембранний перепад потенціалу електричного поля, яке підсумовується зі звичайним мембранним потенціалом і може привести до електричного пробою мембрани. Якщо сферичну клітину з радіусом R розташувати між двома плоскими паралельними електродами, різниця потенціалів і відстань між якими дорівнюють L і $\Delta\psi$, то через невеликий проміжок часу, в області двох полюсів клітини, виникає індукована зовнішнім полем трансмембранна напруга [36].

$$\Delta\psi_m \approx \frac{3RA\phi}{2L} \frac{\sigma_{out} [3hR^2\sigma_m + (3h^2R - h^3)(\sigma_m - \sigma_m)]}{[R^2(\sigma_m + 2\sigma_{out})(\sigma_m + \sigma_{out}) - (R-h)^2(\sigma_{out} - \sigma_m)]}$$

де σ_{in} , σ_m і σ_{out} – електропровідність цитоплазми, клітинної мембрани і позаклітинної речовини відповідно, h – товщина мембрани. В наближенні $\sigma_m \rightarrow 0$ $\Delta\psi_m \approx \frac{3RA\phi}{2L}$. Таким чином, для того, щоб величина індукованого зовнішнім електричним полем перепаду трансмембранного потенціалу була близькою до величин, за яких відбувається електричний пробій клітинної мембрани ($\approx 0,5$ В), до електродів, які створюють зовнішнє поле, необхідно прикласти різницю потенціалу (при $R=10$ мкм і $L=10^{-2}$ м, L – відстань між електродами) порядку 1 кВ. Для створення на електродах настільки великих потенціалів електричного поля використовуються спеціальні пристрої – електропоратори, які генерують короткі (від 10 мкс до 10 мс) імпульси електричного поля з амплітудою до 10 кВ [12].

В залежності від умов здійснення електропорації, вона може бути зворотною або незворотною. При зворотній електропорації мембранні пори, які виникають при дії зовнішнього електричного поля, після його відключення спонтанно заліковуються, електропровідність мембран відновлюються до вихідних значень [15, 43]. Якщо напруга зовнішнього електричного поля, яка дія на клітини, є достатньо великою та діє електричного поля на клітини є достатньо тривалою, електричний пробій клітин стає незворотнім і клітини

гинуть [7]. Явище незворотного електричного пробоя клітин є основою одного з напрямків практичного застосування цього явища і використовується для стерилізації харчових продуктів, живильних середовищ для культивування клітин і тканин та інших розчинів [37, 39]. З іншого боку, зворотне електропорушення в імпульсному електричному полі все ширше використовується не як спосіб деструкції клітин, а як складова біологічних і медичних технологій, наприклад, в генній терапії [10, 38]. Застосування електропорушення може бути для цілеспрямованого блокування певних клітинних епітопів високо специфічними антитілами, які потрапляють всередину клітин в результаті їх електропорації [16, 49], для трансдермального переносу лікарських речовин в організм людини [2, 32] для обробки клітин *ex vivo* впродовж операції, зокрема для завантаження еритроцитів молекулами речовин, які змінюють спорідненість кисню до гемоглобіну, шляхом електропорації клітин у проточній системі з наступним поверненням обробленої крові в організм [42].

Ще одним ефектом, до якого призводить дія імпульсів електричного поля на клітини, є злиття клітин (так зване електрозлиття) [23, 25]. Наразі метод електрозлиття вважається найбільш придатним при проведенні досліджень в галузі клітинної інженерії [8, 9]. В основі процесу електрозлиття двох клітинних мембран у зоні їх контакту лежить незворотна електропорація цієї зони мембран під дією імпульсів зовнішнього електричного поля [51]. Вважається, що при злитті двох контактуючих клітин електричний пробій мембран виникає у двох ділянках мембран обох клітин, які найближче розташовані до електродів, і в двох ділянках мембран в зоні контакту між клітинами. При цьому, в ділянках клітинних мембран, які близько розташовані до електродів, електропорація є зворотнім процесом, а в зоні контакту між клітинами – незворотнім.

