

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za elektrotehniko

Matej Kranjc

Napetostni preklopnik za mikroelektrode pri elektrogenski transfekciji

Seminarska naloga

pri predmetu
Elektronska vezja

V Ljubljani, december 2006

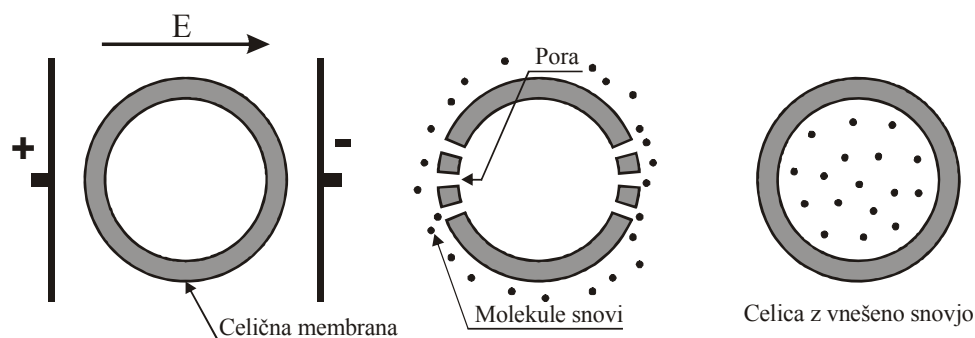
KAZALO

1	UVOD.....	5
1.1	Napetostni preklopnik pri elektrogenski transfekciji.....	5
1.1.1	Vloga amplitude napetostnih pulzov	6
1.1.2	Vloga dolžine in frekvence napetostnih pulzov	6
1.1.3	Vloga menjave polaritete napetostnih pulzov	7
1.2	Uporaba elektrogenske transfekcije na koži.....	7
1.3	Izhodišča in namen naloge	9
2	MATERIALI IN METODE	11
2.1	Močnostni krmilnik IR2104	11
2.2	Napetostni preklopnik.....	13
2.3	Sistem Angioskin.....	16
3	REZULTATI	20
3.1	Preizkus močnostnega krmilnika IR2104.....	20
3.1.2	Odvisnost napajalnega toka glede na vhodno frekvenco krmilnega signala	21
3.1.3	Zakasnitev in popačenje tranzistorjev	23
3.2	Preizkus napetostnega preklopnika	25
3.2.1	Odvisnost ojačenja oziroma slabljenja vhodnega signala glede na frekvenco vhodnega signala	25
3.2.2	Odvisnost napajalnega toka glede na vhodno frekvenco signala	26
3.3	Preizkus napetostnega preklopnika v sistemu Angioskin	27
3.3.1	Visokonapetostno območje sistema Angioskin.....	27
3.3.2	Nizkonapetostno območje sistema Angioskin.....	31
3.3.3	Vlak nizkonapetostnih in visokonapetostnih pulzov	37
3.3.4	Preizkus vklapljanja različnih izhodov napetostnega preklopnika.....	38
4	RAZPRAVA.....	39
5	ZAKLJUČEK	41
	LITERATURA	42
	DODATEK.....	45

1 UVOD

1.1 Napetostni preklopnik pri elektrogenski transfekciji

Elektrogenska transfekcija je metoda, pri kateri s pomočjo električnih pulzov vnašamo genski material v celice. Delovanje elektrogenske transfekcije temelji na elektroporaciji (slika 1.1). Metoda se je izkazala za uspešno pri vnosu genov v celice v *in vitro* ter *in vivo* pogojih [Mir, 2000, Miklavčič et Kotnik, 2004]. Eden izmed prvih raziskovalcev, ki je opisal pojav elektrogenske transfekcije, je bil Eberhard Neumann s sodelavci [Neumann *et al.*, 1982]. Predpostavil je, da genski material (DNK) ob električnem polju zdrsne skozi mikroskopske pore v notranjost celice. Tudi kasnejše raziskave opisujejo podobna predvidevanja, le da so bolj natančna pri opisu nastajanja por in mehanizmu prehajanja DNK skozi celično membrano [Klenchin *et al.*, 1991; Sukharev *et al.*, 1992; Hristova *et al.*, 1997].



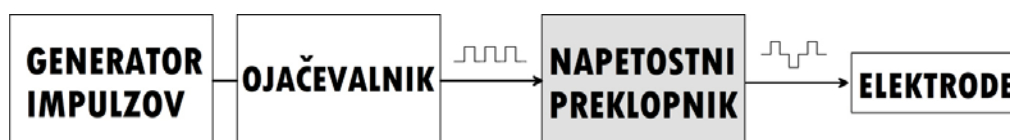
Slika 1.1 Prikaz reverzibilne elektroporacije. S pomočjo električnih pulzov ustvarimo med elektrodama električno polje. Posledica je povečana prepustnost celične membrane, skozi katero lahko prehajajo nekatere molekule (npr. DNA in proteini). Povzeto po [Puc, 1998].

Glavna vloga napetostnega preklopnika je upravljanje z napetostnimi pulzi, s pomočjo katerih ustvarimo med elektrodama električno polje. Raziskave so pokazale, da je za pospešen vnos DNK skozi membrano celice pomembno, da elektroporacijskem pulzu (visoka amplituda, kratko trajanje), ki permeabilizira celično membrano, sledi elektroforetski pulz (nizka amplituda, daljše trajanje), ki električno negativne molekule DNK elektroforetično potisne v notranjost celice [Klenchin *et al.*, 1991; Xie in Tsong, 1992; Mir *et al.*, 1999; Bureau *et al.*, 2000; Šatkauskas *et al.*, 2002; Šatkauskas *et al.*, 2005]. Učinkovitost elektrogenske transfekcije je torej izmed mnogih parametrov predvsem odvisna od dolžine in amplitude napetostnih pulzov. Uspešnost zagotavljanja teh parametrov je odvisna od karakteristik napetostnega preklopnika. Napetostni preklopnik, ki smo ga uporabljali do sedaj, izhaja iz elektroporatorja GMS 7.1 [Reberšek, 2001]. Glavna pomanjkljivost starega napetostnega preklopnika je v tem, da za preklapljanje med napetostnimi pulzi uporablja releje. Zaradi prisotnosti velikih tokov do vrednosti 5 A in napetosti do 1000 V, je razdalja med kontaktoma in teže kotve v releju velika, zato je tudi preklopni čas razmeroma dolg. Pri elektrogenski transfekciji upravljamo s tokovi do vrednosti 2 A in napetostmi do 200 V, zato novi

napetostni preklopnik ne temelji več na relejih, ampak na močnostnih krmilnikih, ki imajo prekopni čas občutno krajši.

1.1.1 Vloga amplitude napetostnih pulzov

Končna vrednost amplitude napetostnega pulza je pogojena z napetostnim preklopnikom, ki predstavlja zadnjo postajo potovanja pulza med elektrodami na celicah in generatorjem pulzov ter ojačevalnikom (slika 1.2). Precizne zmožnosti generatorja pulzov in ojačevalnika so brez pomena, če napetostni preklopnik vsebuje elektronske elemente, ki poleg svoje funkcionalnosti vnašajo tudi slabljenje amplitude napetostnega pulza. Že na začetku načrtovanja je bil zato potreben temeljit razmislek, katere elektronske elemente bomo uporabili za izdelavo napetostnega preklopnika.



Slika 1.2 Napetostni preklopnik kot zadnji člen pri dovajanju napetostnih pulzov elektrodam.

Ker je za uspešno elektrogensko transfekcijo pomembna kombinacija elektroporacijskih in elektroforetskih pulzov, mora napetostni preklopnik upravljati z visokonapetostnimi oziroma elektroporacijskimi pulzi, ki segajo z amplitudo do vrednosti 200 V in nizkonapetostnimi oziroma elektroforetskimi z amplitudami do 20 V. Vsi elektronski elementi napetostnega preklopnika morajo tudi ob najvišji vrednosti amplitude delovati normalno. Tudi električne linije, ki povezujejo elektronske elemente napetostnega preklopnika, so ob visoki napetosti izpostavljene visokim električnim tokom. Napetostni preklopnik mora biti zato načrtovan tako, da lahko po električnih linijah teče električni tok z najvišjo vrednostjo do 2 A.

1.1.2 Vloga dolžine in frekvence napetostnih pulzov

Dolžina napetostnih pulzov je pri elektrogenski transfekciji poleg amplitude ključnega pomena. Raziskave so pokazale, da je za uspešen vnos genov v celice pomembno uporabljati kratke visokonapetostne in dolge nizkonapetostne električne pulze [Pavšelj in Prémat, 2005]. Naloga napetostnega preklopnika je, da napetostni pulz določene dolžine prenese iz vhoda na izhod. Pri tem mora pulz ostati enake dolžine, napetostni preklopnik ga ne sme odrezati oziroma skrajšati. Podobno je tudi s frekvenco napetostnih pulzov, kjer se mora premor med posameznimi pulzi ohraniti. Vernost dolžine pulza in frekvence je odvisna od parametrov vhodnega napetostnega pulza in hitrosti preklapljanja napetostnega preklopnika. Želja po čim večji frekvenci preklapljanja napetostnih pulzov izhaja iz predpostavke, da med terapijo bolnik lažje prenaša hiter vlak visokonapetostnih pulzov kot pa posamezne pulze [Pucihar *et al.*, 2002; Miklavčič *et al.*, 2005].

Dolžina nizkonapetostni pulzov sega od 10 ms do 500 ms, visokonapetostnih pa od 20 μ s do 20 ms. Kljub temu, da so visokonapetostni pulzi krajši, predstavljajo za napetostni preklopnik zaradi višjih napetosti enak problem pri prenosu iz vhoda na

izhod kot nizkonapetostni. Frekvenca visokonapetostnih in nizkonapetostnih pulzov se giblje med 1 Hz in 5 kHz.

1.1.3 Vloga menjave polaritete napetostnih pulzov

Z napetostnim preklopnikom lahko spremenimo tudi polariteto napetostnega pulza (slika 1.3). To povzroči, da se med elektrodami spremeni smer električnega polja.



Slika 1.3 Simboličen prikaz zamenjave polaritete vhodnega signala

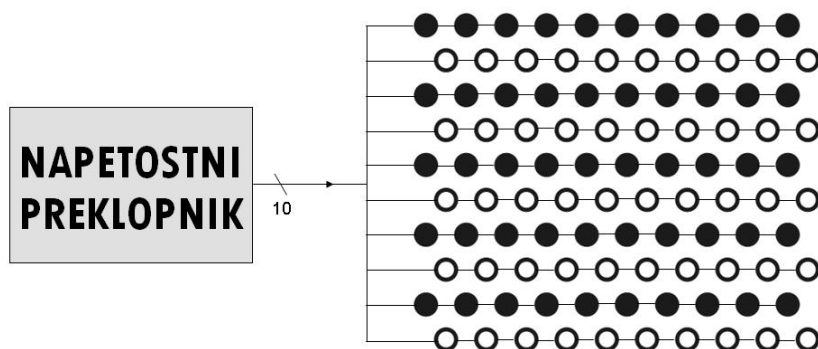
Za uspešnejšo elektrogensko transfekcijo je boljše izmenično električno polje, ker pri tem polju dobimo večji delež transfeciranih celic [Reberšek, 2004]. Še boljše rezultate elektrogenske transfekcije dobimo, če spreminjamo med smermi električnega polja (enosmerno, križno, izmenično in križno-izmenično) med potekom elektrogenske transfekcije [Faurie, 2004]. Pri tem so avtorji določili enosmerno električno polje kot tisto polje, katerega smer se ne spreminja (npr. \downarrow). Križno električno polje je tisto polje, pri katerem se smer električnega polja spremeni za $\pm 90^\circ$ (npr. iz \downarrow na \rightarrow). Izmenično električno polje spreminja smer za 180° (npr. iz \downarrow na \uparrow). Križno-izmenično električno polje pa je kombinacija križnega in izmeničnega polja (npr. $\downarrow \rightarrow \uparrow \leftarrow$). Da bi dosegli opisane spremembe smeri električnega polja so avtorji v omenjeni raziskavi ročno obračali elektrode. Napetostni preklopnik, ki sem ga izdelal v okviru te naloge ima deset izhodov. Ker lahko vklop posameznih elektrod vnaprej določimo s programskim orodjem, se smer električnega polja med elektrogensko transfekcijo samodejno spreminja, tako da elektrod med elektrogensko transfekcijo ni treba obračati.

1.2 Uporaba elektrogenske transfekcije na koži

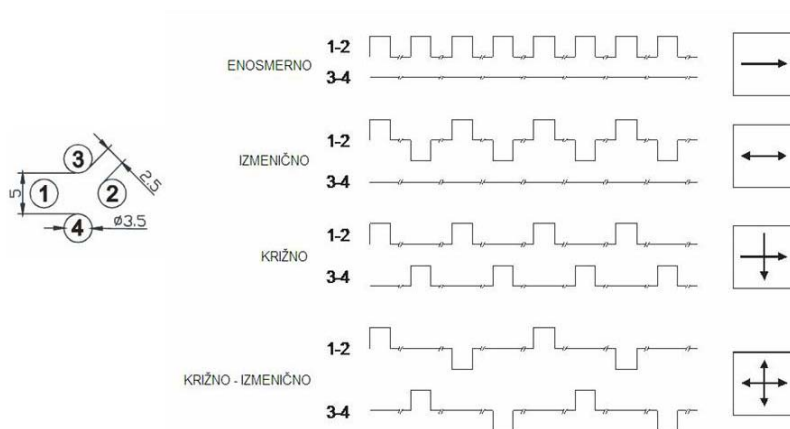
Koža je zaradi svoje dostopnosti in velikosti zanimiv cilj organ za gensko terapijo. Genska terapija je metoda pri kateri vnašamo genski material v biološke celice za nadomestilo, spremembo ali utišanje izražanja genov [Vodovnik *et al*, 1998; Rubanyi, 2001]. Zaradi napredka na področju razkrivanja zapletenega človeškega genoma je genska terapija deležna velike pozornosti. Metode s katerimi vnašamo genski material v celice v grobem razdelimo na virusne in nevirusne. Virusne metode uporabljajo virusne verige nukleinskih kislin oziroma virusne vektorje z odstranjenimi geni, ki povzročajo virusne bolezni. Takim virusnim vektorjem nato dodamo gene, ki jih želimo vnesti v postopku genskega zdravljenja. Virusni vektorji so se kljub začetnemu optimizmu izkazali za problematične, zato danes potekajo številne raziskave za izboljšanje transfekcije nevirusnih metod [Ferber, 2001; Jelen, 2003]. Nevirusne metode uporabljajo plazmide za prenos genskega materiala v celice. Plazmidi so krožni kosi deoksi-ribonukleinske kisline (DNK), ki so sestavljeni v laboratoriju. Ena izmed perspektivnih nevirusnih metod je elektrogenska transfekcija.

V okviru evropskega projekta Angioskin želimo dokazati, da lahko zdravimo nekatere podedovane in pridobljene kožne bolezni s pomočjo transfekcije DNK v elektroporirane celice kože ob predhodnem vbrizganju DNK v kožo. Napetostni preklopnik pri tem igra eno od ključnih vlog, ker s krmiljenjem mikroelektrod dovaja električne pulze, ki zagotavljajo poracijo celic v koži in s tem transfekcijo. Električni pulzi dovolj visoke amplitudne povzročijo strukturne spremembe kože in s tem padec električne upornosti [Gallo *et al.*, 1997; Jadoul *et al.*, 1999]. Če visokonapetostnemu elektroporacijskemu pulzu sledi še dolg nizkonapetostni elektroforetični pulz, dosežemo bistveno povečano izražanje genov v koži [Pavšelj, 2006]. Ker se specifična upornost kože vrne na prvotno vrednost v nekaj sekundah, metoda na koži ne pušča posledic [Vanbever, 1999].

Uspešnost elektrogenske transfekcije je tudi odvisna od postavitve mikroelektrod na kožo. Na vsak izhod napetostnega preklopnika lahko priključimo verigo desetih med seboj povezanih mikroelektrod. Ker ima napetostni preklopnik deset izhodov, dobimo mrežo 10x10 mikroelektrod. Primerna postavitev polja mikroelektrod je prikazana na sliki 1.4, kjer črne in bele točke pomenijo mikroelektrode različnih polaritet. V tem primeru lahko ob primernem krmiljenju mikroelektrod dobimo vse možne smeri električnega polja (slika 1.5). Ker lahko vklop posamezne verige mikroelektrod vnaprej določimo, se smer električnega polja med elektrogensko transfekcijo samodejno spreminja.



Slika 1.4 Primerna postavitev polja mikroelektrod priključenih na izhode napetostnega preklopnika. Črne in bele točke predstavljajo mikroelektrode različnih polaritet



Slika 1.5 Možne smeri električnega polja ob primerni postavitvi polja elektrod (povzeto po [Rebersek, 2004])

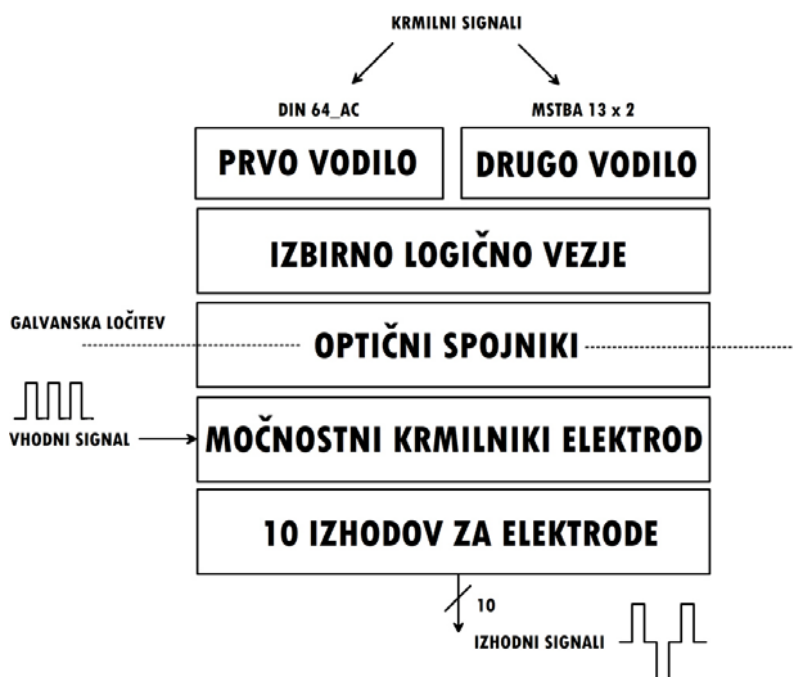
1.3 Izhodišča in namen naloge

Napetostni preklopnik predstavlja pomembno komponento pri zagotavljanju uspešne elektroporacije in elektrogenske transfekcije. S svojimi električnimi lastnosti zagotavlja pravilno krmiljenje napetostnih pulzov, ki predstavljajo glavni dejavnik tako elektroporacije kot elektrogenske transfekcije. V preteklosti smo uporabljali napetostni preklopnik, ki je temeljil na relejih. Dobra lastnost relejev je, da lahko z njimi preklaplamo med signali z napetostmi do 1000 V, kar je petkrat večja vrednost od najvišje amplitude signalov, ki jih bomo uporabljali pri elektrogenski transfekciji. Releji zagotavljajo tudi mehansko galvansko ločitev, vendar zaradi tega počasneje preklaplajo. Pomanjkljivost starega napetostnega preklopnika je tudi na sedem omejeno število izhodov.

