

# Analys av elektriskt fält och celltransport vid sårläkning

Kandidatarbete våren 2007

INSTITUTIONEN FÖR TEKNISK FYSIK VID CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA

Helena Bergstrand   Marcus Elmer  
Erika Lätt Nyboe   Johannes Palm

23 maj 2007



### **Abstract**

Wound healing has always been of great significance in medicine. Throughout history a number of methods of varying quality have been developed and tested. During the last few decades a discussion has risen concerning the role of an electric field in wound healing. Experiments have shown that cell cultures respond to, and move along the direction of, an electric field equivalent to the naturally occurring field that is generated around a wound. This report describes a model of how to calculate and simulate the naturally occurring field and, under the hypothesis that the velocity of migrating cells is proportional to the field strength, use this to model how the cells move during the migrational phase of wound closure. The analysis of the electric field naturally occurring within the body is based on experimental data. When the skin is seen as an electrolyte, the acquired analytic expression for the electric field is very similar to experimental data. The modelling of the celltransport is based on an equation of motion that is founded upon a direct transport term, instead of the more commonly occurring diffusion term. The simulations show to what extent this representation of reality can explain the wound healing of the cornea in the eye.

## Sammanfattning

Sårläkning är ett komplext problem som än idag inte är helt utrett. Genom historien har många både bra och dåliga metoder utvecklats och prövats. Mycket är känt om sårläkningens olika faser, men för att ytterligare förstå problemet krävs en fullständig kännedom om alla olika faktorer som påverkar kroppens läkningsprocess. Under de senaste årtiondena har en diskussion uppstått angående elektriska fälts inverkan på sårläkning. I huden finns naturligt ett elektriskt fält som resultat av jontransport mellan hudens olika cellager. Experiment har visat att cellers rörelse stimuleras av ett yttre pålagt fält liknande det som finns i huden. Denna rapport tar fram en modell för att beräkna det kroppsegna elektriska fältet och använda detta till att, utifrån hypotesen att cellers hastighet är proportionell mot den lokala elektriska fältstyrkan, simulera hur celler tar sig in i sår. Analysen av det kroppsegna elektriska fältet bygger på experimentell data. Då huden liknas vid en elektrolyt stämmer det analytiskt framtagna fältet väl överens med experimentella data. Den numeriska simuleringen av celltransporten sker enligt en rörelseekvation som grundar sig på en förflyttningsterm istället för en diffusionsterm, vilket är det som används i alla tidigare sårläkningsmodeller som studerats. Simuleringarna visar i vilken utsträckning denna representation av verkligheten kan användas för att beskriva sårläkningsprocesser i hornhinnan.

## Innehåll

<b>1</b>	<b>Inledning</b>	<b>1</b>
1.1	Syfte och avgränsning . . . . .	1
1.2	Metod . . . . .	2
<b>2</b>	<b>Biologisk och fysikalisk grund för rapporten</b>	<b>2</b>
2.1	Hudens fysiologi . . . . .	2
2.1.1	Epidermis . . . . .	3
2.2	Hornhinnans fysiologi . . . . .	3
2.3	Sårläkning . . . . .	4
2.3.1	Regeneration och reparation . . . . .	4
2.3.2	Faktorer som påverkar läkningsprocessen . . . . .	4
2.4	Cellgenskaper . . . . .	5
2.4.1	Cellcykeln . . . . .	5
2.4.2	Cellmigration . . . . .	5
2.4.3	Cellers påverkan av elektriska fält . . . . .	6
2.4.4	Potentialskillnad över cellmembranet . . . . .	6
2.5	Kroppset elektriskt fält . . . . .	6
2.6	Grundläggande elektrostatisk fältteori . . . . .	8
<b>3</b>	<b>Modellval</b>	<b>9</b>
3.1	Val av rörelseekvation för cellmigration . . . . .	9
3.1.1	Tillväxt . . . . .	9
3.1.2	Diffusion . . . . .	10
3.1.3	Transport . . . . .	11
3.2	Kontinuerlig modell av cellmigration . . . . .	11
3.3	Diskret modell av cellmigration . . . . .	12
3.4	Analys av potentialvariationen i hud . . . . .	13
3.4.1	Modell enligt kabelekvationen . . . . .	13
3.4.2	Elektrolytmodellen . . . . .	14
<b>4</b>	<b>Numerisk simulering av elektriskt fält och celltransport</b>	<b>16</b>
4.1	Potentialens variation i basalmembranet . . . . .	16
4.2	Bestämning av hudens dielektriska egenskaper . . . . .	16
4.3	Simulering av elektriskt fält . . . . .	18
4.3.1	Modellering av skadad vävnad i tvärsnitt . . . . .	18
4.3.2	Modellering av skadad vävnad i tre dimensioner . . . . .	18
4.4	Simulering av celltransport . . . . .	19
4.4.1	Diskret modell av celltransport . . . . .	19
4.4.2	Modellering med rörelseekvationen . . . . .	20
<b>5</b>	<b>Diskussion och slutsatser</b>	<b>24</b>
	<b>Referenser</b>	<b>28</b>

# 1 Inledning

Sår har alltid varit ett aktuellt problem för människan. Komplikationer i samband med sår kan leda till amputation eller i vissa fall döden. Sårläkning är därför en viktig problematik inom läkarvetenskapen och genom historien har en mängd metoder och preparat använts för att underlätta läkningsprocessen. Redan i skrifter från 3000-talet f. Kr omnämns honung, rått kött och getspillning som förband för att underlätta sårläkningen [1]. Bristfällig sårbehandling orsakar stort lidande för drabbade patienter och innebär en ansevärd kostnad för samhället [2] [3]. Hur sår läker har alltså analyserats under mycket lång tid. På senare år har en diskussion uppstått kring elektriska fälts eventuella inverkan på sårläkning.