Реконструйовані шляхом електрозлиття клітини, що створені з ядра та цитоплазми різного походження, може використовуватися для рішення таких найважливіших загально біологічних проблем як: з'ясування механізмів реалізації генетичної інформації та ролі позаядерної спадковості для розвитку, взаємодії ядра з цитоплазмою та мембранними рецепторами; тотипотентність генома клітин на різних рівнях їх диференціювання; програмування геному; клонування цінних для сільського господарства особин та рослин; отримання гібридних тварин і міжвидових химер шляхом формування реконструйованих зигот і ранніх ембріонів [40]. Створення міжклітинних і міжвидових химер шляхом заміни ядра в одній із клітин на стадії двох еластомерів, може сприяти подоланню несумісності реципієнта та донора при міжвидовій трансплантації ембріонів [27], у тому числі, з використанням генетичної інформації кріоконсервованих геномів. Оскільки хромосоми, як правило, є більш стійкими до процедури заморожування – відтаювання, ніж клітинні мембрани [3], з точки зору збереження

генетичних ресурсів Землі, перспективною є пересадка хромосом із кріоконсервованих клітин в енуклеювані зиготи, другого близького виду. При цьому слід підкреслити, що метод електрозлиття клітин має суттєві переваги, у порівнянні з іншими (за допомогою поліетиленгліколю або вірусу Сендай) методами злиття клітин. По-перше, як показано, наприклад, у роботах [53], при електрозлитті клітин геном не пошкоджується, що підтверджується даними щодо нормального ембріонального розвитку реконструйованих ембріонів від зиготи до дорослої особини [11]. По-друге, метод електрозлиття клітин є більш універсальним та простим, ніж інші методи [33]. По-третє, метод електрозлиття є неінвазивним та менш токсичним, ніж інші, оскільки його використання не супроводжується прониканням у середину клітин хімічних факторів, які викликають злиття клітин [12].

Як правило, інтерпретація експериментальних даних і пошук універсальних закономірностей електропорації спирається на ті чи інші теоретичні моделі окремих стадій цього явища. Ці теоретичні моделі можна поділити на дві групи. Моделі першої групи фокусуються на динаміці процесів утворення і розвитку пор у часі, а розподіл електричного потенціалу і щільність пор вздовж поверхні мембрани розглядається дуже спрощено. Моделі другої групи, навпроти, враховують розподіл вздовж поверхні клітинної мембрани електричного потенціалу та, в деяких випадках, трансмембранного потенціалу, але динаміка процесу не розглядається.

В основі термодинамічних кількісних моделей електричного пробою клітин лежить розрахунок вільної енергії мембрани клітини як функції радіуса мембранної пори у зовнішньому сталому однорідному електричному полі.

Утворення круглої пори в мембрані збільшує вільну енергію мембрани на величину $\Delta F_1 = 2\pi a\gamma$, що пов'язано з необхідністю затратити роботу на утворення границі поділу фаз між водним розчином, який заповнює пору, та ліпідно-білковою частиною мембрани. Ця робота є пропорційною довжині кромки пори $2\pi a$. Коефіцієнт пропорційності – вільна енергія одиниці довжини кромки пори. Величина цього коефіцієнту для різних біологічних мембран змінюється у межах від $0,3 \cdot 10^{-11}$ Н до $2 \cdot 10^{-11}$ Н [10]. З іншого боку, при утворенні в мембрані круглої пори з радіусом a , яка заповнена сумішшю поза- та внутрішньоклітинного водних розчинів, вільна енергія мембрани зменшується на величину [7]

$$\Delta F_e = \frac{1}{2} \frac{\pi a^2}{h} \varepsilon_0 \varepsilon_m \left(\frac{\varepsilon_w}{\varepsilon_m} - 1 \right) \Delta \psi_m^2,$$

де h – товщина клітинної мембрани, ε_0 – електрична стала, яка дорівнює $8,854 \cdot 10^{-12}$ Кл²/м²·Н, ε_m і ε_w відносна діелектрична провідність мембрани та і водного розчину, який

заповнює мембранну пору, $\Delta\psi_m$ – мембранний потенціал у точці утворення пори. Оскільки $\varepsilon_m \approx 2$ і $\varepsilon_w \approx 80$, то $\Delta F_e \leq 0$, так що у відповідності до термодинамічного принципу мінімуму вільної енергії зростання (за абсолютною величиною) трансмембранного перепаду електричного потенціалу сприяє утворенню пор у мембрані при її електропорації [7, 10].