Nov napetostni preklopnik (slika 1.6) sem načrtoval tako, da ima deset izhodov in uporablja za preklapljanje hitrejša močnostne krmilnike, ki sem jih predhodno preizkusil.

Glavne točke, ki so me usmerjale pri načrtovanju napetostnega preklopnika so bile naslednje:

- upravljanje z visokonapetostnimi pulzi do amplitude 200 V različnih dolžin (od 20 μ s do 20 ms);
- upravljanje z nizkonapetostnimi pulzi do amplitude 20 V različnih dolžin (od 10 ms do 500 ms);
- delovanje ob največjem toku 2 A;
- frekvenca napetostnih pulzov se giblje med 1 Hz in 5 kHz;
- možnost menjave polaritet na vseh desetih izhodih;
- vklapljanje in izklapljanje posameznih izhodov.



Slika 1.6 Blokovna shema napetostnega preklopnika

Upošteval sem tudi potrebni varnostni vidik napetostnega preklopnika, zato sem med seboj galvansko ločili digitalne signale, ki se uporabljajo za krmiljenje elektronskih komponent napetostnega preklopnika in izhodne signale, ki dosegajo mnogo večje vrednosti toka in napetosti. Zaradi možnosti nadaljnjega razvoja, sem predvidel, da bi lahko napetostni preklopnik krmilili preko dveh različnih vodil.

Ko je bil napetostni preklopnik narejen, je sledil preizkus delovanja v uporabnem frekvenčnem območju. Nato sem dodal še ostale elektronske komponente, ki so potrebne za doseg visokonapetostnih pulzov in dobili sistem Angioskin. Sledile so meritve v visoko in nizkonapetostnem območju in preizkus vklapljanja in izklapljanja posameznih izhodov napetostnega preklopnika. V okviru celotnega projekta Angioskin sem izdelal deset napetostnih preklopnikov, ki se bodo v prvi fazi uporabljali v prototipnih sistemih Angioskin, v prihodnje pa so predvideni za uporabo v kliničnih napravah.

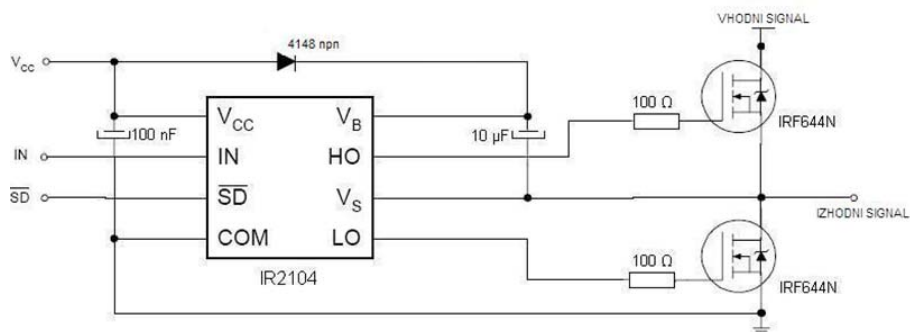
Napetostni preklopnik je bil načrtovan in izdelan v Laboratoriju za biokibernetiko na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, kjer so potekale tudi meritve.

2 MATERIALI IN METODE

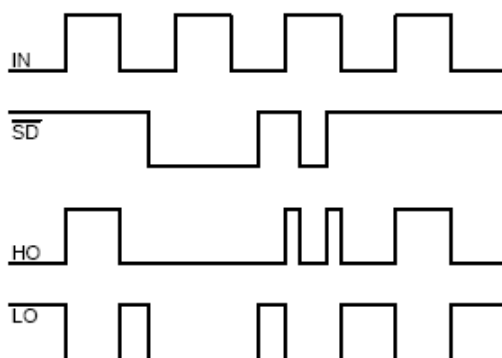
Na začetku načrtovanja sem najprej preizkusil močnostni krmilnik, ki opravlja ključne funkcije napetostnega preklopnika. Predvsem me je zanimalo, ali krmilnik verno posreduje vhodni signal na izhod v celotnem frekvenčnem območju. Šele po potrditvi sem lahko začel načrtovati vezje napetostnega preklopnika. Ko sem napetostni preklopnik izdelal, sem ponovil meritve krmilnika in s tem potrdil rezultate uvodnega preizkusa. Napetostnemu preklopniku sem nato dodal še ostale elektronske komponente, ki so potrebne za izvedbo meritev in dobil sistem Angioskin, ki že predstavlja prototip naprave za izvedbo elektrogenske transfekcije kože. Sledile so meritve sistema Angioskin v visoko in nizkonapetostnem območju. Preizkusil sem tudi, kako sistem upravlja z vlakom različnih napetostnih pulzov, ki se uporabljajo v elektrogenski transfekciji. Na koncu sem preizkusil še preklapljanje napetostnih preklopnikov med posameznimi izhodi.

2.1 Močnostni krmilnik IR2104

Predmet meritev v uvodnih poizkusih je bil močnostni krmilnik IR2104, ki predstavlja glavno jedro napetostnega preklopnika. Njegova naloga je, da sprejme krmilne signale in nato ustrezno nastavi polariteto izhodnega signala. Med poizkusi nas je predvsem zanimalo, kaj se dogaja med preklopi tranzistorjev, odzivnost tranzistorjev, ojačenje oziroma slabljenje izhodnega signala in koliko toka je potrebno za nemoteno delovanje krmilnikov. Krmilnik in tranzistorja sem povezal v polmostično vezavo po sliki 2.1. Izhoda krmilnika (signala HO in LO) sta bila priključena preko uporov vrednosti $100\ \Omega$ na tranzistor IRF644N. Za napajanje krmilnika (signal V_{CC}) sem uporabil napetostni generator (Labor-Netzgerat 310). V mojem primeru je napajalna napetost znašala 12 V. Krmilnik sem upravljal s funkcijskim generatorjem (Hameg Instruments 8030), s katerim sem generiral pravokotni krmilni signal z amplitudo 5 V (signal IN). Za vhodni signal pravokotne oblike in amplitude 10 V sem uporabil funkcijski generator (Sony Tektronix AFG310). Signal \overline{SD} s katerim vklopimo oziroma izklopimo krmilnik IR2104 sem imel vezan na potencial 0 V, kar pomeni, da je bil krmilnik v delujočem stanju. V tem primeru krmilnik glede na vhodni signal aktivira enega izmed izhodnih signalov (slika 2.2). Izhod vezja, vhodni tok, krmilni signal in vhodni signal sem opazoval preko napetostnih (Lecroy ADP305) in tokovnih sond (Lecroy AP015) na osciloskopu (Lecroy Wavesurfer LT3544).



Slika 2.1 Shema priključitve krmilnika IR2104 v polmostično vezavo



Slika 2.2 Potek vhodnih in izhodnih signalov pri krmilniku IR2104

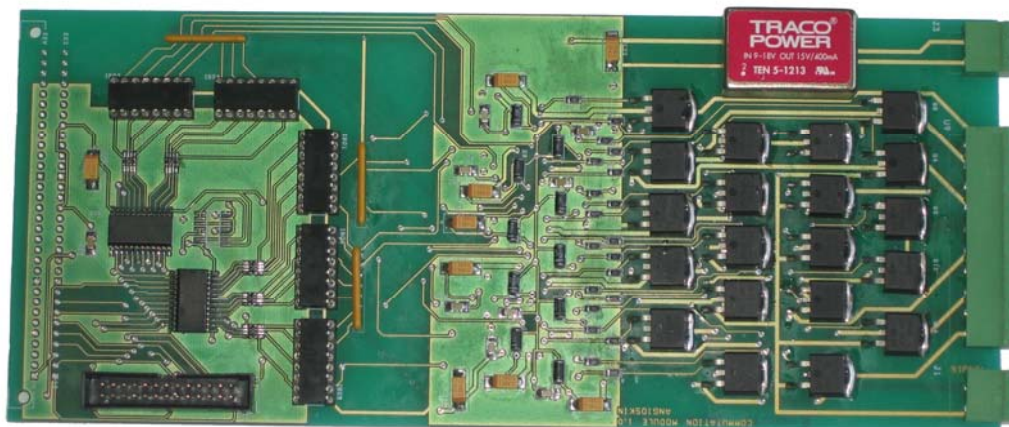
Krmilnik IR2104 sem upravljal s krmilnim signalom tako, da sem mu spreminjal frekvenco od 1 Hz do 10 kHz v trinajstih korakih. Ob vsakem koraku je imel vhodni signal štirikrat večjo frekvenco v primerjavi s krmilnim signalom. Z osciloskopom sem izmeril vrednosti amplitude vhodnega signala ($U_{\text{vhodni signal}}$), amplitude izhodnega signala ($U_{\text{izhodni signal}}$) ter povprečno in maksimalno vrednost vhodnega toka. Po relaciji za amplitudni del Bodejevega diagrama

$$H [dB] = 20 \cdot \log \left(\frac{U_{\text{izhodni signal}}}{U_{\text{vhodni signal}}} \right)$$

sem lahko prikazal odvisnost ojačenja oziroma slabljenja izhodnega signala od spreminjajoče se frekvence krmilnega signala. Zakasnitev in popačenje tranzistorjev sem opazoval na obliki izhodnega signala. Rezultate ojačenja izhodnega signala in spremembe napajalnega vhodnega toka sem prikazal v obliki grafov (SigmaPlot 8.0, Systat, ZDA), kjer vsaka točka predstavlja rezultat povprečja treh meritev pri izbrani frekvenci. Podal sem tudi standardno deviacijo meritev.

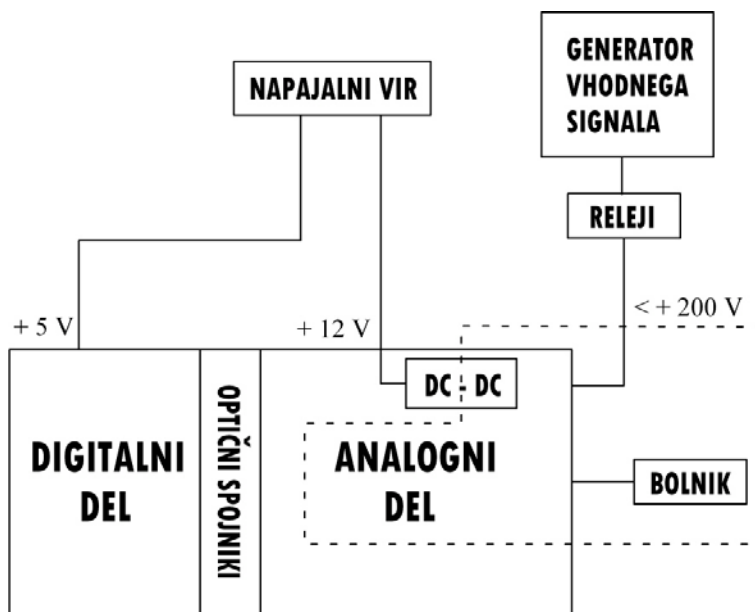
2.2 Napetostni preklopnik

Končna različica napetostnega preklopnika (slika 2.3) je bila načrtana v programskem paketu Orcad Layout in Orcad Capture (Orcad 8.1, Cadence, ZDA).



Slika 2.3 Tiskana ploščica napetostnega preklopnika izdelana v dvoslojni tehnologiji.

Kartico sem razdelil na dva med seboj galvanjsko ločena dela, digitalnega in analognega. Pomembno je, da je analogni del, kjer amplituda napetosti visoko in nizkonapetostnih pulzov dosegajo tudi vrednosti do 200 V, ločen od digitalnega dela, kjer vrednost napetosti krmilnih signalov znaša 5 V. Pri medicinskih napravah je galvanjska ločitev (slika 2.4) zelo pomembna, saj zagotavlja varnost bolnika, ki je v stiku z električnim instrumentom. S tem poskrbimo, da sta bolnikov in napetostni potencial napajalnega vira ločena med celotno terapijo. Analogni in digitalni del uporabljata isti napajalni vir, vendar je digitalni del izoliran od bolnika preko optičnih spojniov, analogni pa preko DC – DC pretvornika. S tem sem se tudi izognil težavi pri povečani obremenitvi krmilnikov, ker bi zahteva po večjem toku lahko zaustavila procesor, ki krmili napetostni preklopnik. Poskrbeti sem moral tudi za vhodni signal preko katerega dovajamo nizko in visokonapetostne pulze. V tem primeru ne želimo popolne ločitve, zato je vhodni signal ločen od napetostnega preklopnika preko relejev, ki z mehanskim preklapljanjem združijo oziroma ločijo potenciala.



Slika 2.4 Prikaz galvanske ločitve napetostnega preklopnika. Galvansko izoliran del se nahaja v črtkanem kvadratu.

Napetostni preklopnik krmilimo preko digitalnega dela, ki ima dva različna vhodna priključka. Prvi, ki ga trenutno uporabljamo tudi mi, se bo uporabljal predvsem v razvojni fazi izdelka in bo povezan s sistemom, ki ga upravljamo preko računalnika in za to posebej razvitega programskega paketa. Drugi vhodni priključek se bo uporabljal v prihodnosti, ko bo razvito tudi posebno vodilo. Največji delež analognega dela predstavljajo polmostične vezave močnostnih krmilnikov IR2104 in tranzistorjev. Vezalna shema napetostnega preklopnika se nahaja v dodatku.

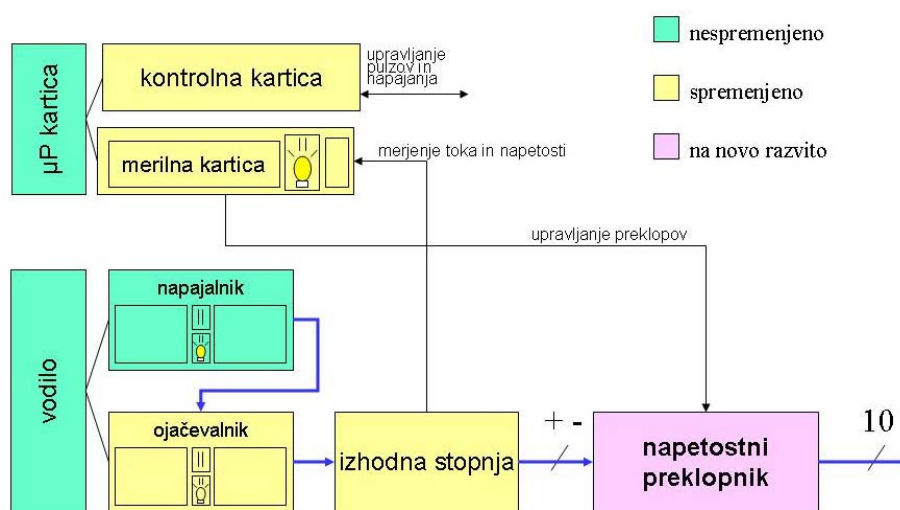
Pri preizkusu delovanja napetostnega preklopnika sem uporabil enake vhodne signale kot pri uvodnih meritvah preizkusa močnostnega krmilnika IR2104. Upravljal sem torej z nizkonapetostnimi pulzi z amplitudo 10 V. Vezava je prikazana na sliki 2.5. Uporabil sem napetostni generator (Labor-Netzgerat 310), s katerim sem poskrbel za ustrezno napajanje napetostnega preklopnika. Krmiljenje sem opravil z računalnikom in zato posebej razvitim programom, kjer sem predhodno nastavili ustrezne sekvence spreminjanja izhodov napetostnega preklopnika. Vsaka sekvenca je sestavljena iz desetih korakov, pri čemer vsak korak traja 280 ms. Vhodni signal pravokotne oblike in amplitude 10 V sem generiral s funkcijskim generatorjem (Sony Tektronix AFG310). S pomočjo osciloskopa (Lecroy Wavesurfer LT3544) ter diferencialnih napetostnih (Lecroy ADP305) in tokovnih sond (Lecroy AP015), sem opazoval spreminjanje izhodnega signala in porabo toka pri napajanju napetostnega preklopnika. Rezultate ojačenja izhodnega signala in spremembe napajalnega vhodnega toka sem prikazal v obliki grafov (SigmaPlot 8.0, Systat, ZDA), kjer vsaka točka predstavlja rezultat povprečja treh meritev pri izbrani frekvenci. Podal sem tudi standardno deviacijo meritev.



Slika 2.5 Simboličen prikaz vezave preizkusa napetostnega preklopnika.

2.3 Sistem Angioskin

Napetostni preklopnik predstavlja ključno komponento celotnega sistema Angioskin. Poleg napetostnega preklopnika sistem vsebuje še ostale elektronske komponente, ki so potrebne za uspešno elektrogensko transfekcijo. Prototipni sistem Angioskin je nastal na podlagi adaptacije sistema Cliniporator, ki je produkt evropskega projekta Cliniporator (QLK3-1999-00484). Oba sistema sta sestavljena iz napetostnega preklopnika, ojačevalnika, nizkonapetostnega napajalnika, merilne kartice in kontrolne kartice (slika 2.6). Ključna razlika je v novo razvitem napetostnem preklopniku. Sistem Cliniporator je uporabljal napetostni preklopnik z releji, ki ne omogočajo tako hitrih prekopov kot jih potrebujemo v sistemu Angioskin.