Att elektriska fält påverkar celledelning och cellorientering är bevisat både genom laboratorieförsök och i experiment med hela organismer [4]. I huden finns naturligt ett statiskt elektriskt fält som resultat av jontransport mellan hudens celler [5]. Vid manipulation av detta kroppsegna fält har en ökad fältstyrka visat sig leda till en snabbare sårläkningshastighet [6]. Teorier om att strömmar och elektriska fält påverkar hastigheten på sårläkningen lades fram redan 1843, då fysikern Emil Du-Bois Reymond visade att det flöt en ström på  $1 \mu\text{A}$  ut ur ett sår han gjort i fingret [7]. Därmed fastställde han att det uppkommer elektriska fält vid skador i huden. Sedan dess har intresset för forskningen kring elektriska fälts inverkan på sårläkning gått upp och ner. Skepsismen har varit stor mot de förslag på behandlingsmetoder som forskats fram, vilket delvis berott på tidigare oseriös forskning och felaktigt påstådda effekter av elektriska fält [6]. Samtidigt har människor blivit allt mer bekymrade över konsekvenserna av att utsätta sig för dessa fält [8].

De senaste åren har forskningen åter tagit fart och de positiva resultat som framkommit genom studier och experiment har ingett förhoppningar om att kunna underlätta läkningsprocessen för svårsläkta sår [3]. Hur elektriska fält påverkar sårläkningen är fortfarande inte helt utrett, men många är överens om att det kroppsegna elektriska fältet är en av huvudfaktorerna som påverkar sårläkningen [4] [9] [10]. Att undersöka och förstå hur fältbilden kring sår ser ut har därför stor relevans inom sårläkningsforskningen. Ursprunget för detta kroppsegna elektriska fält och vilken roll det spelar i sårläkningsprocessen är de centrala frågeställningarna i denna studie.

## 1.1 Syfte och avgränsning

Denna rapport syftar till att klargöra hur det kroppsegna statiska elektriska fältet ser ut kring ett sår och baserat på fältbilden göra en realistisk simulering av hur celler tar sig in i sår. Detta sker genom numerisk modellering i en, två och tre dimensioner. Modellen omfattar en simulering av sår i yttersta lagret i hornhinnan, vars egenskaper liknar överhudens.

## 1.2 Metod

För att kunna förstå uppkomsten av elektriska fält kring sår och dess eventuella inverkan på läkningsprocessen, har en omfattande litteraturstudie gjorts. I studien ingick facklitteratur och vetenskapliga artiklar, varav ett urval framgår av referenslistan. Tonvikten har legat på biologiska artiklar och rapporter från tidigare simuleringsmodeller. Utifrån de teorier och experimentella resultat som redovisas i litteraturen modelleras ett sår med hjälp av olika programvaror, främst Matlab och Comsol.

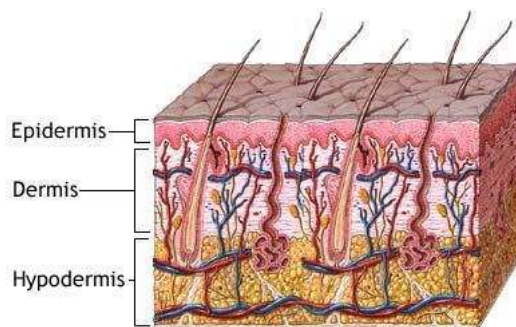
Rapporten inleds med ett teoriavsnitt som ger läsaren nödvändig biologisk och fysikalisk bakgrund samt introducerar relevanta begrepp. Därefter följer en motivering för studiens modeller och kritik framförs mot tidigare gjorda arbeten. Teorier som motbevisats med experiment utreds ytterligare och behovet av en korrekt fältbild kring sår motiveras och modelleras i logiska steg. En diskret och en kontinuerlig sårhäkningsmodell behandlas och den sökta fältprofilen simuleras numeriskt.

## 2 Biologisk och fysikalisk grund för rapporten

Nedan presenteras relevant terminologi och teorier som ligger till grund för studien.

### 2.1 Hudens fysiologi

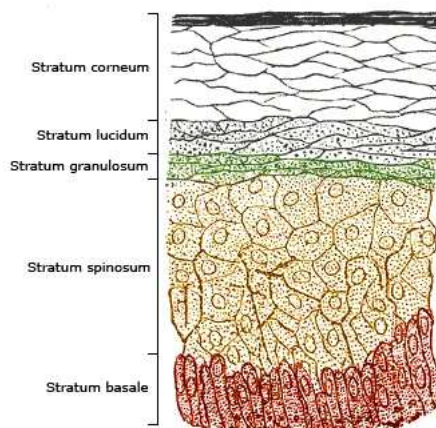
Huden täcker alla yttre ytor av kroppen och är kroppens största organ, både till area och vikt [11]. De viktigaste funktionerna huden har är att skydda kroppen, reglera kroppstemperaturen och fungera som en vattenbarriär. Huden består av tre huvudlager; *epidermis* som ligger ytligast, *dermis* och därefter *hypodermis* som ligger djupast. Figur 1 ger en överskådlig bild av hudens uppbyggnad. Dermis, även kallad läderhuden, är den tjockare delen av huden och består mestadels av proteinet kollagen och elastiska fibrer. Hypodermis är en fortsättning av dermis och består av lös bindvävnad och ett antal fettceller och svettkörtlar. Då rapporten bara behandlar sår i epidermis ges en mer ingående beskrivning av denna vävnad nedan.



**Figur 1:** Genomskärning av hudens tre olika lager; *epidermis*, *dermis* och *hypodermis*. I arbetet studeras endast sår i *epidermis* och de delar av sårhäkningsprocessen som sker här. I studien försummas all inverkan av hårsäckar, svettkörtlar och blodkärl. [12]

### 2.1.1 Epidermis

Epidermis är hudens översta lager och är endast 0.05-0.5 mm tjockt. Lagret är uppbyggt av fyra olika typer av celler; *keratinocyter*, *melanocyter*, *Langerhansceller* och *Melkerceller*. Cirka 90 % av epidermis består av keratinocyter som producerar ämnet keratin. Keratin är ett fintrådigt protein som hjälper till att skydda huden mot värme, kemikalier och mikrober. Epidermis består av fyra olika lager; *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* och ett mycket tunt lager kallat *stratum corneum*. Ytor på människokroppen som utsätts för mycket friktion, till exempel fingrar, har även ett extra lager skinn som ligger näst överst och kallas *stratum lucidum*. De olika lagren visas i Figur 2.