На рис. 1 подано вид залежності вільної енергії мембрани клітини від радіуса мембранної пори у зовнішньому сталому однорідному електричному полі. Як видно пори

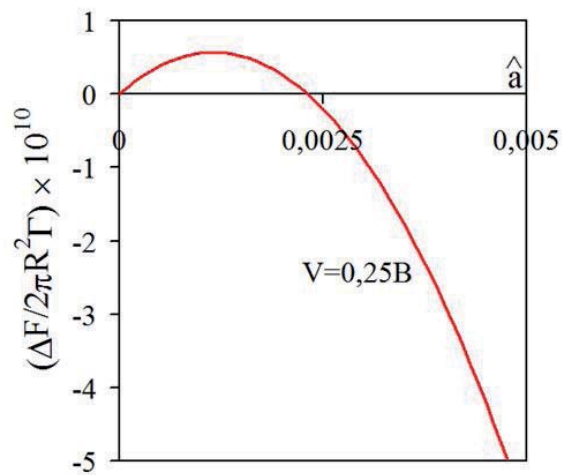


Рис. 1. Залежність вільної енергії мембрани від приведенного радіуса мембранної пори \hat{a} при заданому мембранному потенціалі.

малого радіусу в силу термодинамічного принципу мінімуму вільної енергії мають тенденцію до зникнення, а пори з радіусом $\hat{a} > \hat{a}_{кр}$, який перевищує критичний розмір не зворотно збільшуються, що призводить до розриву мембрани.

Збільшення трансмембранної різниці потенціалів веде до зменшення критичного радіуса пори

$$a_{кр} = \frac{2\gamma h}{\varepsilon_0 \varepsilon_m \left(\frac{\varepsilon_s}{\varepsilon_m} - 1 \right) R \Delta\psi_m^2}$$

та висоти енергетичного бар'єру.

$$\Delta F^* = \frac{2\pi\gamma^2 h}{\varepsilon_0 \varepsilon_m \left(\frac{\varepsilon_s}{\varepsilon_m} - 1 \right) \Delta\psi_m^2} = \frac{\pi\gamma^2}{\Delta C_m \Delta\psi_m^2}. \quad (1)$$

Як видно, наявність трансмембранного перепаду електростатичного потенціалу на мембрані, у тому числі і мембранного потенціалу спокою, знижує висоту енергетичного бар'єру, який за рахунок теплових флуктуацій повинна подолати мембрана для утворення в ній термодинамічно стабільної пори

Деякі вчені вважають [1, 5], що електричний пробій мембран є універсальним механізмом порушення їх бар'єрної функції при різних патологіях або стресових станах живої клітини [5]. При цьому пробій мембрани здійснюється не в результаті дії на неї зовнішнього електричного поля, а власним мембранним потенціалом, коли діелектрична проникність і стабільність ліпідного бішару зменшуються, наприклад, внаслідок перекисного окислення мембранних ліпідів, охолодження, змінення концентрації у позаклітинному середовищі іонів, які визначають трансмембранний потенціал, наприклад, іонів хлору або водню [1]. Усі ці фактори діють на клітини упродовж їх низькотемпературного консервування [6]. Враховуючи той експериментальний факт, що дія електричного самопробою та заморожування ліпідних бішарів є адитивною [1], можна стверджувати, що в процесі низькотемпературного консервування клітин електричний пробій клітинних мембран є одним з механізмів кріопшкодження.