Slika 2.6 Shema prototipnega sistema Angioskin.

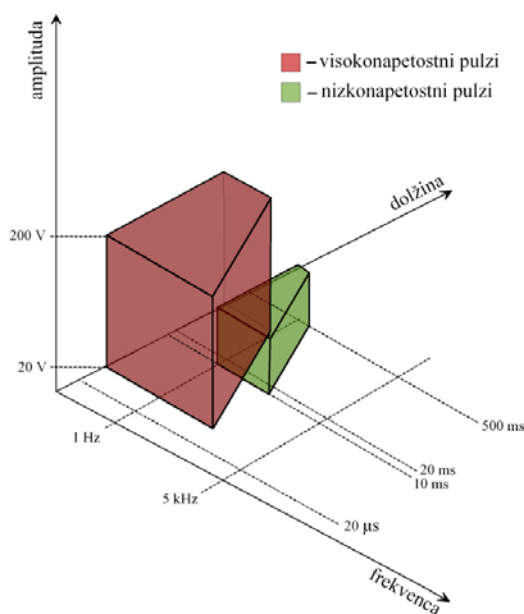
Nizkonapetostni napajalnik v povezavi z ojačevalnikom služi za ustvarjanje električnih pulzov želene dolžine in amplitude. Napetostni preklopnik nato ustrezno nastavi polariteto posameznih izhodov, preko katerih do elektrod pošlje zelen napetostni pulz. Merilna kartica nam skozi celoten proces meri parametre signalov in skrbi za zeleno karakteristiko napetostnih pulzov. Celoten sistem upravljamo s kontrolno kartico v povezavi z računalnikom, preko katerega nastavimo parametre napetostnih pulzov in polariteto posameznih elektrod. Sistem ima podobno kot napetostni preklopnik galvansko ločene digitalne oziroma krmilne signale in analogne signale (visoko in nizkonapetostni pulzi).

Izvedba meritev napetostnega preklopnika preko sistema Angioskin je bila nujna, ker sem samo tako lahko generiral visokonapetostne pulze in izvedel hitro spreminjanje polaritet. Meritve sem glede na začetne zahteve za uspešno elektrogensko transfekcijo razdelil na več sklopov. Vsem je bilo skupno to, da sem imel na izhodu napetostnega preklopnika priključeno breme $100\ \Omega$. Predpostavil sem, da bo ob takšni vrednosti bremena tekel ob najvišji napetosti $200\ \text{V}$ tudi največji zahtevani tok $2\ \text{A}$.

V prvem sklopu meritev sem proučeval upravljanje sistema Angioskin z visokonapetostnimi pulzi. Amplituda pravokotnih vhodnih signalov se je povzpela do

največje vrednosti 200 V. Predpostavil sem, da bo zaradi visokih napetosti skozi breme začel teči tudi tok, ki se bo približal tokovni meji 2 A. Dolžina pravokotnih vhodnih signalov visokonapetostnega območja je v primerjavi z dolžinami nizkonapetostnega manjša. Najkrajši impulz je dolg samo 20 μs , najdaljši 20 ms, kar je za 10 ms več od najkrajšega nizkonapetostnega impulza. Na izhodu napetostnega preklopnika sem spreminjal polariteto na bremenu in proučeval kako vpliva oblika vhodnega pravokotnega signala na menjavo polaritete. Na osciloskopu (Lecroy Wavesurfer LT3544) sem meril amplitudo pravokotnega vhodnega signala in amplitudo ter tok izhodnega signala na bremenu. Med meritvami sem bil zelo pozoren tudi na meritev amplitude vhodnega signala, ker sem pričakoval, da bi lahko začela med zaporedjem impulzov upadati zaradi visokih napetosti in posledično večjih energij, ki presegajo zmogljivosti komponent sistema Angioskin.

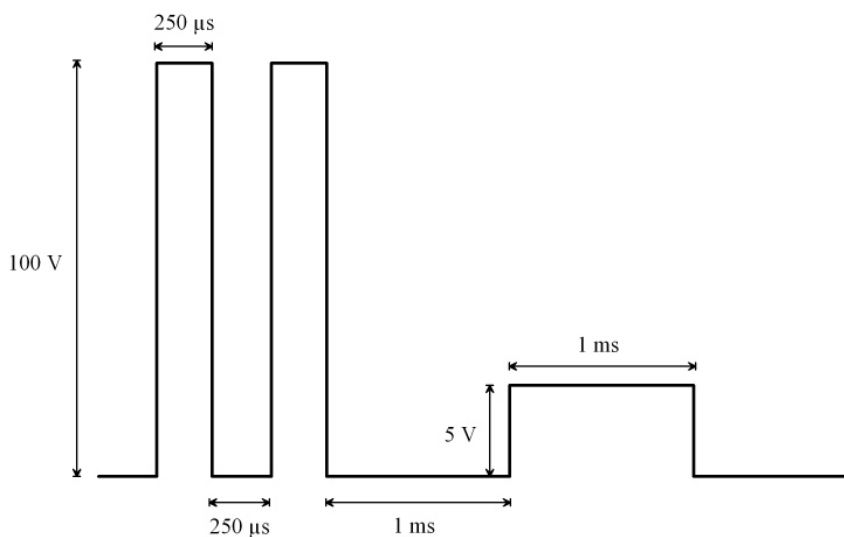
V drugem sklopu sem se posvetil nizkonapetostnemu območju. Dolžino pulzov se je gibala med 10 ms in 500 ms. Na osciloskopu (Lecroy Wavesurfer LT3544) sem meril amplitudo pravokotnega vhodnega signala in amplitudo ter tok izhodnega signala na bremenu. Na izhodu napetostnega preklopnika sem spreminjal polariteto na bremenu in proučeval kako vpliva oblika vhodnega pravokotnega signala na menjavo polaritete. Zanimalo me je predvsem, kako napetostni preklopnik deluje v mejnih primerih, kjer bi lahko nastopile težave zaradi preobremenjenosti posameznih komponent sistema Angiosokin.



Slika 2.7 Parametri napetostnega pulza lahko predstavljajo koordinatne osi v kartezijskem koordinatnem sistemu. Spreminjanje parametrov napetostnega pulza v območju poteka uspešne elektrogenske transfekcije izriše visokonapetostno (obarvan rdeče) in nizkonapetostno (obarvan zeleno) geometrijsko telo.

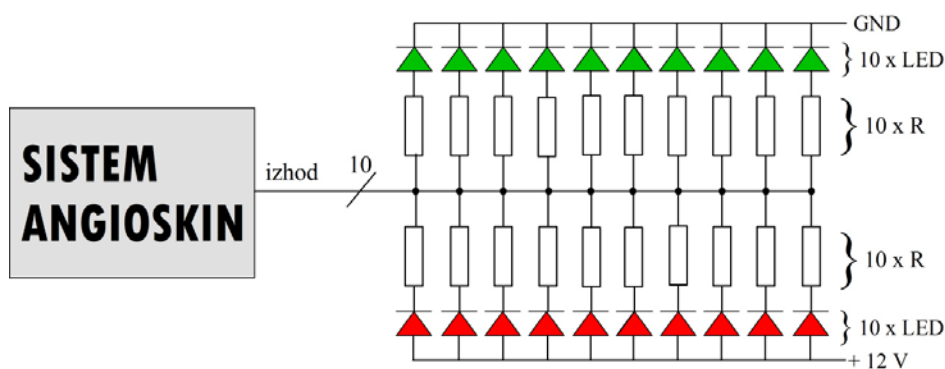
Obseg obeh sklopov meritev je prikazana na sliki 2.7. Vsak od treh spreminjajočih se parametrov pulza lahko predstavlja v kartezijskem koordinatnem sistemu koordinatno os. Pri preletu vseh treh vrednosti parametrov pulza (amplituda, dolžina in frekvenca) v območju uspešne elektrogenske transfekcije, se za vsak napetostni sklop izriše geometrijsko telo, ki ima za osnovno ploskev trapez. Pri meritvah sem se predvsem osredotočil robove posameznega geometrijskega telesa, kjer so parametri pulza na svoji predpisani zgornji oziroma spodnji meji.

V tretjem sklopu meritev sem preizkusil generiranje napetostnih pulzov različnih dolžin in amplitud. Vlak pulzov (slika 2.8) je bil sestavljen iz dveh visokonapetostnih, amplitude 100 V in dolžine 250 μ s ter enega nizkonapetostnega, amplitude 5 V in dolžine 1 ms. Podobna kombinacija visoko in nato nizkonapetostnega pulza se namreč uporablja pri elektrogenski transfekciji [Sukharev *et al.*, 1992]. Med posameznimi vlaki impulzov sem na izhodu zamenjal polariteto. Frekvenco visokonapetostnih pulzov sem nastavil na 2 kHz. Premor med visokonapetostnima pulzoma in nizkonapetostnim je znašal 1 ms. Na osciloskopu (Lecroy Wavesurfer LT3544) sem s pomočjo diferencialnih napetostnih sond (Lecroy ADP305) meril amplitudo pravokotnega vhodnega signala in amplitudo pravokotnega izhodnega signala ter s pomočjo tokovnih sond (Lecroy AP015) tok izhodnega signala na bremenu.



Slika 2.8 Vlak pulzov različnih amplitud in dolžin.

Zmožnost vklapljanja različnih elektrod med delovanjem napetostnega preklopnika sem preizkusil v zadnjem delu meritev. Napetostni preklopnik sem povezal z vezjem (slika 2.9) tako, da sem vsak izhod napetostnega preklopnika povezal s parom LED diod. Ko je napetostni preklopnik na izhode poslal pozitiven napetostni pulz, se je prižgala zgornja vrsta zelenih diod. Če sem na izhodu obrnil polariteto, se je podobno zgodilo pri spodnjih diodah, ki so oddajale rdečo svetlobo. V stanju visoke impedance posameznega izhoda se prižge tako rdeča kot zelena dioda. Tako sem lahko za vsak izhod posebej proučeval, ali deluje pravilno. Potreba po preizkusu je nastala zaradi kompleksnosti spajkanja velikega števila komponent napetostnega preklopnika. Ker sem v okviru projekta Angioskin sestavil deset napetostnih preklopnikov, je ta preizkus na zelo enostaven in hiter način podal jasno sliko delovanja posameznega napetostnega preklopnika.



Slika 2.9 Prikaz vezave preizkusa vklapljanja različnih elektrod napetostnega preklopnika.

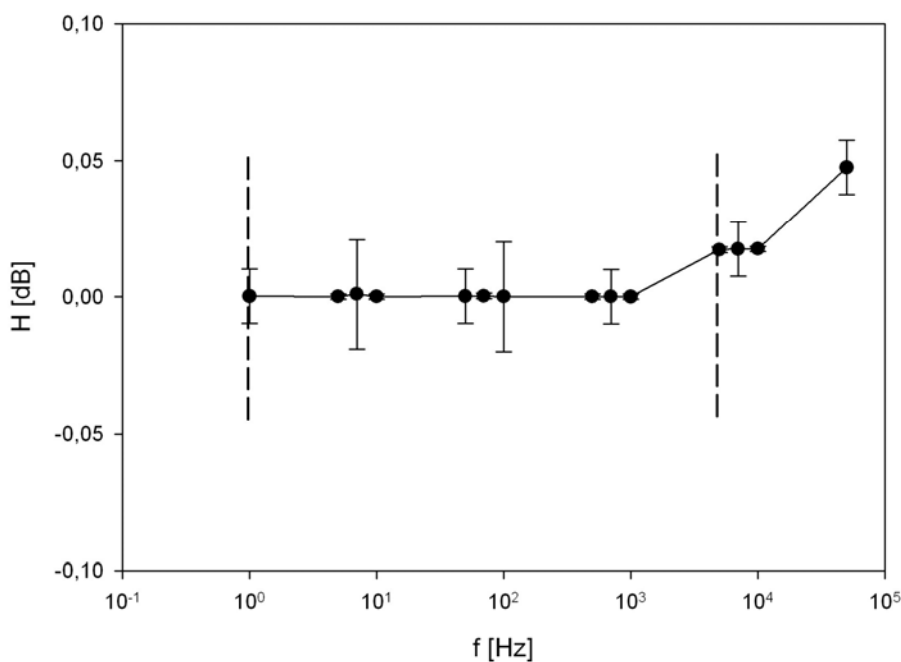
3 REZULTATI

3.1 Preizkus močnostnega krmilnika IR2104

V uvodnih preizkusih sem želel ugotoviti ali krmilnik IR2104 ustreza našim zahtevam. Proučeval sem odvisnost slabljenja izhodnega signala v odvisnosti od spreminjajoče frekvence krmilnega signala, potreben tok za nemoteno delovanje krmilnikov in odzivnost tranzistorjev.

3.1.1 Odvisnost ojačenja oziroma slabljenja zunanega signala glede na vhodno frekvenco krmilnega signala

Rezultati so prikazani na grafu (slika 3.1) v obliki amplitudnega dela Bodejevega diagrama. Za uspešno elektrogensko transfekcijo je pomembno frekvenčno območje med 1 Hz in 5 kHz (na Sliki 3.1 označeno kot območje med prekinjenima črtama), kjer do zgornje frekvence 5 kHz ne zaznamo slabljenja napetosti. Pri 5 kHz sem izmeril rahlo ojačenje v vrednosti 0,02 dB, kar je za našo aplikacijo zanemarljivo.

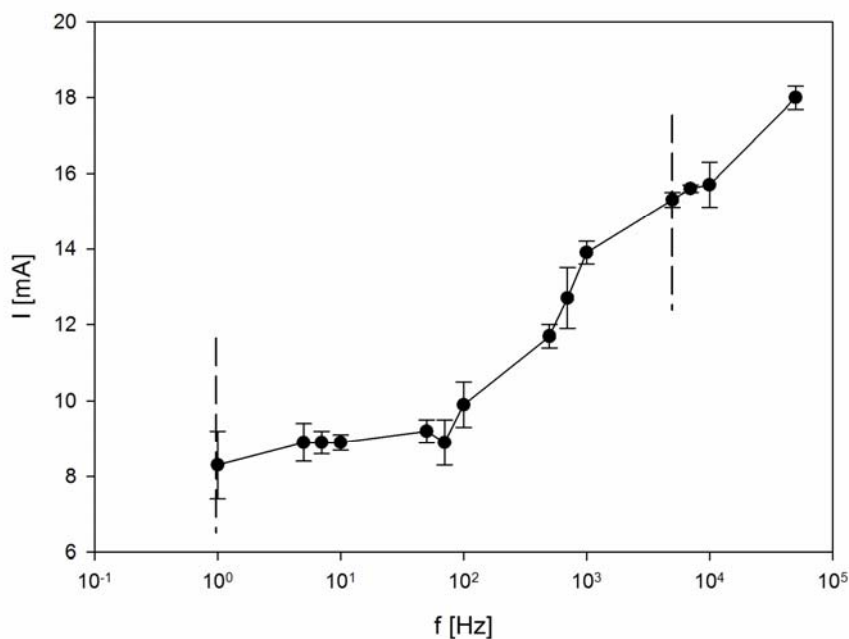


Slika 3.1 Amplitudni del Bodejevega diagrama na izhodu polmostične vezave krmilnika IR2104 in tranzistorjev IRF644N. Pomembno frekvenčno območje za elektrogensko transfekcijo je označeno med prekinjenima črtama. Vsaka točka na sliki predstavlja povprečje treh meritev \pm standardna deviacija.

Potek grafa ni tipičen Bodejev diagram, kjer pričakujemo, da se slabljenje z višjimi frekvencami povečuje. Razlika je v tem, da je naše frekvenčno območje kljub razponu štirih dekad še vedno v območju, kjer krmilnik in tranzistor ne izkazujeta popačenj in slabljenj.

3.1.2 Odvisnost napajalnega toka glede na vhodno frekvenco krmilnega signala

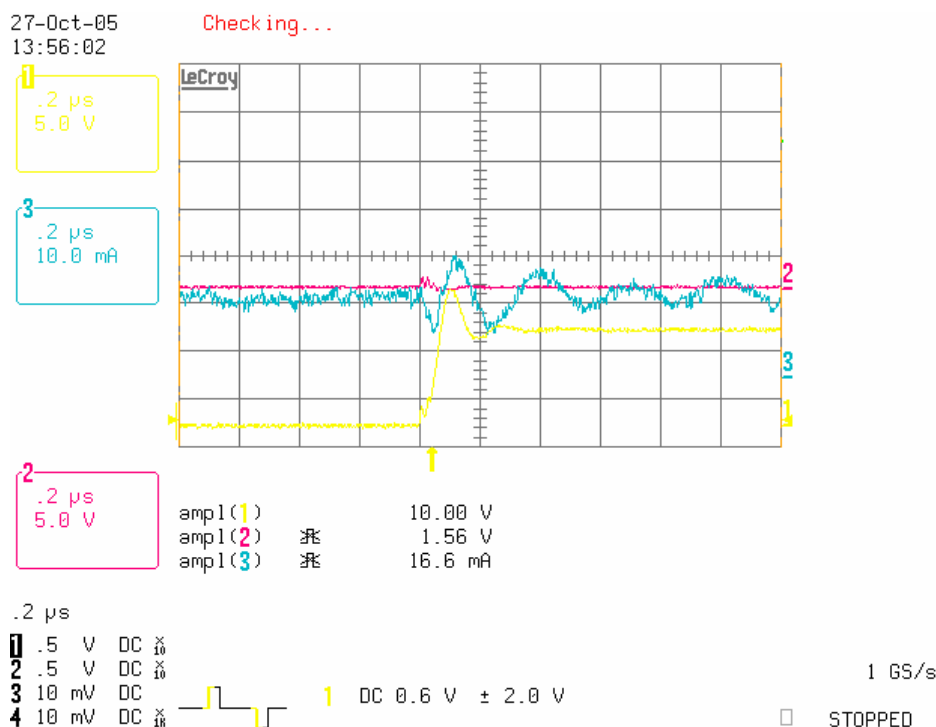
V tem delu meritev sem predvsem proučeval povprečje napajalnega vhodnega toka, ki ga tranzistor potrebuje za nemoteno delovanje, ter kaj se zgodi s tokom ob preklopu signala. Predpostavil sem, da zaradi preklopa potreba krmilnika po napajalnem toku naraste.