**Figur 2:** En skiss av epidermis i genomskärning visar dess olika lager. Det för studien viktigaste cellaget är basala lagret där all celledelning och cellmigration äger rum. [13]

Stratum basale, hädanefter kallat basala lagret, är det understa lagret i epidermis och här genomgår kontinuerligt stamceller delning för att fylla på ovanliggande cellager. I mitten av epidermis finns stratum spinosum och stratum granulosum. De består av 8-10 respektive 3-5 lager celler. Stratum corneum består av 25-30 lager döda keratinocyter som löpande skavs bort och ersätts med celler från underliggande lager [14].

I kroppen finns epitel, vilket är ett skikt av celler som utgör en gräns mellan olika organ. Epidermis är ett exempel på ett sådant skikt. Mellan närliggande epitelceller finns det kopplingar, så kallade *tight junctions*. Tillsammans med cellerna skapar dessa ett membran, vars främsta funktion är att hindra olika substanser från att fritt passera genom hudlagret. Kopplingarna fungerar också som kanaler för intern kommunikation och näringstransport mellan celler. Denna transport av joner och molekyler bygger upp ett kommunikationsnätverk i hudlagret och detta tros spela en central roll när aktiviteten hos celler i närheten av ett sår behöver stegras [11].

## 2.2 Hornhinnans fysiologi

Hornhinnan är den främre delen av ögat och till sin uppbyggnad liknar den huden. Vävnaden har en enastående sårhållningskapacitet [14] och mycket sårhållningsforskning har bedrivits just på hornhinnan [15]. Hornhinnan är dessutom lämplig att studera i mikroskop, då den



saknar blodkärl och därmed är näst intill transparent. På människor har hornhinnan en diameter på cirka 11 mm och en tjocklek som varierar mellan 0.5-1.0 mm, där mitten av hinnan är tunnast. Normalt täcks hornhinnan av det fysiologiskt betydelsefulla skiktet av tårvätska, som är cirka 10  $\mu\text{m}$  tjockt och återfuktar ögat [15]. Hornhinnan kan beskrivas i fem olika lager. I detta arbete studeras endast det yttersta lagret då det har många likheter med epidermis.

Hornhinnans översta lager kallas epitelet och består av fem till sju lager celler [14]. Vid ytan ligger platta celler, under dem finns rundade celler och på djupet ligger cylindriska celler. Liksom i epidermis finns ett basalmembran längst ner i epitelet. Balsalmembranet består mestadels av fibrer och hjälper till att binda ihop och stötta epitelet. Cellerna i understa lagret är de som genomgår celldelning och migration då ett sår behöver läkas. I följande avsnitt beskrivs kortfattat de olika stegen i sårsläkningsprocessen.

## 2.3 Sårsläkning

Då hud skadas strävar läkningsmekanismerna efter att sluta defekten och återställa alla funktioner i den skadade kroppsdelens så fort som möjligt [16]. Läkning av sår är en av de viktigaste återbildningsegenskaper en organism besitter och sker antingen genom regeneration eller reparation [17]. Dessa två olika slag av läkningsprocesser beskrivs mer ingående nedan.

### 2.3.1 Regeneration och reparation

Regeneration innebär att vävnad och funktion återskapas perfekt. Hos människor är det bara epitelceller som kan regenerera fullt ut och ett exempel på en sådan vävnad är epidermis. Reparation innebär att skadad vävnad ersätts med bindväv, vilket utgör kroppens sammanhållande och stödjande vävnad. Vävnadsreparationen kan delas in i tre faser; inflammation, vävnadsnybildning och vävnadsremodellering. Faserna är inte klart åtskilda men underlättar förståelsen av sårsläkningens biologi [16].

Inflammationen initieras direkt efter en skada i vävnaden och pågår tills dess att såret är rensat från främmande material, bakterier och förstörd vävnad. Fasen varar i allmänhet tre till fyra dagar efter skadan, men för kroniska sår varar inflammationsfasen i stort sett under hela läkningsprocessen. Vävnadsnybildningen pågår i cirka tre till fyra veckor och det är då förlorad vävnad ersätts, blodkärl återbildas och sårets yta täcks av epitelceller [1]. Denna så kallade epitalisering börjar några timmar efter skadan och innebär att epitelceller från sårets kanter vandrar in över sårytan. När cellerna möts stoppas processen och basalmembranet nybildas. Vävnadsremodelleringen startar en till tre veckor efter skadan och kan pågå i många år. Denna långsamma process leder till ökad hållfasthet av den nybildade vävnaden. Som bäst kan ärr uppnå 70 % av hudens ursprungliga hållfasthet [16].

### 2.3.2 Faktorer som påverkar läkningsprocessen

Det finns en mängd olika faktorer som påverkar sårsläkningen. Ökad blodförsörjning till såret har visat sig ge en positiv effekt för sårsläkningen, eftersom behovet av syre och näringsämnen är stort. Vidare bidrar rengöring av såret till en förbättrad läkningsprocess. Ett blött sår läker fortare än ett torrt, då epitalisering och annan tillväxt av vävnad sker snabbare i våt miljö. Skador hos barn läker fortare än skador hos äldre. Detta beror dels på att epitaliseringen går långsammare hos äldre, men även på att bindväven som nybildas inte är lika

välstrukturerad [16]. Det finns även experimentiella resultat som visar att statistiska elektriska fält har en positiv inverkan på sårläkningen [3].

## 2.4 Cellegenskaper

Cellen består av en mängd olika delar som alla är involverade i en eller flera av cellens olika stadier i livscykeln. Eftersom denna studie behandlar celler som helheter utan exakt utsträckning i rummet, kommer det här avsnittet endast att beröra de för studien viktiga egenskaperna hos cellen.