Виявилось, що заморожування бішару викликає підвищення його поверхневого натягу. Для гідрованого яєчного лецитину коефіцієнт поверхневого натягу кромки пори при заморожуванні зростає від значення $11,1 \cdot 10^{-3}$ до $5,6 \cdot 10^{-3}$ Н/м. Цей ефект сприяє електропорації клітинних мембран при заморожуванні клітинної суспензії. За відсутності дії зовнішніх факторів у рідкокристалічному стані критичний радіус пор в мембранах сягає 9 нм, що приблизно дорівнює товщині мембрани. Таким чином, ймовірність механічного розриву клітинної мембрани у фізіологічних умовах або в області температур, які перевищують температуру фазового перетворення ліпідного бішару з рідкокристалічного в твердий стан є дуже малою. Але будь яка дія механічної, фізичної або хімічної природи, яка впливає на поверхневий натяг ліпідного бішару, є потенційно ризикованою щодо порушення стабільності мембран, які містять пори. Вміст потенціалутворюючих іонів в оточуючому клітину розчині підвищується при утворенні кристалів льоду у переохолодженій клітинній суспензії. При цьому мембранний потенціал на цитоплазматичних мембранах клітин або на мембранах мітохондрій може перевищити рівень, необхідний для здійснення електричного пробою цих мембран. Напевно цей ефект пояснює негативну дію переохолодження клітинної суспензії при її заморожуванні на життєздатність клітин і зумовлює доцільність використання процедури сидингу в процесі заморожування клітинної суспензії.

Електричний пробій мембран є універсальним механізмом порушення бар'єрної функції мембран. Самопробій електричним полем може бути однією з головних причин

біологічної смерті клітин при екстремальних умовах. Як відомо, в процесі заморожування клітинної суспензії рН позаклітинного розчину зменшується, внаслідок чого також змінюється і рН внутрішньоклітинного розчину. В свою чергу ця зміна рН здатна призвести до електричного пробоя мітохондрій, мембранний потенціал яких зумовлений трансмембранним перепадом концентрації іонів водню і навіть у нормі є аномально високим.

Слід звернути увагу на те, що при перетворенні клітинної мембрани із рідкокристалічного стану в твердий гелеподібний стан, площа поверхні мембрани зменшується на кілька відсотків. При цьому у локальних ділянках мембрани виникає її ізотропний натяг, що сприяє утворенню пор у мембрані, оскільки енергетичний бар'єр, який необхідно подолати системі для утворення пори, при цьому зменшується.

Хоча наразі теоретичне та експериментальне вивчення електричного пробоя біологічних мембран і пов'язаних з ним процесів досягло значних успіхів [6], залишаються незрозумілими деякі закономірності цього явища. Наприклад, залишається відкритим питання, як молекули ДНК, діаметр яких у стані статистичного клубка сягає 2000 нм, або антитіла, молекулярна маса яких сягає значення 180 000, проникають усередину клітин в процесі електропорації цитоплазматичної мембрани клітин, тоді як теоретична оцінка критичного розміру пори, за якого виникає незворотне руйнування мембрани, не перевищує 10 нм, а експериментальні дані, хоч і свідчать про можливість утворення при електропорації мембран пор з розміром до 120 нм [30], також не повністю пояснюють цей феномен. Немає ясного розуміння, чому при одних умовах здійснюється зворотний електричний пробій клітинних мембран, а при інших – незворотний. Теоретичні моделі електропорації клітин неповністю враховують ефекти, пов'язані з деформацією клітинних мембран, яка виникає в результаті утворення в мембрані наскрізних гідрофільних пор. Таким чином, узагальнюючи наведені вище міркування, можна стверджувати, що подальше теоретичне та експериментальне вивчення електричного пробоя клітинних мембран є актуальним і перспективним для вирішення загальнобіологічних проблем і створення нових біомедицинських технологій, а також для розуміння пов'язаних з електропорацією механізмів пошкодження клітин в процесі їх низькотемпературного консервування та способів запобігання цих пошкоджень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонов В. Ф., Смирнова Е. Ю., Шевченко Е. В. Липидные мембраны при фазовых превращениях. М.: Наука, 1992. 135 с.
2. Безуглый А. П. Аквафорез – возможность неинвазивной мезотерапии // Нувель эстетик. 2008. № 6. С. 170–179.