Slika 3.2 Odvisnost povprečne vrednosti vhodnega napajalnega toka glede na vhodno frekvenco krmilnega signala. Vsaka točka predstavlja povprečje treh meritev \pm standardna deviacija.

Rezultati merjenja povprečja napajalnega toka krmilnika so prikazani na grafu (slika 3.2), kjer vidimo, da se vrednost napajalnega toka povečuje, ko frekvenca krmilnega signala narašča.

Pri frekvenci 5 kHz sem na osciloskopu opazoval, kako močno zaniha vhodni napajalni tok ob preklopu zunanjega signala (slika 3.4). Predpostavka, da bo tok zanihal, se je potrdila. Ob preklopu zunanjega signala se vhodnemu toku močno poveča amplituda, ki doseže maksimalno vrednost 16,6 mA.

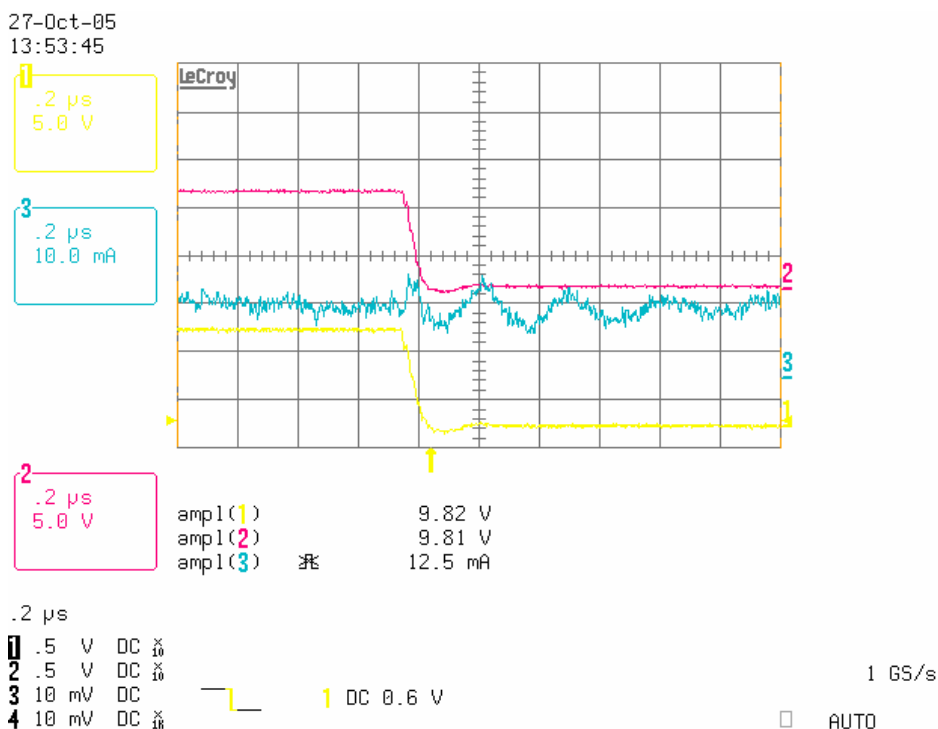


Slika 3.4 Prikaz spremembe amplitude vhodnega napajalnega toka ob preklopu zunanjega signala pri frekvenci 5 kHz. Na prvem kanalu osciloskopa je bil priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem vhodni signal (obarvan rdeče) in na tretjem napajalni tok (obarvan modro).

Končni napetostni krmilnik bo imel deset močnostnih krmilnikov, kar pomeni, da ob preklopu vseh desetih močnostnih krmilnikov tok lahko zaniha z desetkratno vrednostjo enega. Kljub temu, da je verjetnost sočasnega preklopa vseh desetih krmilnikov med elektrogensko transfekcijo zelo majhna, sem pri načrtovanju napajanja napetostnega preklopnika zaradi funkcionalnosti upošteval, da bi ob preklopu potrebovali najmanj 170 mA toka za nemoteno delovanje vseh desetih krmilnikov.

3.1.3 Zakasnitev in popačenje tranzistorjev

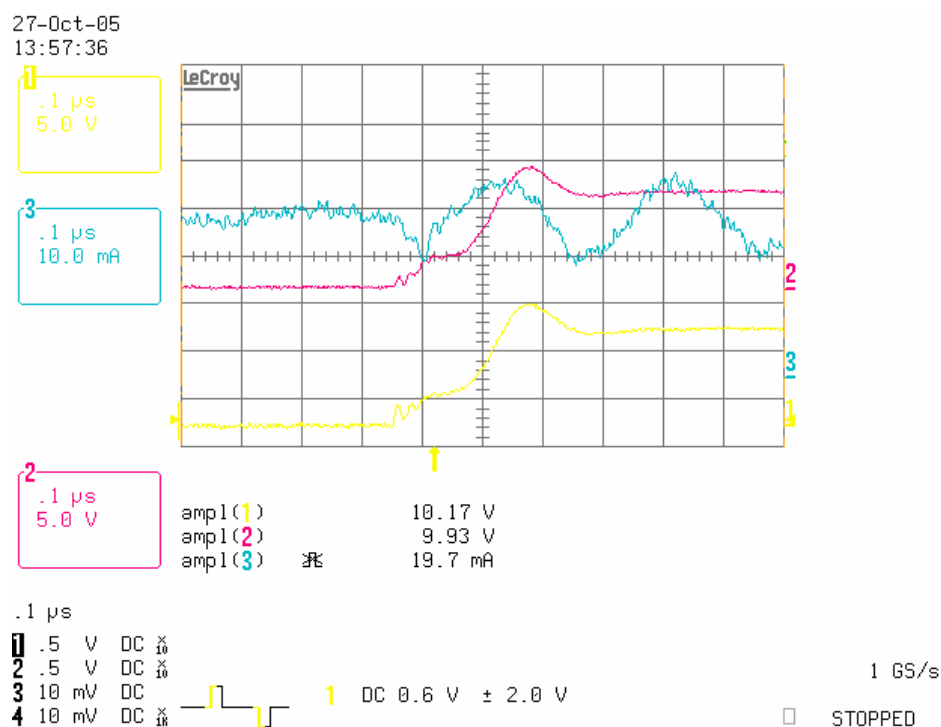
Pri visokih frekvencah omejujejo delovanje MOS tranzistorja parazitne kapacitivnosti, ki jih povzročajo kapacitivnosti krmilne elektrode s kanalom, kapacitivnosti zaradi prekrivanja krmilne elektrode s plastjo izvora in ponora ter spojne kapacitivnosti pn-spojev. Pri hitrih spremembah krmilnih signalov (impulzno vzbujanje pri visokih frekvencah) povzročajo zakasnitve pri transportu nabojev v tranzistorju nezaželene zakasnitve med krmilnimi in izhodnimi signali tranzistorja [Smole, 2005]. Zakasnitev in popačenje tranzistorjev sem opazoval pri frekvenci 5 kHz oziroma pri najvišji zahtevani vrednosti frekvenčnega območja za uspešno elektrogensko transfekcijo (slika 3.5).



Slika 3.5 Prikaz prehodnega pojava med izklopom zunanega signala pri frekvenci 5 kHz. Na prvem kanalu osciloskopa je bil priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem vhodni signal (obarvan rdeče) in na tretjem napajalni tok (obarvan modro).

Iz slike 3.5 razberemo, da izhodni signal začne brez časovnega zamika padati z vhodnim signalom. Sledi ustalitev obeh signalov pri končni vrednosti amplitude. Prehodni pojav pri izklopu zunanega signala je enak izhodnemu signalu, torej sta zakasnitvi in popačenje tranzistorjev v tem primeru zanemarljiva.

Preizkusil sem tudi kaj se zgodi med prehodnim pojavom izhodnega signala pri vklopu zunanega signala pri frekvenci 5 kHz (slika 3.6).



Slika 3.6 Prikaz prehodnega pojava med vklopom zunanega signala pri frekvenci 5 kHz. Na prvem kanalu osciloskopa je bil priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem vhodni signal (obarvan rdeče) in na tretjem napajalni tok (obarvan modro).

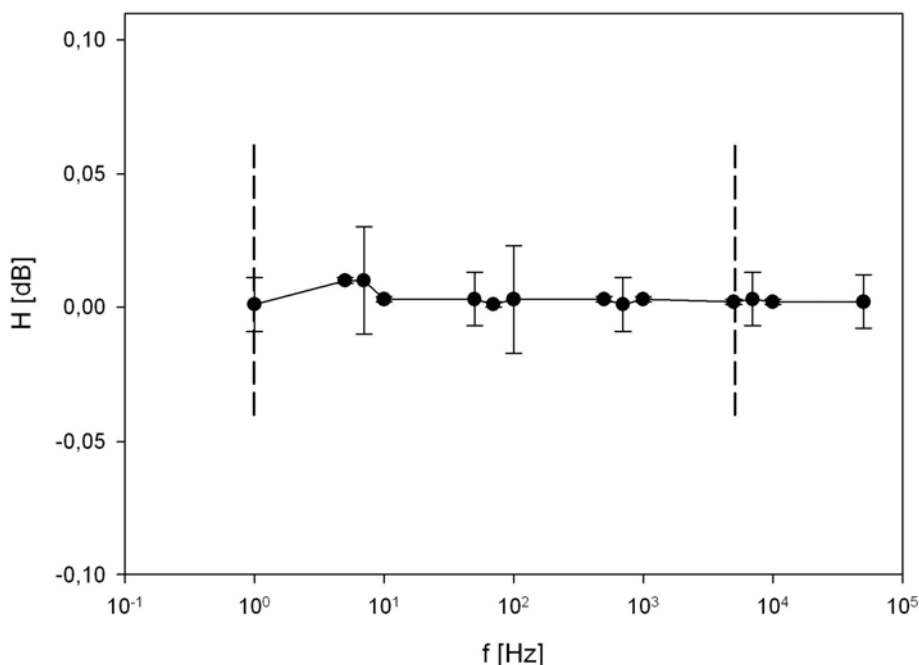
Začetek dviganja napetosti izhodnega signala se začne istočasno z vhodnim signalom. Izhodni signal nato sledi zunanjemu in se brez časovnega zamika ustali pri končni vrednosti napetosti signala. Kljub temu, da sem meritve izvajal v zgornjem frekvenčnem območju, delovanje tranzistorja ne kaže omejitev.

3.2 Preizkus napetostnega preklopnika

V preizkusu napetostnega preklopnika sem želel ponoviti uvodne meritve močnostnih krmilnikov. Tako sem tudi tukaj proučeval odvisnost napajalnega toka ter slabljenja izhodnega signala v odvisnosti od spreminjajoče frekvence vhodnega signala.

3.2.1 Odvisnost ojačenja oziroma slabljenja vhodnega signala glede na frekvenco vhodnega signala

Iz rezultatov (slika 3.7) lahko sklepamo, da je prisotno zelo šibko slabljenje vhodnega signala v frekvenčnem območju, kjer poteka elektrogenska transfekcija (območje med prekinjenima črtama na sliki 3.7). Največje odstopanje je 0,03 dB, kar ne predstavlja nobenih omejitev za izvedbo uspešne elektrogenske transfekcije.

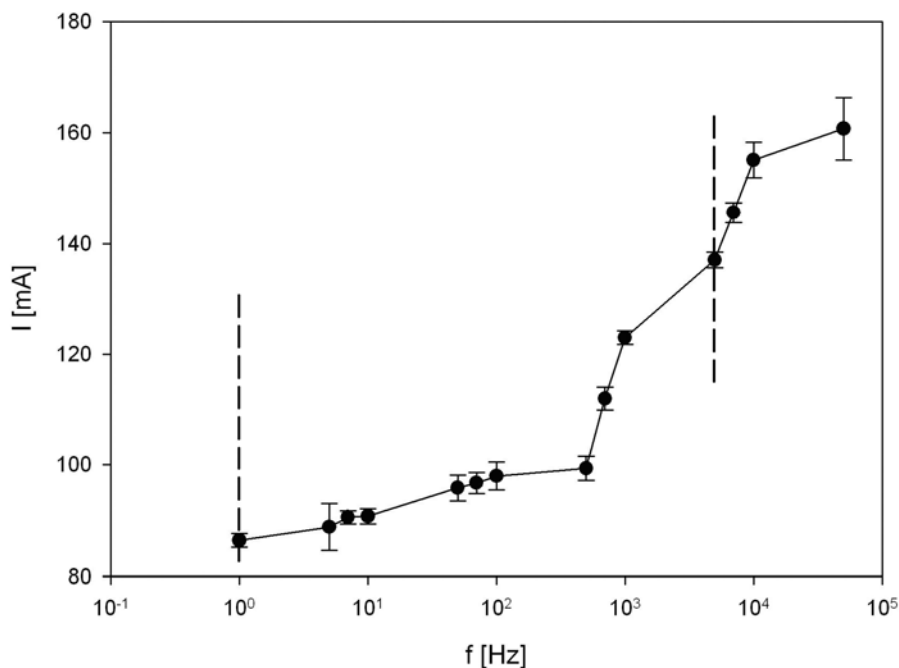


Slika 3.7 Amplitudni del Bodejevega diagrama na izhodu napetostnega preklopnika. Pomembno frekvenčno območje za elektrogensko transfekcijo je označeno med prekinjenima črtama. Vsaka točka na sliki predstavlja povprečje treh poizkusov.

Podobno kot pri uvodnih meritvah potek grafa ni tipičen Bodejev diagram, kjer pričakujemo, da se slabljenje z višjimi frekvencami povečuje. Tudi v tem primeru sem sklepal, da je naše frekvenčno območje kljub razponu štirih dekad še vedno v območju, kjer komponente napetostnega preklopnika še ne kažejo popačenj in slabljenj.

3.2.2 Odvisnost napajalnega toka glede na vhodno frekvenco signala

V tem delu meritev sem predvsem proučeval povprečje napajalnega vhodnega toka, ki ga napetostni preklopnik potrebuje za nemoteno delovanje pri preklupu vseh desetih močnostnih krmilnikov.



Slika 3.8 Odvisnost vhodnega napajalnega toka glede na vhodno frekvenco signala. Pomembno frekvenčno območje za elektrogensko transfekcijo je označeno med prekinjenima črtama. Vsaka točka predstavlja povprečje treh poizkusov.

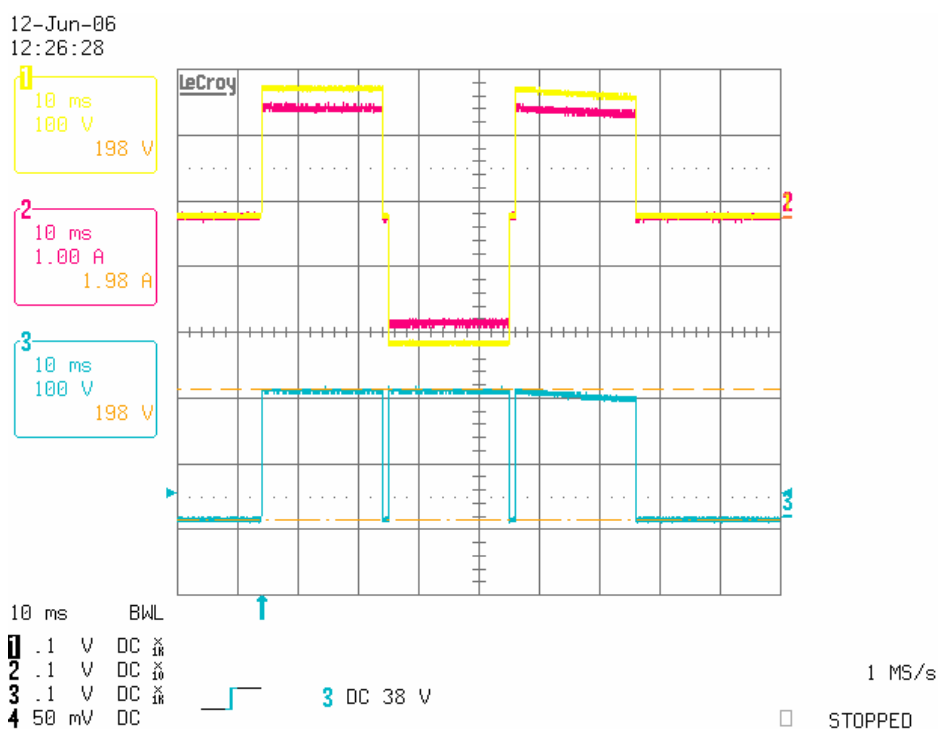
Potek grafa (slika 3.8) je podoben rezultatu meritev vhodnega napajalnega toka močnostnega krmilnika (slika 3.2). Razlika je v večjih vrednosti toka pri napetostnem preklopniku, kjer imamo povezanih deset močnostnih krmilnikov. Ker je napetostni preklopnik med preklapljanjem normalno deloval, sem s to meritvijo dokazal, da ne bomo imeli težav pri oskrbi elementov napetostnega preklopnika z napajalnim tokom.

3.3 Preizkus napetostnega preklopnika v sistemu Angioskin

V preizkusu napetostnega preklopnika v sistemu Angioskin sem želel proučiti, kako uspešno se napetostni preklopnik znajde kot ključna komponenta v končnem sklopu sistema, ki ga bomo uporabljali za elektrogensko transfekcijo.