### 2.4.1 Cellcykeln

En cells livscykel delas upp i två huvudsakliga faser; *mitos* (delning) och *metabolism*. Delningsfasen är en relativt snabb process, medan metabolismfasen representerar cellens normala verksamheter och delningsförberedande processer. Denna kan i sin tur delas in i flera delar, beroende på behovet av noggrannhet.

Efter ett delningsskede stegras cellens metabolism till normala nivåer och cellen återhämtar sig från delningen. Första förberedande steget inför nästa mitosfas är därefter syntesfasen, då cellkärnans DNA-strängar kopieras och de båda uppsättningarna genmaterial separeras. Därpå återupptas cellens tillväxt och övriga cellorgan separeras. Här slutkontrolleras även cellens hälsa och möjlighet till delning. I flera steg av cellcykeln utförs en kvalitetskontroll av till exempel DNA-replikering för att förhindra anrikning av fel till dottercellerna. Om inte cellen godkänns vid kontrollerna, stoppas delningsprocessen och cellen hamnar i en passiv fas. Vissa celltyper, t ex lever- och njurceller, kräver mycket speciella förhållande för att väckas ur sitt passiva stadium.

Om cellen klarar kvalitetstesterna inleds mitos-fasen, och cellorgan, inklusive kromosomer, delas upp mellan de båda halvorna och hela cellkroppen snörs av på mitten till två delar. Kroppens hudlager befinner sig normalt i jämvikt mellan celldöd och mitos, det vill säga flertalet celler tillbringar viss tid i den passiva fasen. Vid en skada i huden tillåts cellerna i den här utredningen tillväxa med sin maximala delningsfrekvens, vilket är en god approximation.

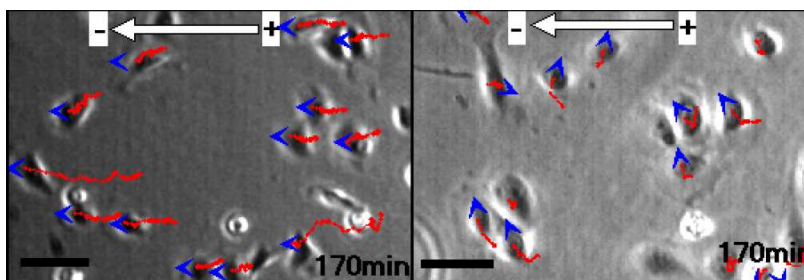
### 2.4.2 Cellmigration

Experimentella data visar att celler i närheten av ett sår rör sig kollektivt som hela lager och inte, som forskare tidigare trott, individuellt [18]. Denna insikt har även lett till att det förväntas bli en mycket skarpare sårkant än om cell efter cell ska ta sig in i ett sår.

I cellen finns ett skelett bestående av tunna trådar av proteinet actin. Detta nätverk håller cellens form intakt, och spelar även en stor roll i cellmigrationen. Proteintrådarna kan även sträcka sig utanför cellväggen och när de skickas ut i en riktning börjar cellväggen att expandera åt detta håll, vilket leder till en tillfällig volymökning. Skelettet drar sig sedan tillbaka från motsatta riktningen och därigenom åstadkoms en nettoförflyttning av cellen som helhet. I den här rapporten studeras hela cellager som rör sig gemensamt framåt, och cellvolymen kan antas vara relativt oförändrad [19].

### 2.4.3 Cellers påverkan av elektriska fält

Elektriska fält påverkar celledelning, cellorientering och frekvensen av celledelning. Detta är bevisat både genom laboratorieförsök med enstaka celler och experiment med hela organismer [20]. Maximalt uppmätt elektriskt fält hos människor ligger mellan 42-100 V/m [7] och odlade celler reagerar på en fältstyrka på 8 V/m [21]. I experiment med enstaka celler har externa elektriska fält applicerats och resultaten från ett av dessa experiment visas i Figur 3. Det framgår i figuren att sannolikheten för en cells förflyttning längs med fältet drastiskt ökar med ökande fältstyrka [7].



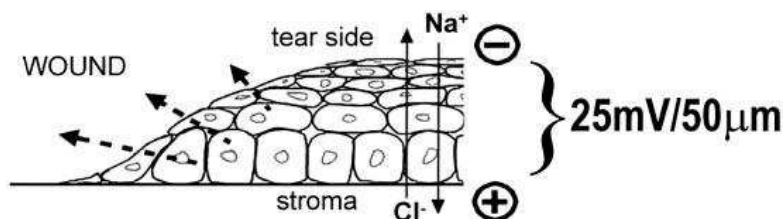
**Figur 3:** I figuren visas effekten av ett pålagt elektriskt fält. Blå pilar är markering för celler och de röda spåren representerar vägen de har vandrat. Till vänster i figuren är ett elektriskt fält liknande det kroppsegna fältet applicerat, medan cellerna i försöket till höger endast känner av ett mycket svagt fält. Som synes har cellerna till vänster utan undantag vandrat i fältets riktning [7].

### 2.4.4 Potentialskillnad över cellmembranet

Celler omges av ett membran som innesluter cellens cytoplasma. De flesta cellmembran har kanaler där joner tillåts att passera. Dessa kanaler finns ämnade framförallt för  $K^+$ ,  $Cl^-$  och ett mindre antal för  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ . Utöver kanaler transporteras joner även med hjälp av pumpar som aktivt förflyttar joner över membranet. Den viktigaste transportpumpen kallas Na-K-pumpen. Pumparna upprätthåller en låg koncentration av natrium inuti cellen genom att pumpa ut natriumjoner, medan samtidigt kaliumjoner pumpas in. Eftersom ett större antal  $K^+$  pumpas in än  $Na^+$  pumpas ut, skapas en potentialskillnad över membranet. Både  $K^+$  och  $Na^+$  pumpas mot sina koncentrationsgradienter, och diffunderar därför hela tiden sakta tillbaka genom cellmembranet. På grund av det måste pumpen hela tiden vara aktiv för att kunna hålla den låga koncentrationen av  $Na^+$  och den höga koncentrationen av  $K^+$  i cytoplasman. Celler har tusentals Na-K-pumpar i sina membran och upprätthåller en potentialskillnad på 90 mV över cellmembranet [5]. Koncentrationsskillnaden är mycket viktig bland annat vid generering av elektriska signaler [11].