3. *Вепринцев Б. Н., Ротт Н. Н.* Консервация генетических ресурсов // Природа. 1978. № 11. С. 10–21.
4. *Владимиров Ю. А., Парнев О. М., Аннабердыева Е. А.* и др. Электрическая прочность мембран митохондрий // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. № 4. С. 428–434.
5. *Владимиров Ю. А.* Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз // Биол. мембраны. 2002. Т. 19. № 5. С. 356–377.
6. *Гордиенко Е. А., Пушкарь Н. С.* Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. К.: Наук. думка, 1994. 140 с.
7. *Гордієнко Є. О., Товстяк В. В.* Фізика біомембран. К.: Наук. думка, 2009. 272 с.
8. *Зеленин Л. В., Куц А. А., Прудовский И. А.* Реконструированная клетка. М.: Наука, 1982. 206 с.
9. *Маленко Г. П., Комиссаров А. В., Степанов О. И.* Развитие *in vitro* реконструированных эмбрионов крупного рогатого скота, активированных в разные сроки после электрослияния // Изв. РАН. 2010. № 5. С. 527–534.
10. *Маркин В. С., Чизмаджев Ю. А.* Индуцированный ионный транспорт. М.: Наука, 1974. 251 с.
11. *Чайлахян Л. М., Вепринцев Б. Н., Свиридова Т. А.* Электростимулируемое слияние клеток в клеточной инженерии // Биофизика. 1987. Т. 32. Вып. 5. С. 29.
12. *Яковенко С. А., Форсберг Э. Дж., Бешихаузер Дж. М.* Пермеабиллизация клеточных мембран электрическими импульсами программируемой формы // Биофизика клетки. 2004. Т. 49. Вып. 1. С. 79–87.
13. *Abidor I. G., Sowers A. E.* Kinetics and mechanism of cell membrane electrofusion // Biophys. J. 1992. Vol. 61. N 6. P. 1557–1569.
14. *Auer D., Brandner G., Bodemer W.* Dielectric breakdown of the red blood cell membrane and uptake of SV 40 DNA and mammalian cell RNA // Naturwissenschaften. 1976. Vol. 63. N 8. P. 391–393.
15. *Benz R., Conti F.* Reversible electric breakdown of squid giant axon membrane // Biochim. Biophys. Acta. 1981. Vol. 645. N 1. P. 115–123.
16. *Berglund D. L., Starkey J. R.* Isolation of viable tumor cells following introduction of labeled antibody to an intracellular oncogene product using electroporation // J. Immunol. Methods. 1989. Vol. 125. N 1–2. P. 79–87.
17. *Chang D. C., Reese T. S.* Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy // Biophys. J. 1990. Vol. 58. N 1. P. 1–12.
18. *Chernomordik L. V., Chizmadzhev Yu. A., Pastushenko V. F.* et al. Electric breakdown of bilayer membranes: I. The main experimental facts and their qualitative discussion.