3.3.1 Visokonapetostno območje sistema Angioskin

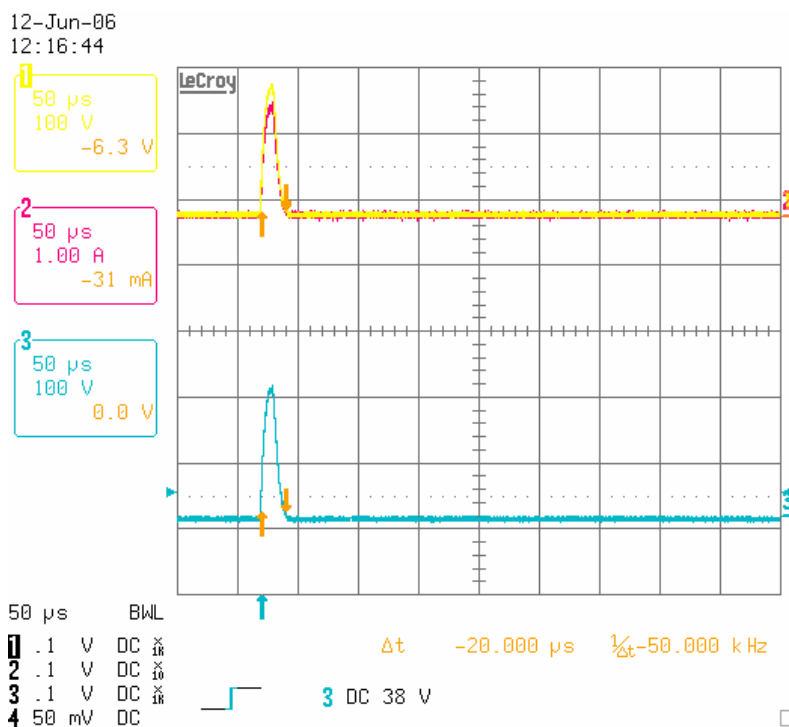
Pri prvi meritvi prvega sklopa sem preizkusil sitem Angioskin ob največji vrednosti amplitude pravokotnega pulza 200 V. Dolžina vhodnega psravokotnega pulza je znašala 20 ms ob frekvenci 48 Hz. Rezultat je prikazan na sliki 3.9.



Slika 3.9: Prikaz pravokotnega vhodnega in izhodnega signala z amplitudo 198 V, dolžino 20 ms in frekvenco 48 Hz. Tok je ob največji vrednosti amplitude signala znašal 1,98 A. Na osciloskopu je bil na prvi kanal priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem napajalni tok (obarvan rdeče) in na tretjem vhodni signal (obarvan modro).

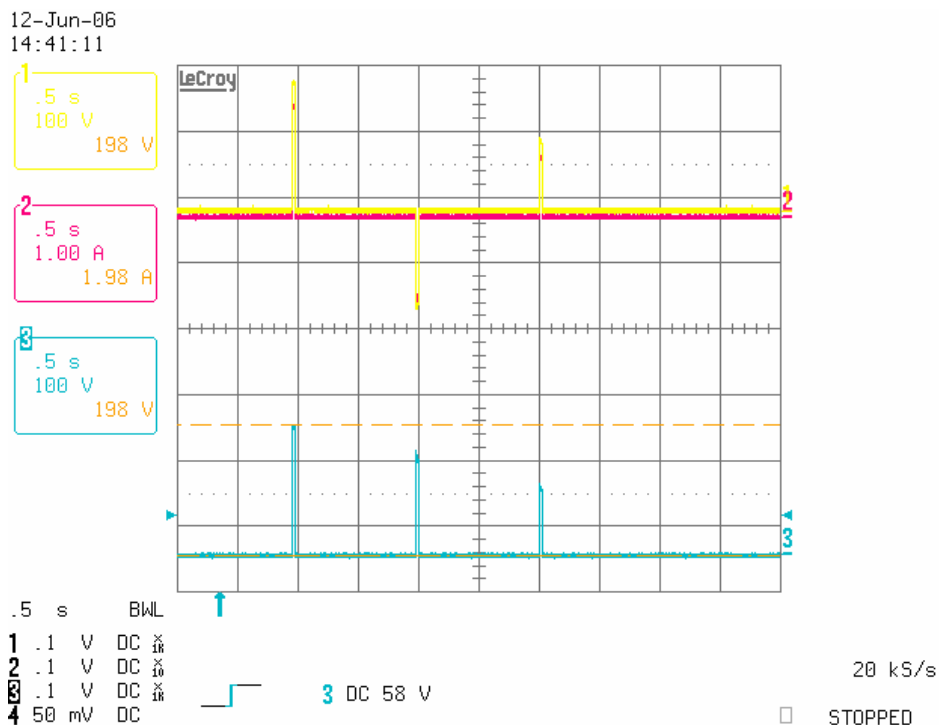
Iz rezultatov sklepam, da sistem Angioskin ni bil zmožen generirati treh enakih pravokotnih napetostnih pulzov z amplitudo 200 V. Opazil sem, da se je tretjemu vhodnemu pulzu oslabila amplituda za 0,7 dB. Posledično napetostni preklopnik isti vlak treh pulzov prenese na izhod sistema. Ob največji amplitudi izhodne napetosti sem dosegel tudi največjo vrednost toka, ki teče skozi breme. Ob prvem pulzu z vrhom amplitude pri 198 V, je skozi breme 100 Ω stekel tok vrednosti 1,98 A. Med povezavami tranzistorjev na tiskanem vezju napetostnega preklopnika ni prišlo do preboja kljub največji vrednosti toka.

Pri drugi meritvi sem uporabil napetostne pulze z najkrajšo dolžino $20\ \mu\text{s}$. Vrednost amplitude je znašala $200\ \text{V}$ pri frekvenci $1\ \text{kHz}$. Rezultati so prikazani na sliki 3.10. Oblika napetostnega pulza pri tako ozki dolžini ni več podobna pravilnemu pravokotnemu napetostnemu pulzu. Dolžina ($20\ \mu\text{s}$) in amplituda ($201\ \text{V}$) vhodnega in izhodnega signala sta bili identični. Tok, ki je tekkel skozi upor, je ob najvišji vrednosti amplitude signala znašal $2,01\ \text{A}$. Tudi tokrat ni prišlo do preboja.



Slika 3.10: Prikaz pravokotnega vhodnega in izhodnega signala z amplitudo $200\ \text{V}$, dolžino $20\ \mu\text{s}$ in frekvenco $1\ \text{kHz}$ in tokom $2,01\ \text{A}$. Na osciloskopu je bil na prvi kanal priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem napajalni tok (obarvan rdeče) in na tretjem vhodni signal (obarvan modro). Ker je perioda signala znašala $1\ \text{ms}$ in dolžina enega pulza $20\ \mu\text{s}$, se pri izbrani časovni osi osciloskopa ($500\ \mu\text{s}$) vidi samo en napetostni pulz.

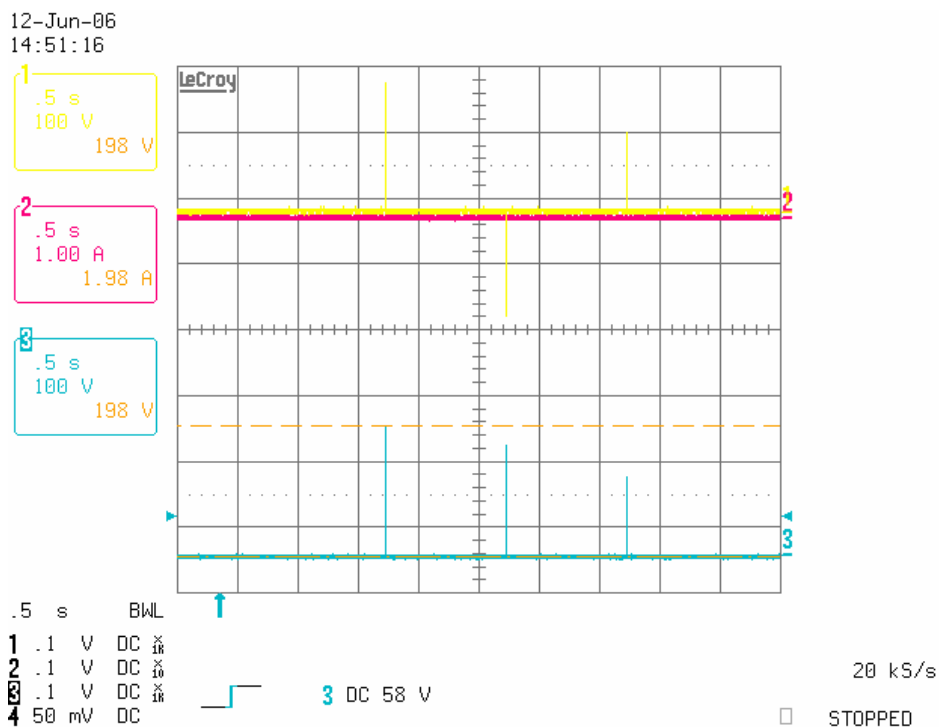
Pri zadnjih dveh meritvah visokonapetostnega območja sem preizkusil delovanje sistema pri najmanjši frekvenci 1 Hz. Amplituda je pri obeh meritvah znašala 200 V. Spreminjal sem le dolžino pulza, ki je bila pri predzadnji meritvi najkrajša, pri zadnji pa najdaljša.



Slika 3.11: Prikaz pravokotnega vhodnega in izhodnega signala z amplitudo 200 V, dolžino 20 ms in frekvenco 1 Hz. Tok je ob največji amplitudi signala znašal 1,98 A. Na osciloskopu je bil na prvi kanal priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem napajalni tok (obarvan rdeče) in na tretjem vhodni signal (obarvan modro).

Iz rezultatov (slika 3.11) lahko sklepam, da tudi pri najnižji frekvenci visokonapetostnega območja amplituda začne upadati. Pri drugem napetostnem pulzu sem zaznal slabljenje 2 dB, pri tretjem 5 dB. Z upadanjem amplitude se posledično zmanjšuje tudi tok. Pri prvem pulzu je znašal 1,98 A, pri drugem 1,48 A in pri tretjem 1,12 A. Vhodni in izhodni signal napetostnega preklopnika sta bila identična.

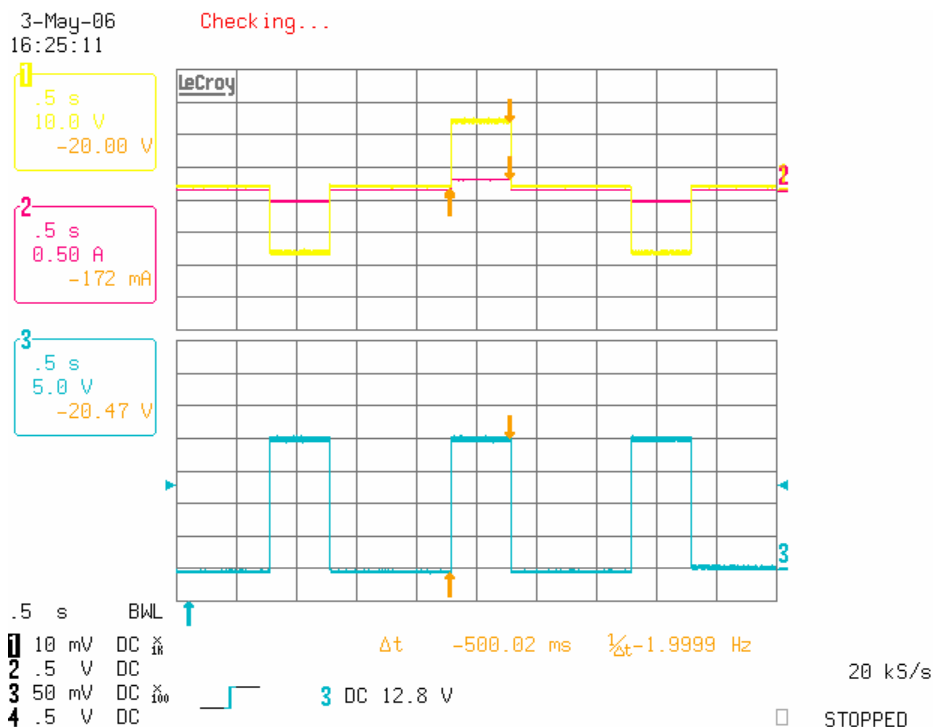
Na koncu meritev visokonapetostnega območja sem še preizkusil delovanje sistema Angioskin pri frekvenci 1 Hz in najkrajši dolžini napetostnih pulzov. Rezultati so prikazani na sliki 3.12. Podobno kot pri predzadnji meritvi, sem tudi tukaj zaznal slabljenje amplitude. V tem primeru je slabljenje drugega signala znašalo 1 dB, tretjega 4 dB.



Slika 3.12: Prikaz pravokotnega vhodnega in izhodnega signala z amplitudo 200 V, dolžino 20 μ s in frekvenco 1 Hz. Tok je ob največji amplitudi signala znašal 1,98 A. Na osciloskopu je bil na prvi kanal priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem napajalni tok (obarvan rdeče) in na tretjem vhodni signal (obarvan modro).

3.3.2 Niskonapetostno območje sistema Angioskin

Rezultat prve meritve pri kateri sem vhod vzbujal s tremi pravokotnimi signali amplitude 20 V in dolžine 500 ms je prikazan na sliki 3.13. Frekvenca signala je znašala 0,67 Hz. Po vsakem pulzu sem zamenjal polariteto. Vrednosti amplitude in dolžine pulza nas postavijo v zgornjo mejo zahtev niskonapetostnega območja.

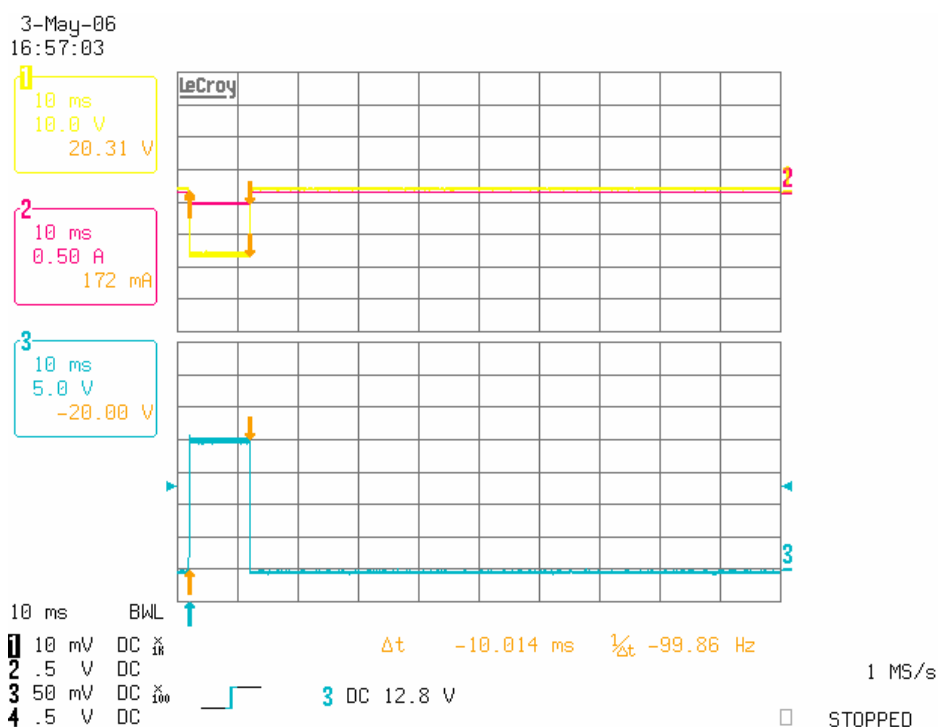


Slika

3.13 Prikaz pravokotnega vhodnega in izhodnega signala z amplitudo 20 V, dolžino 500 ms in frekvenco 0,67 Hz. Tok skozi breme je ob napetostnem pulzu znašal 172 mA. Na osciloskopu je bil na prvi kanal priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem napajalni tok (obarvan rdeče) in na tretjem vhodni signal (obarvan modro).

Primerjava med vhodnim in izhodnim signalom je pokazala, da se karakteristike signalov ujemajo. Dolžina signalov in frekvenca sta ostali enaki, spremenila se je le amplituda, kar pomeni, da se je na izhodu oslabil vhodni signal za sicer zanemarljivih 0,2 dB. Tok skozi breme je znašal 172 mA. Menjavo polaritete sem zaznal na izhodu kot zrcaljenje vhodnega signala čez horizontalno časovno os.

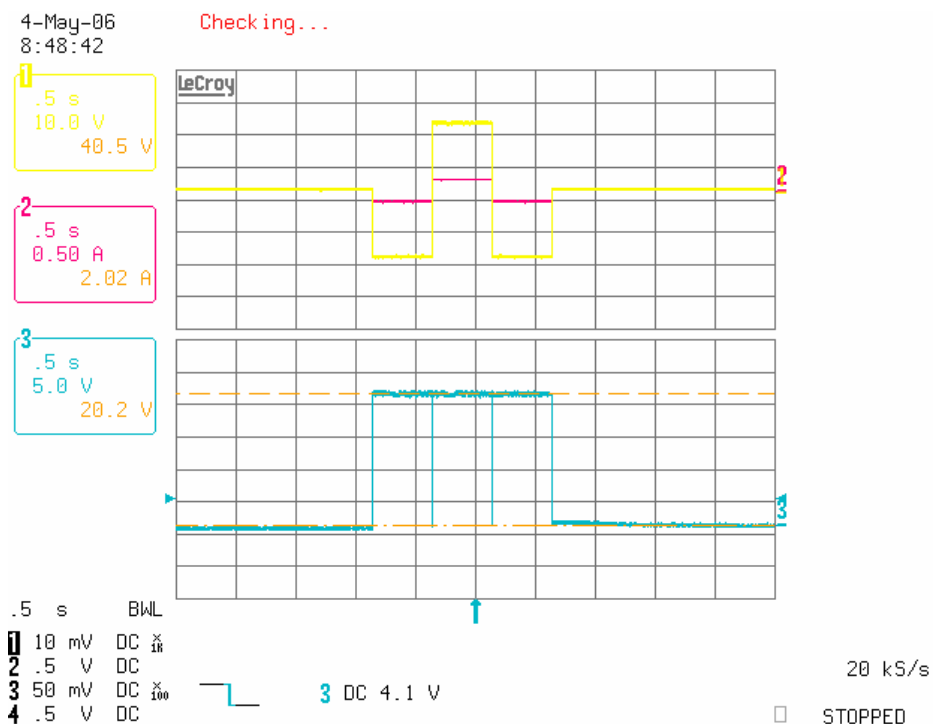
Pri drugi meritvi sem skrajšal dolžino pulzov na najnižjo zahtevano vrednost 10 ms (slika 3.14). Amplituda pulzov in frekvenca sta ostali enaki.