## 2.5 Kroppseget elektriskt fält

Huden och hornhinnan fungerar som ett batteri. Epitelcellerna sitter samman med tight junctions och formar ett utsträckt membran. I likhet med den enskilda cellens membran, pumpas joner genom även detta membran. Cellerna i epitellagret pumpar  $Na^+$  från ovansidan mot undersidan och  $Cl^-$  pumpas åt motsatt håll, se Figur 4. Membranet separerar laddningarna och på så sätt upprätthålls en potentialskillnad över epitellagret,  $V_0$ , där insidan är positiv i förhållande till utsidan [20].

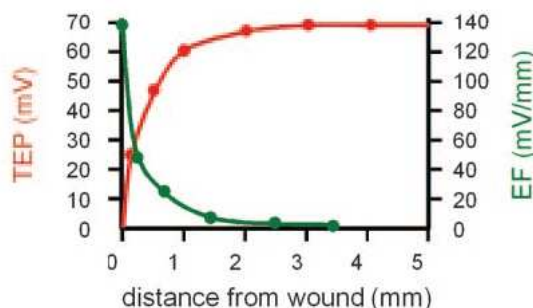


**Figur 4:** Skissen visar skadad hornhinna i genomskärning. De vertikala pilarna visar jontransporten över basalmembranet, där  $\text{Na}^+$  pumpas inåt och  $\text{Cl}^-$  pumpas utåt. På så sätt skapas en potentialskillnad  $V_0$  över epitelet med insidan positiv i förhållande till utsidan. I hornhinnan är  $V_0$  uppmätt till 25 mV [20]. Kopierad med tillstånd.

Vävnaden kan liknas vid en plattkondensator kopplad till en spänningskälla. Om spänningskällan kopplas bort kommer potentialskillnaden mellan kondensatorns plattor att med tiden gå mot noll, vilket är samma händelseförlopp som om cellerna avbryter pumpandet av joner. Då hornhinnan eller huden skadas, skadas även membranet av epitelceller och det blir en kortslutning till följd av att laddningsseparationen störts. Positivt laddade joner,  $\text{Na}^+$  och  $\text{K}^+$ , strömmar då mot såret från omkringliggande vävnad enligt de prickade pilarna i Figur 4, och de negativa  $\text{Cl}^-$ -jonerna strömmar utåt. Detta skapar en elektrisk ström genom sårkanten, liknande den ström som skulle flyta då en plattkondensator kortsluts. Strömmarna genom sårkanten ger upphov till ett statiskt elektriskt fält enligt Ohms lag 1. Fältet är *lateralt*, vilket innebär att riktningen är parallell med huden.

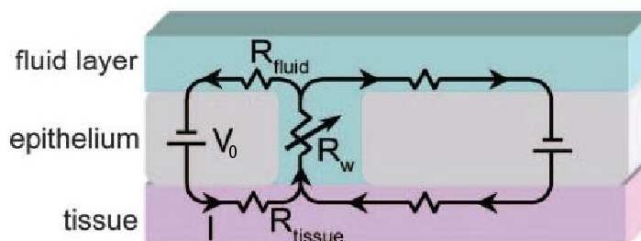
$$\mathbf{E} = \frac{\mathbf{J}}{\sigma} \quad (1)$$

$\mathbf{J}$  avser strömtätheten och  $\sigma$  är hudens ledningsförmåga, konduktivitet. På ett visst avstånd från sårkanten har cellerna sin normala pumpkapacitet och  $V_0$  upprätthålls [9]. Experiment visar att avståndet ligger mellan 0.5 - 4 mm beroende på i vilken vävnad mätningarna är gjorda i [21] [9]. I figur 5 är avståndet cirka 3 mm.



**Figur 5:** Experiment på ryggradsdjur visar potentialen och det elektriska fältet i basalmembranet i skadad hud. Den röda kurvan visar hur potentialen växer exponentiellt med avståndet från sårkanten. Det elektriska fältet illustreras av den gröna kurvan och avtar exponentiellt [22]. Resultaten av detta experiment är en del av de mätningar som ligger till grund för den fortsatta analysen av det elektriska fältet i hud. Kopierad med tillstånd.

Storleken på strömmen som flyter ut genom såret och det laterala elektriska fältet bestäms av potentialskillnaden över epitellagret och resistansen i såret. Ett fuktigt sår har lägre resistans vilket ger större strömmar. En schematisk bild av ett sår i hornhinnan visas i Figur 6, där resistansen i såret illustreras av ett variabelt motstånd.



**Figur 6:** Schematisk bild av ett sår i epitelet hos hornhinnan. Potentialen  $V_0$  uppstår på grund av  $Na-K$ -pumpen och strömmen  $I$  varierar beroende på sårets variabla resistans,  $R_w$ . Resistansen i tårvätskan,  $R_{fluid}$ , är mycket liten jämfört med resistansen i vävnaden,  $R_{tissue}$  [23]. Kopierad med tillstånd.

Potentialskillnaden  $V_0$  varierar mellan olika typer av vävnad. Mätningar på människor av varierande ålder och kön visar att  $V_0$  varierar mellan 7 och 61 mV [24] och maximalt uppmätta fältstyrkan hos människor varierar mellan 42-100 V/m [7]. Dessa mätningar visar liknande resultat som tidigare mätningar utförda på däggdjur och amfibier [9]. Det är därför av relevans att studera resultat och ta data ifrån undersökningar utförda på däggdjur för att få en ökad insikt i hur människans sårhäkning fungerar.

## 2.6 Grundläggande elektrostatisk fältteori

I detta avsnitt presenteras kortfattat de centrala begreppen inom elektrostatisk fältteori. För en mer grundläggande genomgång av teorin bakom sambanden som ges hänvisas läsaren till facklitteraturen, förslagsvis Cheng [25].