- Bioelectrochem. Bioenerg. 1979. Vol. 6. P. 37–52.
19. *Chernomordik L. V., Sukharev S.I., Popov S.* et al. The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies // *Biochim. Biophys. Acta.* 1987. Vol. 902. N 3. P. 360–373.
 20. *Cole K. S.* Membranes, ions and impulses. A chapter of classical biophysics – California University of California Press, Ltd. London, 1972. 569 p.
 21. *Collombet J. M., Wheeler V. C., Vogel F.* Introduction of plasmid DNA into isolated mitochondria by electroporation: A novel approach toward gene correction for mitochondrial disorders // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. N 8. P. 5342–5347.
 22. *Coster H. G. L., Zimmermann U.* Direct demonstration of dielectric breakdown in the membranes of *Valonia utricularis* // *Z. Naturforsch.* 1975. Vol. 30. P. 77–79.
 23. *Donovan A., Isaac S., Collin H. A.* Electrofusion of plant cells // *Methods Mol. Biol.* 1990. Vol. 6. P. 373–379.
 24. *Djuzenova S. C., Zimmermann U., Frank H.* et al Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electropermeabilized myeloma cells // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. Vol. 1284. N 2. P. 143–152.
 25. *Elsheikh A. S., Takahashi Y., Tanaka H.* et al. Electrofusion of zona-free mouse embryonic cells in electrolytes and their development *in vitro* // *Jpn. J. Vet. Res.* 1995. Vol. 43. N 3–4. P. 125–134.
 26. *Estevez A. M., Thiemann O. H., Alfonzo J. D.* et al. T7 RNA polymerase-driven transcription in mitochondria of *Leishmania Tarentolae* and *Trypanosome Brusei* // *Mol. Biochem. Parasitol.* 1999. Vol. 103. N 2. P. 251–259.
 27. *Finaz C., Lefevre A.* Electrofusion. A new, highly efficient technique for generating somatic cell hybrids // *Exp. Cell Res.* 1984. Vol. 150. N 2. P. 477–482.
 28. *Glaser R. W., Leikin S. L., Chernomordik L. V.* et al. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores // *Biochim. Biophys. Acta.* 1988. Vol. 940. N 2. P. 275–287.
 29. *Goldman D. E.* Potential, impedance and rectification in membranes // *J. Gen. Physiol.* 1943. Vol. 27. N 1. P. 37–50.
 30. Guide to electroporation and electrofusion / Edited by D. C. Chang, B. M. Chassy, J. A. Saunders, A. E. Sowers. London, Academic Press, Inc. 1992. 571 p.
 31. *Heller R., Jaroszeski M., Atkin A.* et al. *In vivo* gene electroinjection and expression in rat liver // *FTBS Lett.* 1996. Vol. 389. N 3. P. 225–228.
 32. *Hochedlinger K., Jaenisch R.* Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy // *N. Engl. J. Med.* 2003. Vol. 349. N 3. P. 275–286.

33. *Illmensee K.* Biotechnology in reproductive medicine // *Differentiation*. 2002. Vol. 69. P. 167–173.
34. *Kinosita K., Tsong T. Y.* Voltage-induced pore-formation and hemolysis of human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta*. 1977. Vol. 471. P. 227–242.
35. *Kinosita K., Ashikawa I., Saita N.* et. al. Electroporation of cell membrane visualized under a pulsed-laser fluorescence microscope // *Biophys. J.* 1988. Vol. 53. N 6. P. 1015–1019.
36. *Kotnik T., Miklavčič D.* Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells // *Biophys. J.* 2000. Vol. 79. P. 670–679.
37. *Lubicki P., Jayaram S.* High voltage pulse application for the destruction of the Gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica* // *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1997. Vol. 43. P. 135–141.
38. *Mir L. M., Bureau M. F., Gehl J.* et al. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. Vol. 96. N 8. P. 4262–4267.
39. *Mosqueda-Melgar J., Elez-Martínez P., Raybaudi-Massilia R. M.* et al. Effects of pulsed electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid foods: a review // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2008. Vol. 48. N 8. P. 747–759.
40. *Ogura A., Inoue K., Takano K.* et al. Birth of mice after nuclear transfer by electro fusion using tail tip cells // *Mol. Reprod. Dev.* 2000. Vol. 57. N 1. P. 55–59.
41. *Pliquett U., Joshi R. P., Shidhara V.* et al. High electrical field effects on cell membranes // *Bioelectrochem.* 2007. Vol. 70. N 2. P. 275–282.
42. *Potter H.* Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation // *Anal. Biochem.* 1988. Vol. 174. N 2. P. 361–373.
43. *Powell K. T., Morgenthaler A. W., Weaver J. C.* Tissue electroporation: observation of reversible electrical breakdown in viable frog skin // *Biophys. J.* 1989. Vol. 56. N 6. P. 1163–1171.
44. *Pucihar G., Kotnik T., Miklavcic D.* et al. Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electroporabilized cells // *Biophys. J.* 2008. Vol. 95. N 6. P. 2837–2848.
45. *Repin V. S., Saburina I. N., Sukhikh G. T.* Cell biology of fetal tissues and fundamental medicine // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007. Vol. 144. N 1. P. 108–117.
46. *Rols M. P.* Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells // *Biochim Biophys Acta*. 2006. Vol. 1758. N 3. P. 423–428.
47. *Rols M. P.* Mechanism by which electroporation mediates DNA migration and entry into cells and targeted tissues // *Methods Mol. Biol.* 2008. Vol. 423. N 1. P. 19–33.
48. *Rossignol D. P., Decker G. L., Lennarz W. J.* et al. Induction of calcium-dependent, localized cortical granule break-down in sea-urchin eggs by voltage pulsation // *Biochim. Biophys*