Slika 3.14 Prikaz pravokotnega vhodnega in izhodnega signala z amplitudo 20 V, dolžino 10 ms in frekvenco 1 Hz. Tok skozi breme je ob napetostnem pulzu znašal 172 mA. Na osciloskopu je bil na prvi kanal priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem napajalni tok (obarvan rdeče) in na tretjem vhodni signal (obarvan modro). Ker je perioda signala znašala 1 s in dolžina enega pulza 10 s, se pri izbrani časovni osi osciloskopa (100 ms) vidi samo en napetostni pulz.

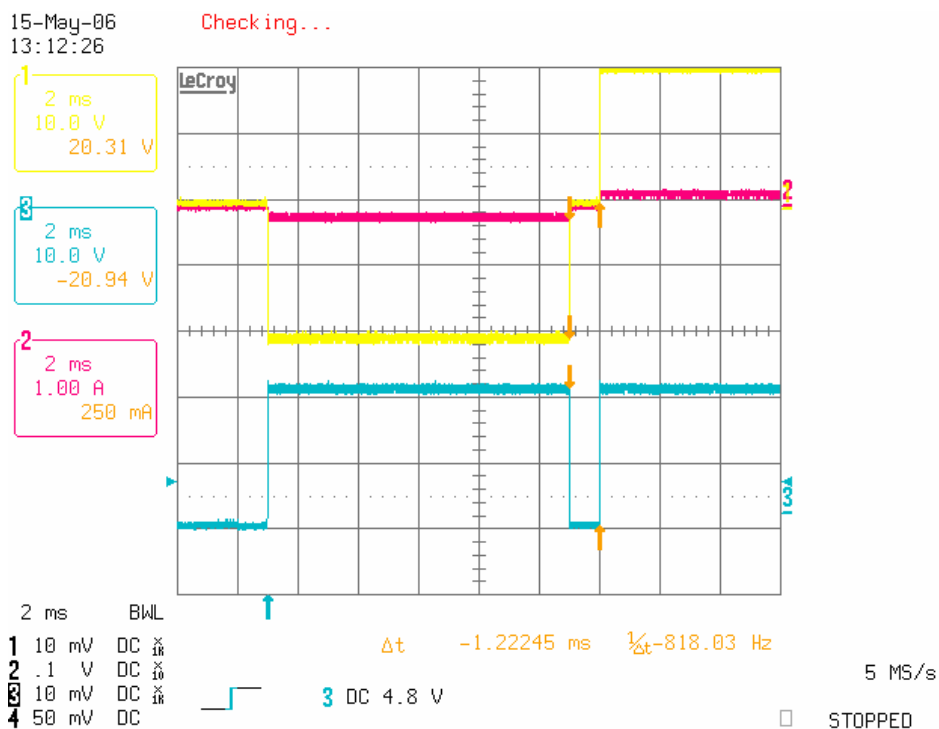
Pri nizki vrednosti dolžine pulza se je amplituda izhodnega signala oslabila za 0,1 dB. To je za uspešno elektrogensko transfekcijo zanemarljivo odstopanje. Frekvenca in dolžina pulza izhodnega signala sta bili enaki vhodnemu. Tok izhodnega signala je znašal 172 mA. Na podlagi rezultatov prvih dveh meritev sem lahko predpostavil, da sprememba dolžine pulza vhodnega signala pri isti frekvenci in amplitudi nima negativnega vpliva na karakteristiko izhodnega signala.

Pri naslednji meritvi sem poleg amplitude, dolžine in frekvence pulza meril tudi najkrajšo pavzo, ki jo lahko dosežemo s sistemom Angioskin med dvema napetostnima pulzoma s spreminjajočo se polariteto. Napetostni pulz je imel dolžino 500 ms in vrednost amplitude 20 V.



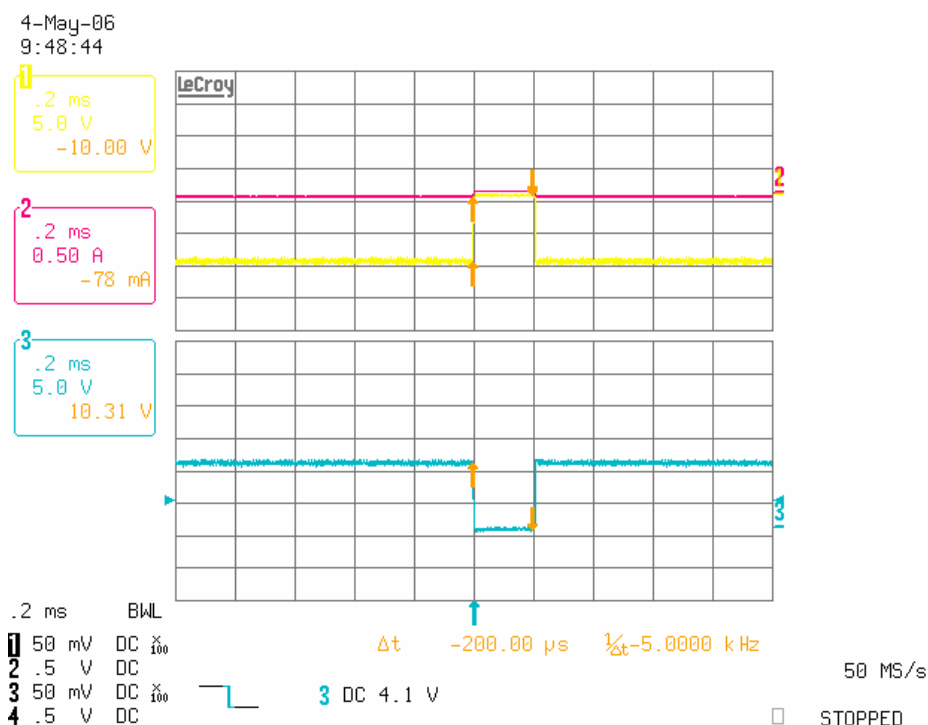
Slika 3.15 Prikaz pravokotnega vhodnega in izhodnega signala z amplitudo 20 V, dolžino 500 ms in frekvenco 2 Hz. Tok skozi breme je ob napetostnem pulzu znašal 172 mA. Na osciloskopu je bil na prvi kanal priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem napajalni tok (obarvan rdeče) in na tretjem vhodni signal (obarvan modro).

Rezultati meritve so pokazali (slika 3.15), da se je amplituda izhodnega signala povišala za 0,05 V, kar pomeni, da se je vhodni signal ojačal za 0,02 dB. Tako majhna ojačitev ne prinaša negativnih pojavov za uspešno elektrogensko transfekcijo. Tok skozi breme je znašal 172 mA. Pri podrobni analizi signala (slika 3.16) sem ugotovil, da je najkrajša pavza med dvema pulzoma s spreminjajočo se polariteto 1,22 ms.



Slika 3.16 Podrobnejši prikaz pavze med dvema napetostnima pulzoma s spreminjajočo se polariteto z vrednostjo amplitude 20 V in dolžine 500 ms. Izmerjena najkrajša pavza je znašala 1,22 ms. Tok skozi breme je ob napetostnem pulzu znašal 172 mA. Na osciloskopu je bil na prvi kanal priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem napajalni tok (obarvan rdeče) in na tretjem vhodni signal (obarvan modro).

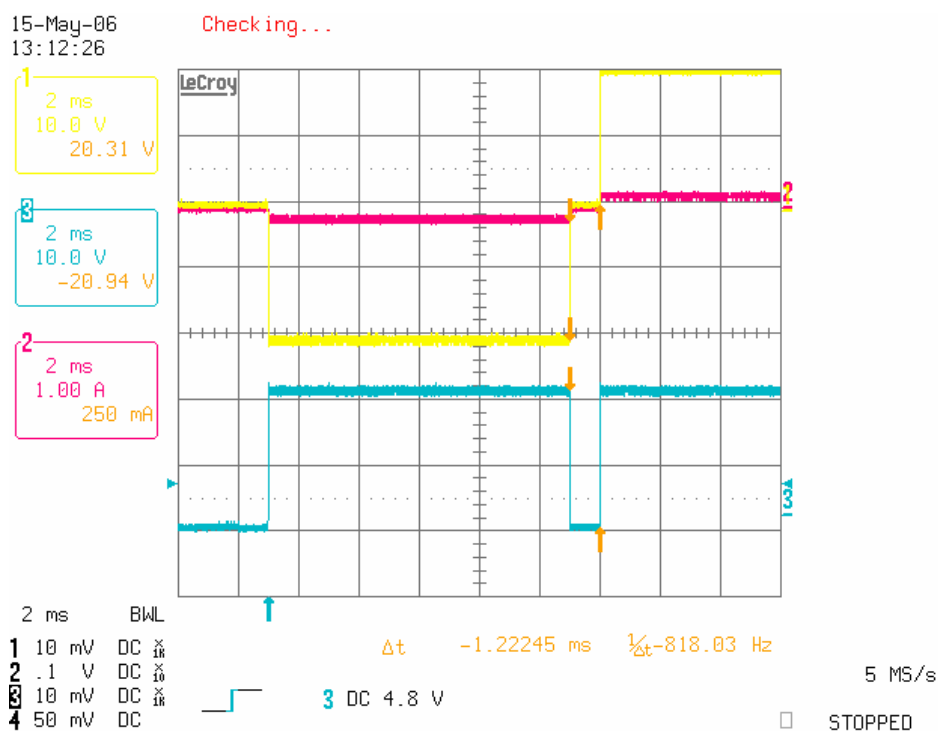
Meritev sem ponovil z napetostnimi pulzi, ki se jim ne spreminja polariteta. Tudi tukaj nas je predvsem zanimala najkrajša pavza med dvema napetostnima pulzoma, ki jo lahko dosežemo s sistemom Angioskin. Rezultat je prikazan na sliki 3.17.



Slika 3.17 Podrobnejši prikaz pavze med dvema napetostnima pulzoma, ki imata enako polariteto. Amplitude signala je bila 10 V in dolžina 500 ms. Izmerjena najkrajša pavza je znašala 200 μs . Tok skozi breme je ob napetostnem pulzu znašal 78 mA. Na osciloskopu je bil na prvi kanal priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem napajalni tok (obarvan rdeče) in na tretjem vhodni signal (obarvan modro).

Najkrajša izmerjena pavza med dvema napetostnima pulzoma, ki imata enako polariteto, je 200 μs . V primerjavi z napetostnimi pulzi s spreminjajočo polariteto lahko dosežemo s pulzi enake polaritete 6,1-krat krajšo pavzo.

Pri zadnji meritvi sem uporabil vhodni signal frekvence 91 Hz in dolžine 10 ms, kar je najkrajša dolžina pulzov nizkonapetostnega območja.

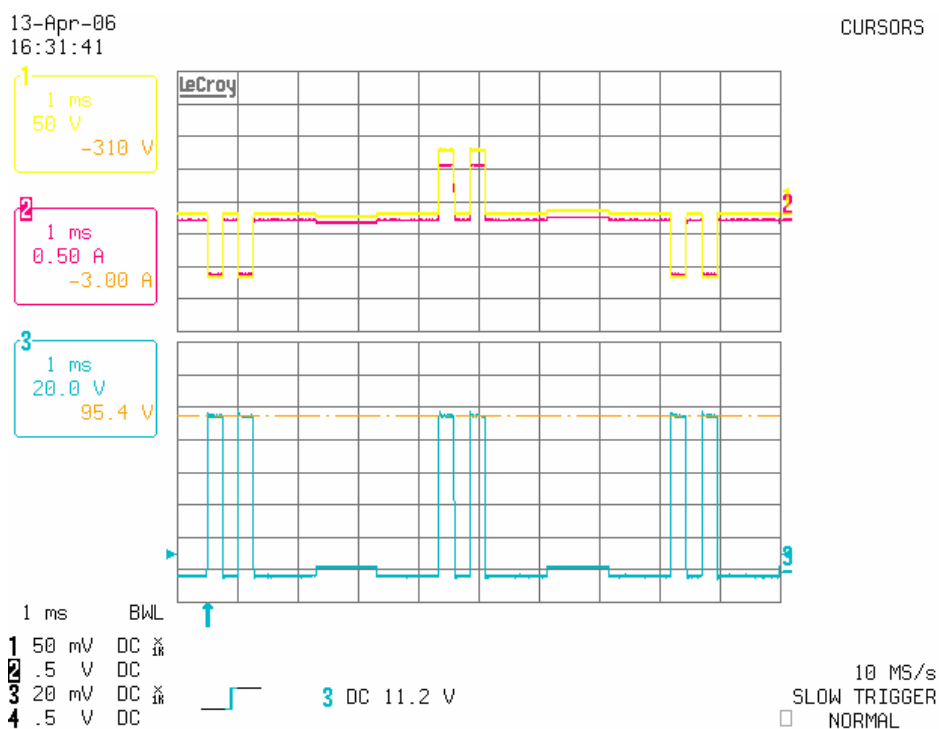


Slika 3.18 Prikaz pravokotnega vhodnega in izhodnega signala z amplitudo 20 V, dolžino 10 ms in frekvenco 91 Hz. Tok skozi breme je ob napetostnem pulzu znašal 250 mA. Na osciloskopu je bil na prvi kanal priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem napajalni tok (obarvan rdeče) in na tretjem vhodni signal (obarvan modro).

Iz rezultatov (slika 3.18) sklepamo, da je napetostni preklopnik vhodni signal oslabil za zanemarljivih 0,3 dB. Vrednosti dolžine pulza in frekvence signala sta se ohranila. Ob vklopu vhodnega signala je začel teči skozi breme tok 250 mA, kar predstavlja osmino največje dovoljene vrednosti toka. Vrednost je pričakovana glede na ohmsko vrednost bremena in amplitudo izhodnega signala.

3.3.3 Vlak nizkonapetostnih in visokonapetostnih pulzov

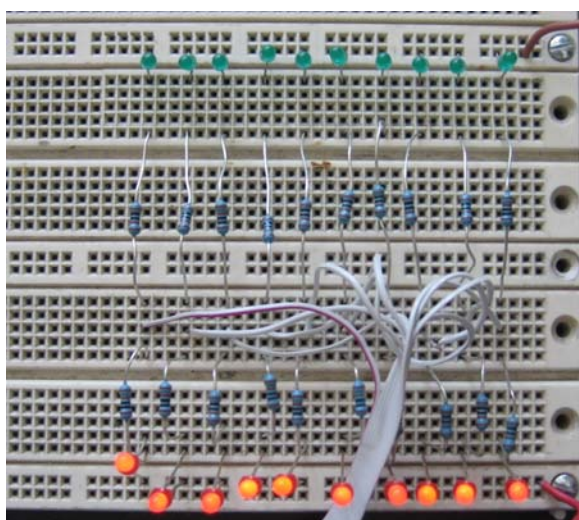
Na vhod sistema Angioskin sem poslal vlak visoko in nizkonapetostnih pulzov. Zanimala me je vernost prenosa vlaka pulzov na izhod. Rezultat meritve je prikazan na sliki 3.19. Natančna vrednost vhodnega visokonapetostnega pulza je znašala 95,4 V, nizkonapetostnega 5 V. Skozi celoten vlak amplituda tako visokonapetostnih kot nizkonapetostnih pulzov ni padala. Na izhodu nisem zaznal slabljenja oziroma ojačenja pulzov. Tudi dolžina in frekvenca pulzov se na izhodu nista spremenili. Tok je ob visokonapetostnem pulzu znašal 0,96 A in pri nizkonapetostnem 0,05 A.



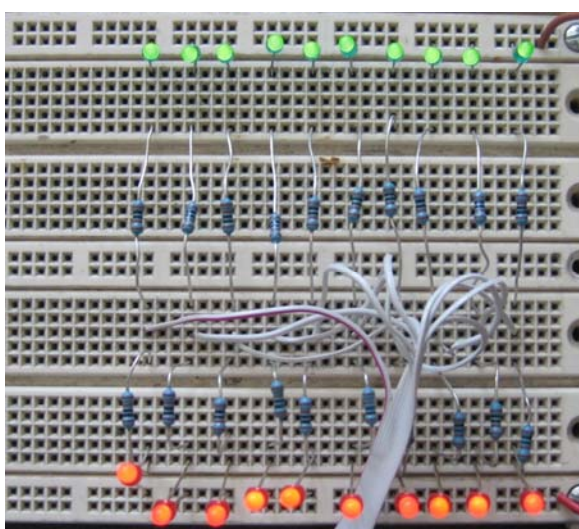
Slika 3.19: Prikaz vlaka visoko in nizkonapetostnih pulzov. Amplituda visokonapetostnih pulzov znaša 95,4 V, nizkonapetostnih 5 V. Dolžina visokonapetostnih je 250 μ s, nizkonapetostnih 1 ms. Frekvenca visokonapetostnih je 2 kHz. Premor med visokonapetostnima pulzoma in nizkonapetostnim je 1 ms. Tok je ob visokonapetostnem pulzu znašal 0,96 A in ob nizkonapetostnem 0,05 A. Na osciloskopu je bil na prvi kanal priključen izhodni signal (obarvan rumeno), na drugem napajalni tok (obarvan rdeče) in na tretjem vhodni signal (obarvan modro).

3.3.4 Preizkus vklapljanja različnih izhodov napetostnega preklopnika

Rezultati preizkusa so pokazali, da preklapljanje med izhodi napetostnega preklopnika deluje pravilno. V primeru pozitivnega napetostnega pulza so se prižgale zelene diode, v primeru negativnega rdeče (slika 3.20). Če sem imel močnostne krmilnike ugasnjene, smo na izhodu napetostnega preklopnika dobili visoko impedančno stanje. V tem primeru imamo zaključen tokokrog preko nasprotno ležečih diod, kar prižge zelene in rdeče diode (slika 3.21). Tako sem lahko hitro preverjal napake pri spajkanju električnih elementov na tiskani ploščici napetostnega preklopnika. V primeru nepravilnega prižiganja diod, sem lahko omejil iskanje napake na električne elemente vezane na posamezen izhod. Na ta način sem funkcijsko preveril delovanje vseh desetih izdelanih napetostnih preklopnikov, ki jih bomo uporabili v prototipnih sistemih Angioskin.