Intensiteten hos det elektriska fältet definieras som kraften per laddningsenhet som en liten stationär testladdning upplever då den befinner sig i fältet.

$$\mathbf{E} = \lim_{q \rightarrow 0} \frac{\mathbf{F}}{q} \quad (2)$$

Elektrostatik i fria rymden bygger på två fundamentala postulat som specificerar divergensen, samt rotationen av det elektriska fältet  $\mathbf{E}$ .

$$\nabla \cdot \mathbf{E} = \frac{\rho}{\epsilon_0} \quad (3)$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = \mathbf{0} \quad (4)$$

där  $\rho$  är laddningstäthet och  $\epsilon_0$  permittiviteten för vakuum. Ur dessa uttryck kan samtliga elektrostatiska lagar härledas. Från ekvation (4) fås att det elektriska fältet kan skrivas som gradienten av potentialen  $V$ .

$$\mathbf{E} = -\nabla V \quad (5)$$

Vid beräkningar av fält i medium med en permittivitet  $\neq \epsilon_0$  införs en ny vektoriell storhet  $\mathbf{D}$  som betecknar det elektriska förskjutningsfältet.  $\mathbf{D}$ -fältet är relaterat till  $\mathbf{E}$ -fältet genom följande samband

$$\mathbf{D} = \epsilon \mathbf{E} \quad (6)$$

där  $\epsilon = \epsilon_r \epsilon_0$ . Ur ekvation 3 och 5 fås Poissons ekvation, som är ett frekvent använt samband inom elektrostatisk fältberäkning.

$$\nabla^2 V = -\frac{\rho}{\epsilon} \quad (7)$$

### 3 Modellval

Flera försök har tidigare gjorts att modellera sårläggning. I följande avsnitt presenteras den modell som i denna rapport har använts för cellmigration, men också en modell för framtagning av det kroppsegna elektriska fältet. Nedan följer även en utredning av tidigare modellers svagheter och styrkor, vilket ger en logisk följd fram till den modell som valts i denna studie.

#### 3.1 Val av rörelseekvation för cellmigration

För att realistiskt kunna modellera cellmigration är det lämpligt att införa en rörelseekvation som beskriver hur cellkoncentrationen beror av tiden. I denna ekvation kan sedan lämpliga termer läggas till för att uppnå önskat resultat med fysikaliskt rimliga parametrar. Celler försöker täcka ett sår dels genom ökad celledelning, men också genom att förflytta sig in i det skadade området (migration). Hur dessa två faktorer kan vävas in i en rörelseekvation som stämmer med experimentella värden, studeras i följande avsnitt.

##### 3.1.1 Tillväxt

Celltillväxt är en faktor som har inkluderats i de allra flesta tidigare studier och modeller av sår [26]. Celledelningens bidrag till sårläggningen beskrivs av ekvationen nedan:

$$\frac{dn}{dt} = sn(1 - n) \quad (8)$$

Detta motiveras av att tidsderivatan av cellkoncentrationen är 0 både då  $n = 0$  och då  $n = 1$ .  $n$  är här ett mått på den relativa celltätheten, där tätheten i varje punkt anges som del av hornhinnans oskadade celltäthet,  $n_0$ . Högerledet i ekvation (8) har maximalt ett värde på  $s/4$  och detta värde ska alltså motsvara epitelcellers maximala delningshastighet. Den experimentella minimala fördubblingstiden för denna typ av celler är  $t_d = 4.2$  dagar [28]. Då modellen inte bör överskrida denna delningshastighet måste följande ekvation vara uppfylld:

$$\frac{1}{2} + \frac{s}{4}t_d = 1 \quad \Rightarrow \quad s = \frac{2}{t_d} \approx 0.02h^{-1} \quad (9)$$

Frågan är om ekvation (8) kan beskriva hela läkningsprocessen. För att undersöka detta studeras ett 1 mm brett område runt ett cirkulärt sår med radien 2 cm. Om cellerna delar sig enligt ekvation (8), blir tiden det skulle ta att fylla såret med nya celler minst 41 dagar,

med  $s$  enligt uttryck (9). Det är en orimligt lång tid och det trots att uppskattningen är rejält i överkant. Uppskattningen bygger på att alla celler i området delar sig maximalt hela tiden, vilket inte är fallet vare sig i ekvation (8) eller i verkligheten. Experimentellt är det visat att endast celler inom ett område av ungefär 0.5 mm från sårkanten är involverade i läkningsprocessen [20], vilket endast är hälften av vad som antogs ovan. Det behövs alltså ett tillägg i ekvationen för att få en bättre överensstämmelse med verkligheten.

### 3.1.2 Diffusion

I rörelseekvationer är det vanligt att termer innehåller derivator av olika ordning. Tillväxten är, om än icke-linjär i utformningen, en derivata av ordning 0. Alltså vinnns ingenting på att lägga till flera sådana termer, ty dessa skulle kunna arbetas in i tillväxten. Låt oss börja med en andra ordningens derivata, en så kallad diffusionsterm. Rörelseekvationen, (8) transformeras nu till en i tidigare modeller konsekvent använd form [26].

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D\nabla^2 n + sn(1-n) \quad (10)$$

Om man koncentrerar sig på ett litet område nära cellkanten kan ekvationen modifieras genom strykning av den icke-linjära termen. Detta kan göras eftersom det i detta område rör sig om så låg celltäthet att den blir försumbar i relation till den linjära termen. Den reducerade ekvationen har en ren våglösning, det vill säga ansatsen  $n = Ae^{-\lambda(x+vt)}$  är motiverad.  $A$ ,  $\lambda$  och  $v$  är konstanter, vilket innebär att lösningen är en vågfront som rör sig med hastigheten  $v$ . Ekvationen ger nu

$$\lambda v = D\lambda^2 + s \quad v(\lambda) = D\lambda + \frac{s}{\lambda} \quad (11)$$

Genom att minimera  $v$  med avseende på  $\lambda$  fås ett uttryck för  $v$ , men också ett uttryck för vågfrontens bredd,  $\Delta x$ .

$$v = 2\sqrt{Ds} \quad \Delta x = \frac{1}{\lambda_{min}} = \sqrt{\frac{D}{s}} \quad (12)$$

Med rimliga, experimentella värden på diffusions- och tidskonstanten så är den teoretiska och den faktiska hastigheten överensstämmande, inom rimlig avvikelse [26].