- Acta. 1983. Vol. 763. P. 346–355.
49. *Rui M. Chen Y., Zhang Y.* et al. Transfer of anti-TFAR19 monoclonal antibody into HeLa cells by in situ electroporation can inhibit the apoptosis // *Life Sci.* 2002. Vol. 71. N 15. P. 1771–1778.
50. *Teissie J.* Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of?) knowledge // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1724. N 3. P. 270–280.
51. *Tsong.T. Y.* Electroporation of cell membrane // *Biophys. J.* 1991. Vol. 60. N 2. P. 297–306.
52. *Weaver J. C., Chizmadzhev Yu. A.* Theory of electroporation: a review // *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1996. Vol. 41. N 2. P. 135–160.
53. *Wong T. K., Neumann E.* Electric field-induced gene transfer // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982. Vol. 107. P. 584–587.
54. *Zewert T. E. Pliquett U. F., Langer R.* et al. Transdermal transport of DNA antisense oligonucleotides by electroporation // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1995. Vol. 212. N 2. P. 286–292.

Стаття: надійшла до редакції 12.05.14

доопрацьована 10.09.14

прийнята до друку 11.09.14

MODERN CONCEPTION OF REGULARITY AND MECHANISMS OF CELL MEMBRANE ELECTRIC BREAKDOWN

O. Strikha, E. Smolyaninova, E. Gordienko

The Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine

23, Pereyaslivska St., Kharkiv 61015, Ukraine

e-mail: oksana.strikha@mail.ru

This review focus on modern conception of cell membrane electric breakdown phenomenon under electric field action as well as cell membrane potential. Regularity of this phenomenon and factors that essentially affect it are considered. Some diractions of biomembrane electric breakdown using in biology and medicine are briefly described.

Keywords: membrane electrical breakdown, electroporation, membrane electrofusion, biotechnologies.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ЗАКОНОМЕРНОСТЯХ И МЕХАНИЗМАХ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПРОБОЯ КЛЕТОК

О. Стриха, Е. Смольянинова, Е. Гордиенко

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23, Харьков 61015, Украина
e-mail: oksana.strikha@mail.ru*

В обзоре литературы изложены современные представления о явлении электрического пробоя клеточных мембран под действием внешнего электрического поля или собственного мембранного потенциала клеток. Рассмотрены закономерности этого явления и факторы, которые существенно влияют на него. Кратко описаны некоторые направления использования электричного пробоя биомембран в медицине и биологии.

Ключевые слова: электрический пробой биомембран, электропорация, электрослияние мембран, биотехнологии.

УДК 535.3-026

ФОТОДИСОЦІАЦІЯ МОЛЕКУЛ ОКСИ- ТА КАРБОКСИГЕМОГЛОБІНУ В АРТЕРІАЛЬНІЙ КРОВІ

С. Мамілов^{1*}, С. Єсьман¹, І. Глебова²

*¹Институт прикладних проблем фізики і біофізики НАН України
вул. Василя Степанченка, 3, Київ 03680, Україна
e-mail: tamilov@mail.ru*

*²Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601, Україна*

В роботі наведено результати досліджень взаємодії лазерного випромінювання з окси- та карбоксигемоглобіну. Показано, що під дією черезшкірного опромінювання відбувається процес фотодисоціації окси- та карбоксигемоглобіну. Досліджено залежність величини фотодисоціації від довжини хвилі падаючого випромінювання. Показано, що квантовий вихід лазерно стимульованої фотодисоціації карбоксигемоглобіну вищий ніж для оксигемоглобіну.

Ключові слова: фотодисоціація, лазерне випромінювання, оксигемоглобін, карбоксигемоглобін.