Slika 3.20: Negativni napetostni pulzi na vseh desetih izhodih prižgejo rdeče diode.



Slika 3.21: Ugasnjeni močnostni krmilniki na izhod pošljejo visoko impedančno stanje in prižgejo vse diode.

4 RAZPRAVA

Namen naloge je bil izdelati napetostni preklopnik, ki bo s svojimi električnimi lastnostmi v sistemu Angioskin zagotavljal krmiljenje elektrod za uspešno elektrogensko transfekcijo. Primernost končnega napetostnega preklopnika sem določil z različnimi meritvami električnih parametrov.

Pred načrtovanjem napetostnega preklopnika sem moral preizkusiti močnostni krmilnik. S svojim delovanjem - preklapljanjem predstavlja osnovno funkcijo napetostnega preklopnika. Ta element predstavlja bistveno razliko med novim in starim napetostnim preklopnikom, ki je uporabljal za preklapljanje med napetostnimi pulzi releje. Močnostni krmilnik se je po uvodnem preizkusu izkazal za primernega, ker v celotnem frekvenčnem območju (od 1 Hz do 5 kHz) ne izkazuje slabljenja amplitude. Poleg slabljenja signala sem meril tudi vhodni tok, ki je potreben za napajanje močnostnih krmilnikov. Izsledke meritev sem nato uporabil za načrtovanje napetostnega preklopnika. Zagotoviti sem moral potrebno napajanje oziroma delovanje vseh desetih močnostnih krmilnikov napetostnega preklopnika. To sem rešil z ločenim napajanjem močnostnih krmilnikov in ostalih elementov. Zaradi varnosti sem napetostni preklopnik razdelil na dva med seboj galvansko ločena dela, analognega (visoko in nizkonapetostni pulzi) in digitalnega (krmilni signali).

Ko je bil napetostni preklopnik izdelan, sem pričel z meritvami električnih lastnosti. Prva meritev je bila ponovitev uvodnega preizkusa močnostnih krmilnikov. Rezultati so bili pričakovano zelo podobni uvodnim. Napetostni preklopnik deluje normalno v celotnem frekvenčnem območju in ne izkazuje slabljenja signala. Tudi pri napajanju vseh desetih močnostnih krmilnikov nisem zaznal težav. Napetostnemu preklopniku sem nato dodal še ostale elektronske komponente, potrebne za ustvarjanje visokonapetostnih pulzov, in dobil sistem Angioskin. Sistem sem upravljal preko računalnika, kjer sem nastavil amplitudo, dolžino, frekvenco in polariteto napetostnega pulza. Tukaj velja omeniti, da program za krmiljenje sistema ne dopušča zveznega nastavljanja vrednosti parametrov vhodnega signala. Tako mi ponekod ni uspelo nastaviti določenega parametra na zeleno vrednost, npr. amplitude nisem mogel nastaviti na 50 V, ampak samo na 49 V oziroma 51 V.

Prvi sklop meritev je bil namenjen visokonapetostnem območju. Napetostni preklopnik v tem območju ni imel težav. Edine omejitve, ki sem jih zaznal, so bile povezane z ostalimi komponentami sistema Angioskin. Ojačevalnik in nizkonapetostni napajalnik nista bila zmožna generirati več visokonapetostnih pulzov s konstantno amplitudo 200 V. Kljub slabljenju sem lahko pri najvišji napetosti dosegel največji tok, ki lahko teče skozi breme. Izkazalo se je tudi, da je bil napetostni preklopnik pravilno načrtovan, saj v tistem trenutku med povezavami električnih elementov napetostnega preklopnika ni prišlo do preboja.

V drugem sklopu meritev sistema Angioskin sem meril slabljenje nizkonapetostnih pulzov in vhodni tok. Največje slabljenje, ki sem ga dobil, je znašalo 0,3 dB. To je zanemarljivo majhno in ne predstavlja omejitve za izvedbo uspešne elektrogenske transfekcije. Ko sem med meritvami povečeval frekvenco, sem naletel na težavo. Sistem Angioskin ima zaradi fiksne razmerja pavza-pulz omejitve pri generiranju napetostnih pulzov s krajšimi pavzami in daljšimi pulzi. To izhaja še iz sistema Cliniporator, ki predstavlja osnovo sistema Angioskin. Cliniporator je za svojo

funkcijo (elektroporacijo) generiral pulze, ki so v povprečju veliko krajši od pulzov, ki jih želimo generirati s sistemom Angioskin. Zaradi tega že pri zelo kratkih pulzih dosežemo zgornjo mejo pavze, ki znaša 1,22 ms za pulze s spreminjajočo polariteto in 200 μ s za pulze z enako polariteto. Ker v našem primeru najkrajša dolžina pulzov znaša 20 μ s, lahko pri generiranju napetostnih pulzov z enako polariteto dosežemo največjo frekvenco 4,6 kHz. Rezultati uvodnega preizkusa močnostnih krmilnikov in napetostnega preklopnika kažejo, da lahko napetostni preklopnik deluje tudi pri višjih frekvencah, vendar bo za delovanje sistema Angioskin v višjem frekvenčnem območju potrebno posodobiti ostale komponente sistema.

V tretjem sklopu meritev sem proučeval kako uspešno sistem Angioskin posreduje vlak pulzov različnih amplitud in dolžin. Rezultati so pokazali, da v tem primeru deluje napetostni preklopnik v povezavi z ostalimi komponentami sistema Angioskin brezhibno. Slabljenja ni bilo zaznati, dolžina in frekvenca pulza sta ohranili svojo vrednost.

Ker sem v okviru projekta Angioskin izdelal deset napetostnih preklopnikov, sem v zadnjem delu meritev preizkusili zmožnost preklapljanja med izhodi napetostnih preklopnikov. Metoda s prižiganjem diod se je izkazala za zelo hitro in učinkovito pri odkrivanju napak spajkanja posameznih elektronskih elementov napetostnega preklopnika. Ko sem preveril vseh deset kartic, so se na vseh desetih izhodih napetostnega preklopnika signali preklapljali v skladu z vnaprej določenim vrstnim redom. Napetostni preklopniki torej brez težav vklaplajo in izklaplajo posamezne izhode.

5 ZAKLJUČEK

Cilj raziskovalne naloge je bila izdelava novega napetostnega preklopnika, ki bo s svojimi električnimi lastnosti zagotavljal krmiljenje mikroelektrod za uspešno elektrogensko transfekcijo. V ta namen sem preizkusil ustreznost ključnih električnih elementov in nato načrtoval, izdelal in preizkusil nov napetostni preklopnik.

Močnostni krmilniki, ki predstavljajo jedro napetostnega preklopnika, so se izkazali kot zelo hitri in učinkoviti elementi za krmiljenje elektrod. Rezultati uvodnih meritev močnostnega krmilnika kažejo, da je v celotnem frekvenčnem območju slabljenje amplitude in spreminjanje dolžine signala zanemarljivo. V primerjavi z releji, ki smo jih uporabljali pri starejših napetostnih preklopnikih, so hitrejši in dimenzijsko manjši, kar je pri načrtovanju napetostnega preklopnika z veliko izhodi zelo pomembno.

Rezultati meritev sistema Angioskin so pokazali, da je napetostni preklopnik najmočnejši člen verige električnih komponent, potrebnih za uspešno elektrogensko transfekcijo. Nekatero komponento sistema Angioskin še niso dovolj razvite, da bi delovale na nivoju zmoglosti našega napetostnega preklopnika. Nizkonapetostni napajalnik in ojačevalnik nista zmožna generirati niz visokonapetostnih pulzov konstantne amplitude. Druga težava je frekvenčna omejitev generiranja napetostnih pulzov s spreminjajočo se polariteto. Kljub temu sem preko rezultatov različnih meritev te raziskovalne naloge pokazal, da napetostni preklopnik v celotnem frekvenčnem območju uspešno krmili napetostne pulze različnih amplitud. Tudi preklapljanje med izhodi napetostnega preklopnika deluje brezhibno.

Prihodnjih izboljšav napetostnega preklopnika trenutno nimamo v načrtu. Pri vseh preizkusih v okviru te raziskovalne naloge nisem prišel do točke, kjer bi napetostni preklopnik odpovedal oziroma potreboval nadgradnjo. Edino spremembo napetostnega preklopnika, ki jo načrtujemo v okviru evropskega projekta Angioskin, je v izdelavi tiskanih ploščic. Zaradi boljše postavitve elektronskih elementov in širših električnih povezav bi bil smiseln prehod iz dveh slojev na štiri sloje. Tako bi tudi pridobili več prostora na kartici, ki bi bil potreben, če bi želeli napetostni preklopnik nadgraditi z dodatnimi izhodi.

Izdelani napetostni preklopnik s svojimi električnimi lastnostmi uspešno zagotavlja krmiljenje mikroelektrod pri elektrogenski transfekciji. Vseh deset kartic, ki sem jih izdelal v okviru te naloge, se bo v prvi fazi uporabljalo v prototipnih sistemih v raziskovalnih institucijah po Evropi. V drugi fazi se bo proizvodnja preusmerila v serijsko izdelavo, kar pomeni tudi začetek uporabe napetostnih preklopnikov v kliničnih napravah.

LITERATURA

Bureau, M.F., J. Gehl, V. Deleuze, L. M. Mir, D. Scherman. 2000. *Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1474:353-359

Faurie, C., M. Golzio, P. Moller, J. Teissié, M. P. Rols. 2003. *Cell and animal imaging of electrically mediated gene transfer*, *DNA Cell Biol.*, 22:777-783.

Ferber, D. 2001. *Gene therapy: Safer and virus-free?*, *Science*, 294:1638-1642.

Gallo, S. A., A. R. Oseroff, P. G. Johnson, S. W. Hui. 1997. *Characterization of electric-pulse-induced permeabilization of porcine skin using surface electrodes*, *Biophys. J.*, 72:2805-2811

Hristova, N. I., I. Tsoneva, E. Neumann. 1997. *Spingosine-mediated electroporative DNA transfer through lipid bilayers*, *FEBS*, 415:81-86.

Jadoul, A., J. Bouwstra, V. Préat. 1999, *Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum.*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 35:89-105

Jelen, N. 2003. *Genska terapija, Življenje in tehnika*, 5:17-23.

Klenchin, V. A., S. I. Sukharev, S. M. Serov, L. V. Chernomordik, Y. A. Chizmadzhev. 1991. *Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis*, *Biophys. J.*, 60:804-811.

Mir, L. M., M. F. Bureau, R. Rangara, D. Rouy, J.-M. Caillaud, P. Delaere, D. Branellec, B. Schwartz, D. Scherman. 1999. *High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses*, *Proceedings of National Academy of Science*, 96:4262-4267

Mir, L. M. 2000. *Therapeutic perspectives of in vivo cell electropermeabilization*, *Bioelectrochem.*, 53:1-10.

Miklavčič, D., T. Kotnik. 2004. *Electroporation for electrochemotherapy and gene therapy*, Rosch PJ, Markov MS, *Bioelectromagnetic Medicine*, Marcel Dekker, New York, 2004, pp. 637-656.

Miklavčič, D., D. Pucihar, M. Pavlovec, S. Ribarič, M. Mali, A. Maček-Lebar, M. Petkovšek, J. Nastran, S. Kranjc, M. Čemažar, G. Serša. 2005. *The effect of high frequency electric pulses on muscle contractions and antitumor efficiency in vivo for potential use in clinical electrochemotherapy*, *Bioelectrochemistry*, 65:121-128

- Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider.** 1982. *Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields*, EMBO J., 7(1):841-845.
- Pavšelj, N.** 2006. *Vnos genov v kožo z elektroporacijo*, Doktorska disertacija, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana
- Pavšelj, N., V. Prémat.** 2005. *DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse*, Journal of Controlled Release, 106:407-415
- Puc, M.** 1998. *Naprava za klinično elektroporacijo*, Prešernova naloga, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana.
- Pucihar, G., L. M. Mir, D. Miklavčič.** 2002. *The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electroporabilized cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy*, Bioelectrochemistry, 57:167-172
- Reberšek, M.** 2004. *Elektrogenska transfekcija v odvisnosti od ponavljalne frekvence pulzov in orientacije električnega polja*, Diplomsko delo, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana
- Reberšek, M.** 2001. *Elektroporacija z moduliranimi visokonapetostnimi električnimi pulzi*, Prešernova naloga, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana.
- Rubanyi, G.M.** 2001. *The future of human gene therapy*, Molecular Aspects of Medicine, 22:113-142
- Smole, F.** 2005. *Elementi polprevodniške elektronike*, Založba FE in FRI, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana.
- Šatkauskas, S., M. F. Bureau, M. Puc, A. Mahfoudi, D. Scherman, D. Miklavčič, L. M. Mir.** 2002. *Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporabilization and DNA electrophoresis*, Mol. Ther., 5(2):133-140.
- Šatkauskas, S., F. Andre, M. F. Bureau, D. Scherman, D. Miklavčič, L. M. Mir.** 2005. *Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of in vivo DNA electrotransfer*, Human Gene Therapy, 16:1194-1201
- Sukharev, S. I., V. A. Klenchin, S. M. Serov, L. V. Chernomordik, Y. A. Chizmadzhev.** 1991. *Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores*, Biophys J., 63:1320-1327
- Vanbever, R., V. Prémat.** 1999. *In vivo efficacy and safety of skin electroporation*, Advanced Drug Delivery Reviews, 35:77-88
- Vodovnik, L., D. Miklavčič, T. Kotnik.** 1998. *Biološki sistemi*, Založba FE in FRI, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana.

Xie, T. D., T. Y. Tsong. 1992. *Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection III: Electric parameters and other conditions for effective transfection*, Biophys. J., 63:28-34.

Spletne strani

lbk.fe.uni-lj.si

www.irf.com

www.ncbi.nlm.nih.gov

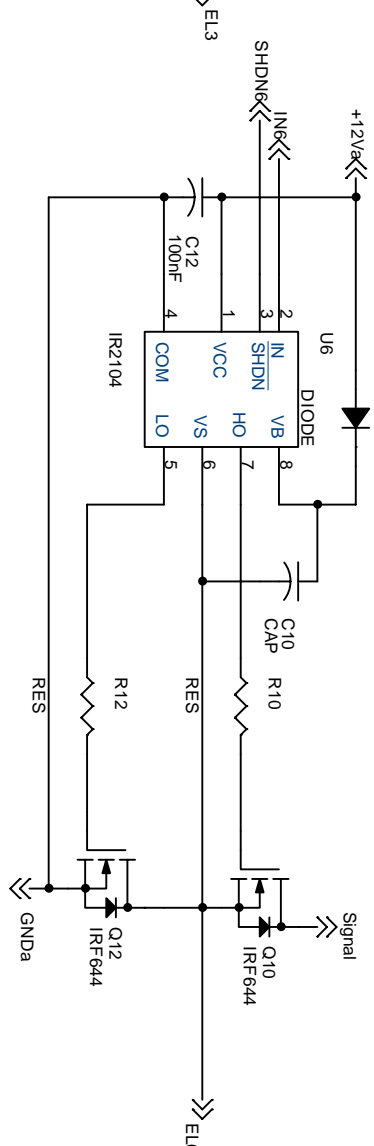
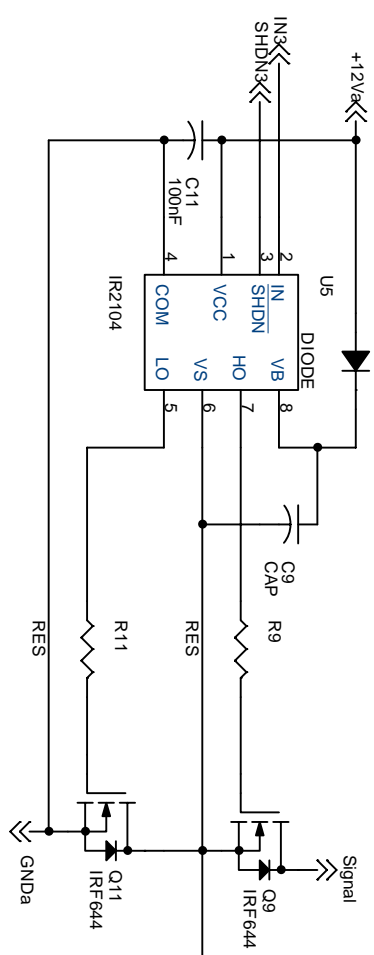
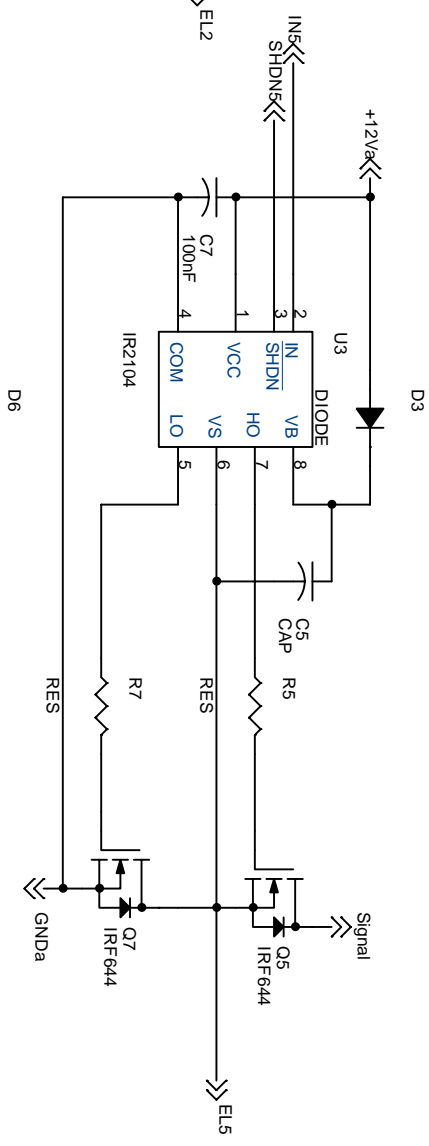
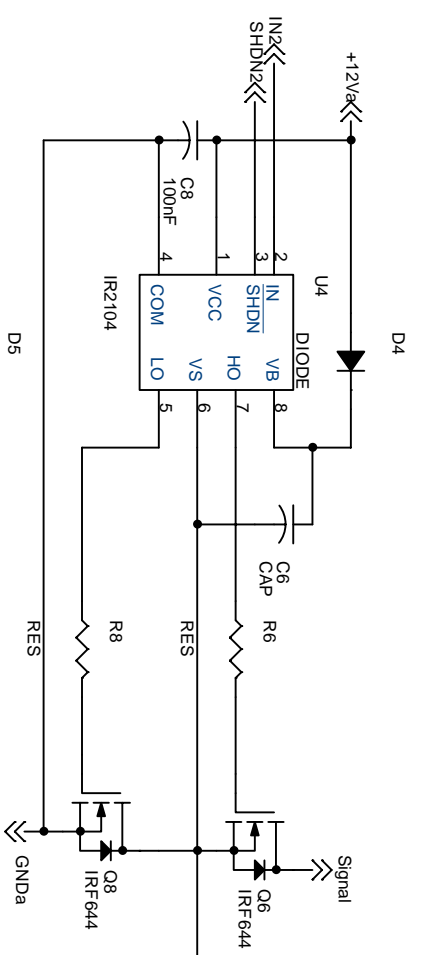
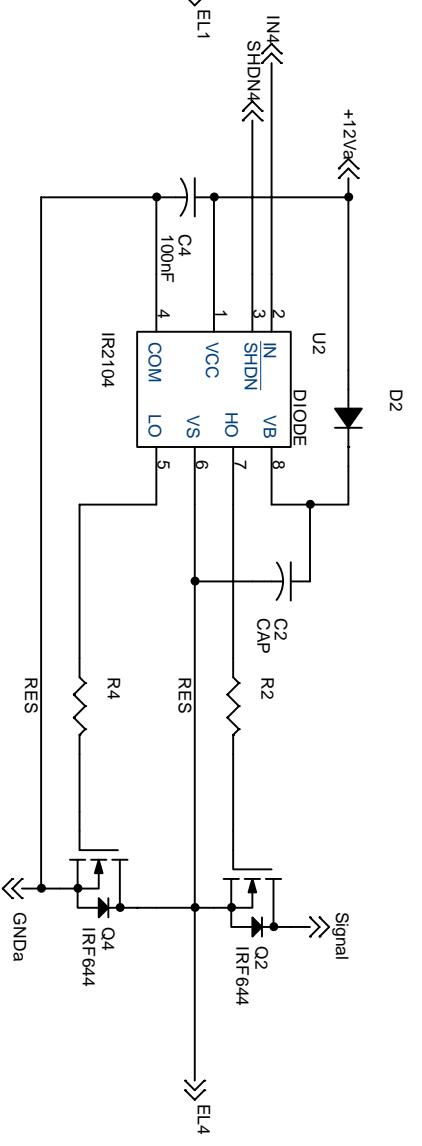
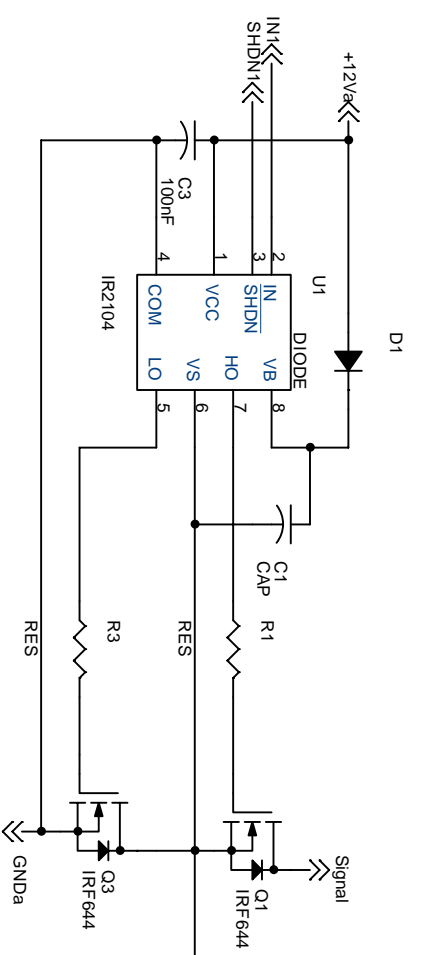
www.siemens.com