På senare tid har flera studier visat att sårkanten är mycket skarpare än man tidigare trott [7], och det är på denna punkt som diffusionstermen misslyckas med att beskriva händelseförloppet. Lösningen ovan implicerar att bredden på vågfronten skulle ges av:

$$\frac{1}{\lambda_{min}} = \sqrt{\frac{D}{s}} = \frac{v}{2s} \quad (13)$$

Detta ger, med  $s$  enligt ekvation (9) ovan och en rimlig cellhastighet på  $15 \mu\text{m}/\text{h}$ , en vågfrontsbredd som är avsevärt större än den experimentellt observerade.

Slutsatsen blir alltså att rörelseekvationen med en diffusionsterm inte korrekt kan återge experimentella iakttagelser. Det innebär att det behövs en annan, ny term för att beskriva cellmigrationen. Samtliga i litteraturstudien undersökta modeller grundar sig på en diffusionsekvation, vilket alltså motsägs av experimentella data.

### 3.1.3 Transport

Om man istället lägger till en term av första ordningens derivata som är konsistent med kontinuitetsekvationen, blir rörelseekvationen något modifierad:

$$\frac{\partial n}{\partial t} = \nabla \cdot (\mathbf{v}n) + sn(1 - n) \quad (14)$$

Lösningar till denna ekvation har även de vågfrontskaraktär, men de är mycket skarpare i konturen. Dimensionsanalys visar att  $\mathbf{v}$  måste vara en hastighet, och denna hastighet motsvarar då hastigheten på vågfronten, det vill säga sårkanten. Fördelen med att använda en modell av det här slaget är att  $\mathbf{v}$  nu, utan inskränkning, kan väljas så att resultatet stämmer med experimentella värden på sårläkningshastigheter.

Om hastigheten,  $v$ , för tillfället antas vara radiellt riktad och oberoende av den radiella koordinaten,  $x$  så kan  $v$  flyttas ut utanför gradienten och lösningen erhålls som en funktion,  $f$ , av den nya variabeln  $\lambda = x + vt$ . Denna okända funktion  $f(\lambda)$  ska då också uppfylla begynnelsevillkoret  $f(t = 0) = \Theta(x - x_0)$ , där  $x_0$  är den ursprungliga sårkantens position. Alltså måste  $f = \Theta$  och lösningen till ekvationen bli som följer:

$$n(x, t) = \Theta(x - x_0 + vt) \quad (15)$$

Detta gäller även med tillväxttermen närvarande eftersom det, enligt denna approximation, helt enkelt inte finns några områden med celltäthet skild från 0 eller 1, vid vilka värden termen i ekvation (16) är 0. Alltså förutsäger en sådan modell att celler utanför sårkanten kommer röra sig in i såret med konstant koncentration,  $n_0$  och hastigheten  $v$ . Detta är naturligtvis inte fysiologiskt rimligt, då det inte lämnar något utrymme för det faktum att det endast är celler inom ett begränsat område som är aktiva i sårläkningen.  $v$  måste alltså vara rumsberoende och dess form kan approximeras med en funktion,  $v(x)$ . Fysiologiskt sett finns det något som styr utseendet på  $v(x)$ , men det är ännu inte helt bestämt vad det är, eller exakt vilken form den antar. Följande modellering och resultat grundar sig på att det är det kroppsegna elektriska fältet som bestämmer hur hastighetsfördelningen ser ut, genom att  $v(x) \propto E(x)$ . Rörelseekvationen som styr hur celler tar sig in i sår får alltså följande slutgiltiga form:

$$\frac{\partial n}{\partial t} = v(x) \frac{\partial n}{\partial x} + nPDv(x)x + sn(1 - n) \quad (16)$$

Det som saknas för att kunna börja modellera hur celler tar sig in i sår enligt denna hypotes, är att det kroppsegna elektriska fältet beräknas. Utgångspunkten för att numeriskt simulera detta fält är att undersöka hur potentialen i vävnaden kring sår varierar. En modell för denna potentialvariation tas fram i kapitel 3.4. I följande avsnitt beskrivs en kontinuerlig respektive diskret modell av cellmigration.

## 3.2 Kontinuerlig modell av cellmigration

Den kontinuerliga modellen är direkt kopplad till rörelseekvationen (16), då den behandlar cellerna, i cirkulära koordinater, som en täthet  $n(x, \alpha)$ . Programmet behandlar i sitt nuvarande utseende runda sår, och total radiell symmetri antas därför för den tvådimensionella simuleringen.



Programmet delar upp cellerna mellan  $x = x_0$  och  $x = x_0 + L$  i ett antal mindre områden.  $L$  representerar här det avstånd vid vilket det elektriska fältet, och därmed cellernas rörelsehastighet in i såret, har sjunkit till 0. För hornhinnan motsvarar detta ca 0.5 mm. Varje mindre område behandlas nu från sårkanten och utåt i tur och ordning. Varje tidsuppdatering består av två separata faser, förflyttningsfasen och tillväxtfasen. Under förflyttningen behandlas varje område som ett mindre cellager som håller ihop och behåller samma inbördes förhållande mellan de individuella cellerna. Gradienten på tätheten och motsvarande hastighet beräknas i lagrets framkant och hela lagret flyttas sedan till den nya positionen. Hastighetens avtagande utseende gör att det skapas hål emellan dessa lager, eftersom de som är närmast såret rör sig snabbare än de som befinner sig längre bort från sårfronten. Det är naturligtvis inte helt rimligt att hål bildas i huden utanför såret, men för programmet betyder dessa hål att den första cellfronten drar den andra med sig, om än inte lika fort, och den andra drar den tredje och så vidare. Detta är alltså bara ett annat sätt att se på cellers flexibilitet i storlek. Tillväxttermen modelleras med hjälp av inbyggda funktioner i Matlab, som tar fram lösningen efter tiden  $t$  till ekvation (8), med given begynnelsekoncentration. Tillväxtfasen i varje område medelvärdesbildar över dess utsträckning i  $x$ -led och det eventuella hål som har bildats mellan området och dess inre granne, och skapar därigenom en medeltäthet. Denna koncentration används sedan som begynnelsekoncentration för celltillväxten. Alltså är celltätheten efter tillväxt alltid konstant i varje delområde. Itereringen upprepas därefter för nästa tidssteg.