www.tracopower.com

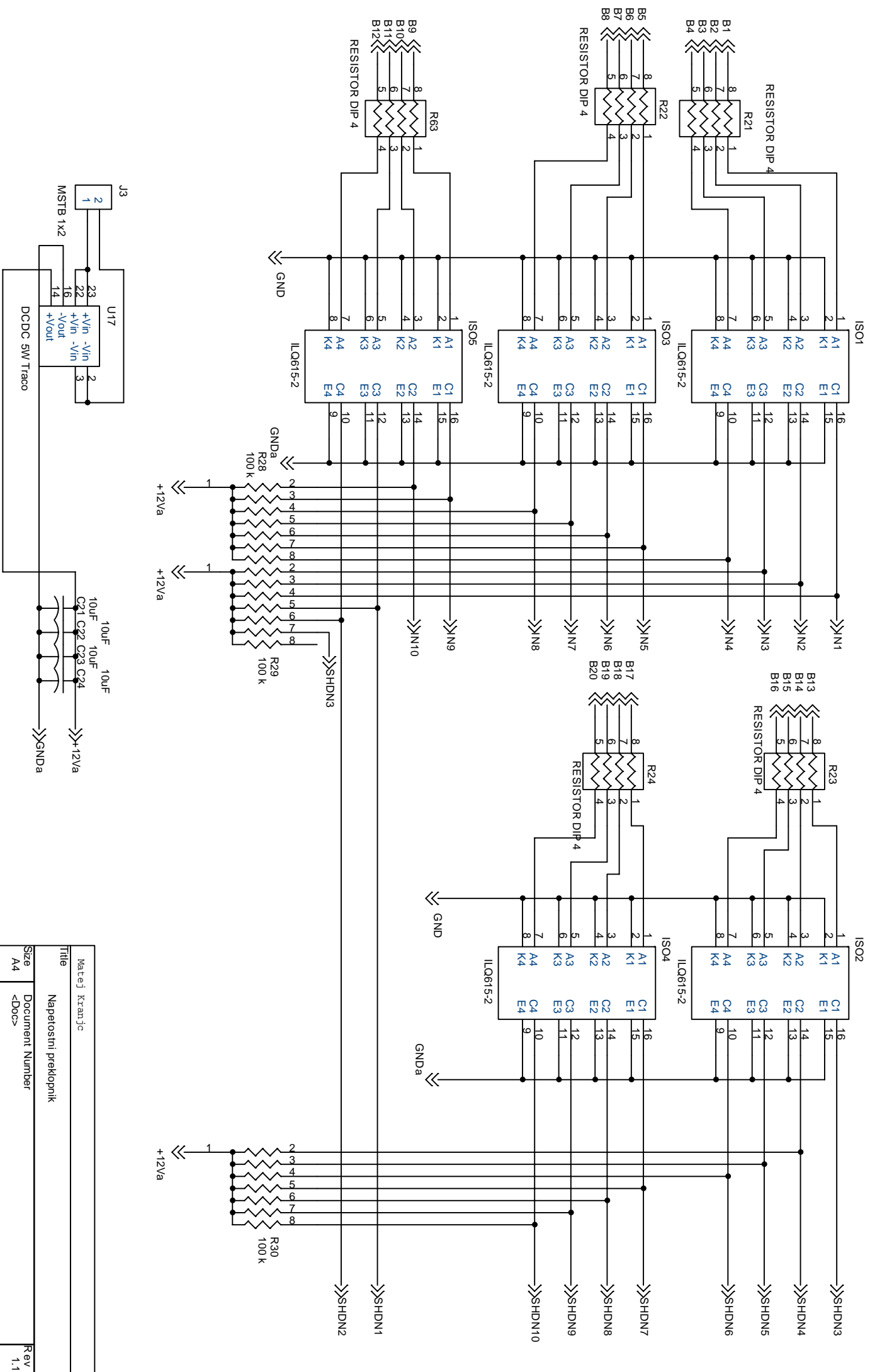
www.vishay.com

DODATEK

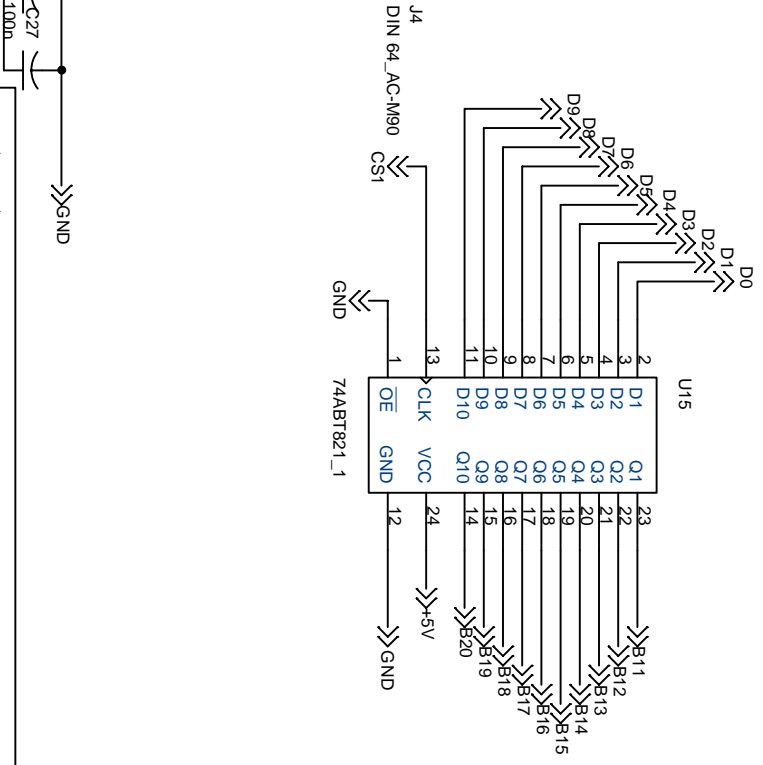
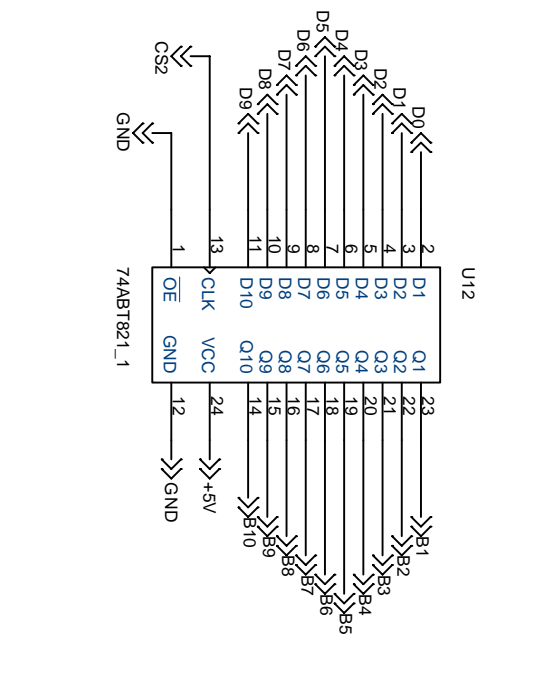
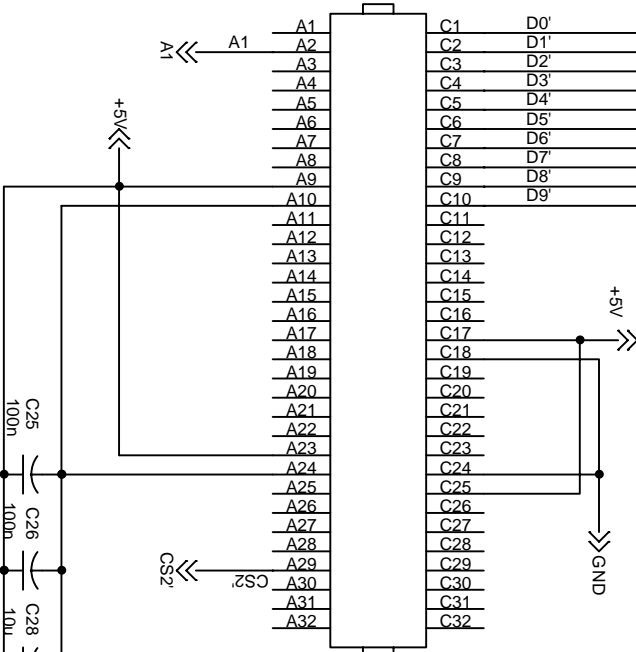
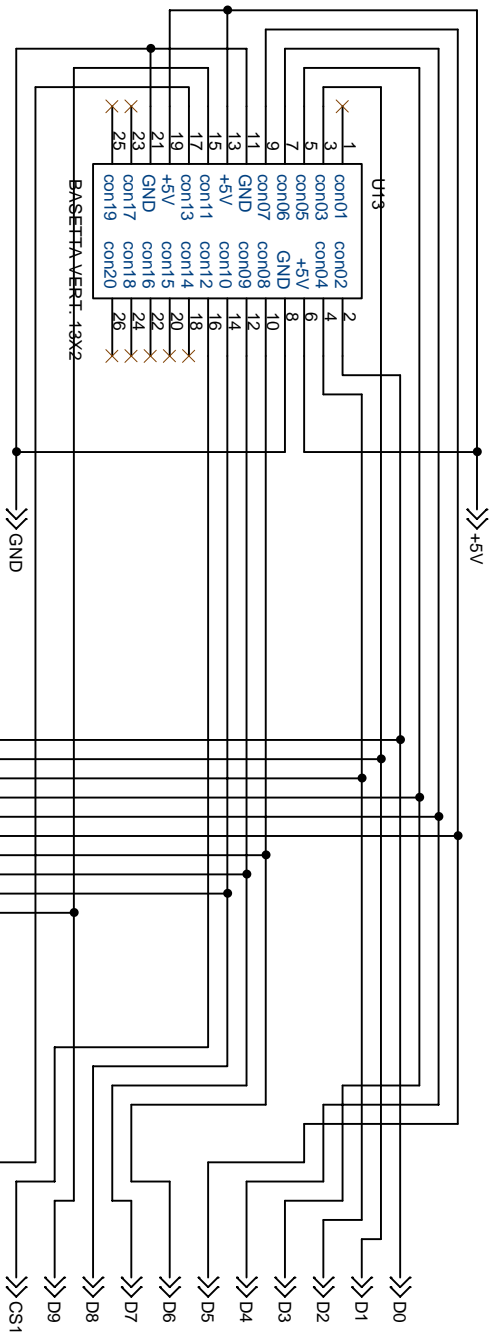
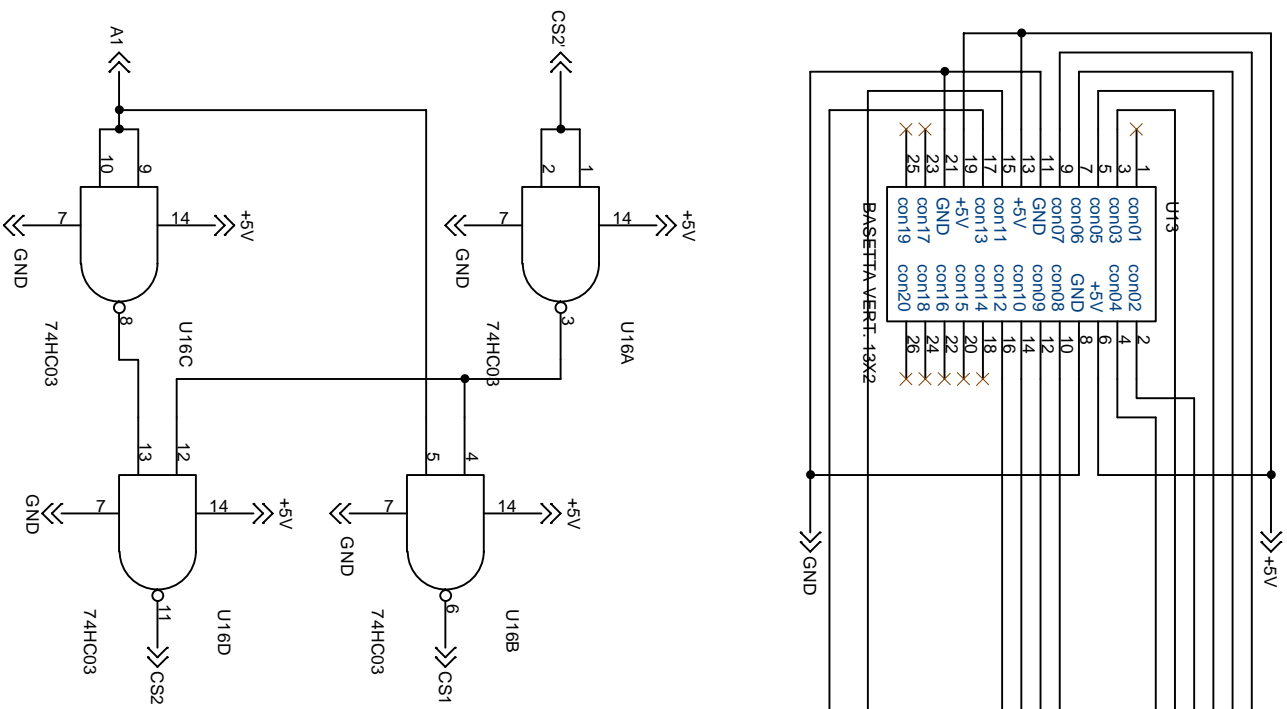
- A. Shematični načrt in načrt tiskanega vezja napetostnega preklopnika narejena v programu Orcad Schematic in Orcad Layout 8.1 (Cadence, ZDA)



Matej Kranjc	
Title	
Napetosini preklopnik	
Size	Document Number
A4	<Doc>
Date:	Monday, January 29, 2007
Sheet	1 of 4
Rev	1,1



Matej Kranjc	
Napelostini preklopnik	
Size A4	Document Number <Doc>
Date: Monday, January 29, 2007	Sheet 3 of 4
	Rev 1.1



Matej Kranjc	
Title	
Napetosini preklonik	
Size	Document Number
A4	<Doc>
Date:	Monday, January 29, 2007
Sheet	4 of 4
Rev	1.1