Ovanstående gäller för modellering i både en och två dimensioner, men är en redogörelse för det endimensionella programmet. I två dimensioner tillkommer dock en ny aspekt, när det istället är en yta av celler som stänger till ett sår. Då ett cellager, på ett visst radiellt avstånd,  $x_1$ , från sårkanten, rör sig inåt mot såret tar det inte längre upp samma area, eftersom cirkeln det omsluter blir mindre. Alltså bildas inte längre hål bakom den snabbaste cellfronten, utan detta område fylls istället ut av det överskott av celler som inte får plats i den nya, mindre ytan.

### 3.3 Diskret modell av cellmigration

Ett annat sätt att simulera sårsläkning för att verifiera sårfrontshastigheter är att ställa upp en diskret modell där en punkt i ett koordinatsystem motsvaras av en cell [27]. Vid en sådan simulering framgår mycket tydligare hur enkla, biologiska antaganden påverkar sårradiens förändring med tiden.

Cellstrukturen byggs upp av en 3-dimensionell matris, där den tredje dimensionens värden motsvarar en egenskap hos cellen, exempelvis livslängd eller delningsbenägenhet. Det genererade hudpartiet är tvådimensionellt och kan bäst sägas efterlikna hornhinnans mycket tunna hud. En cells existens betecknas med en etta eller nolla och sår genereras som ett område bestående av nollor. Vid skapandet av hudmatrisen ges varje cell en slumpad livstid mellan 0 och deras maximala livslängd, som i litteraturen oftast uppskattas till 42 dagar [28]. Under denna tid tillåts cellerna maximalt dela sig 10 gånger [28]. En mycket stor styrka med den här typen av modell är att sårprofilen kan väljas helt godtyckligt. Ett sår med visst utseende genereras via lämplig algoritm, varpå ett område med nollor skapas i hudmatrisen.

I programmet är genomsnittliga livslängden satt till 1000 iterationer, varför tidssteget  $dt$  för varje uppdatering blir ca 1 timme. Hastighetsuträkningar kräver också en rumsskala, och baserat på cellers storlek är en ruta  $ds$  satt till  $15 \mu\text{m}$  [28]. Programmet kan därefter köras med olika antaganden om exempelvis cellers delningsfrekvens, som resulterar i olika sårfrontshastigheter.

I normalfallet befinner sig hudens tillväxt och celldöd i jämvikt, och för att kunna reparera skador har hudens celler möjlighet att tillväxa ansenligt mycket snabbare än vad som faktiskt sker vid normala förhållanden. I ett första enkelt fall ger man celler som gränsar till en tom plats i cellstrukturen möjligheten att dela sig och fylla ut platsen, om förhållandena i övrigt är de rätta. Om flera kandidater uppfyller kraven slumpas vinnaren fram. En tom plats kan antingen vara det faktiska såret, eller ha uppkommit på grund av celldöd. Utgångspunkterna för den här första modellen är alltså fixa celler och läkning endast genom celldelning, vilket ger en näst intill konstant radieminskning. Mer om det i avsnitt 4.4.1.

För att även testa ett diffusionsantagande kan man ge celler som gränsar till tom plats möjligheten att med viss sannolikhet flyttas dit. Den här rapportens hypotes är dock att celler känner av och agerar utefter den elektriska fältstyrkan i en punkt, varför sannolikheten för förflyttning i viss riktning styrs av fältbilden. Eftersom celler i modellen endast kan förflytta sig i diskreta riktningar, kommer formen på såret förskjutas en aning mot ett fyrkantigt sår över tiden, men simuleringen ger en bra uppfattning om sårfrontens förflyttning. Den stora skillnaden i sistnämnda modell mot normal diffusionsteori är att cellerna oftare lämnar tomma luckor bakom sig, och därmed ger celler längre bort från sårkanten möjlighet att dela eller flytta sig och fylla ut tomrummet. Detta är en förklaring till hur celler längre bort från sårkanten känner av såret och får en förflyttning in mot dess mitt.

### 3.4 Analys av potentialvariationen i hud

Mätningar gjorda i skadad hud och hornhinna visar att den laterala potentialen i vävnaden kring sår växer med avståndet från sårkanten. Under åttio- och nittioalet undersöktes denna potentialvariation experimentellt. Mätningarna i hud är utförda och dokumenterade av A. T. Barker, L. F. Jaffe och J. W. Vanable [9]. Senare mätte J. W. Vanable tillsammans med M. Chiang och K. R. Robinson hur potentialen varierade i hornhinnan [21]. I denna studie undersöks, med utgångspunkt från dessa mätdata, lämpliga modeller för den laterala potentialvariationen. Målet är att hitta en modell vars lösning är en god anpassning till experimentella mätdata. Modellen för hur potentialen varierar på randen till vävnaden används sedan som begynnelsevillkor vid den tredimensionella numeriska simuleringen av det elektriska fältet i vävnaden. Det elektriska fältet används därefter i sin tur som indata till simulering av cellmigration.

#### 3.4.1 Modell enligt kabelekvationen

I litteraturen omnämns den så kallade kabelekvationen vid anpassning av mätdata från potentialmätningar gjorda i hud och hornhinna [29] [9]. Kabelekvationens lösning ges av ekvation (17) och beskriver potentialen hos en läckande transmissionsledning som är störd vid en punkt. Under denna studie har ingen fysikalisk koppling mellan beteendet hos en störd ledning och skadad hud funnits, men ekvationen är ändå frekvent använd då den anpassar mätserier i

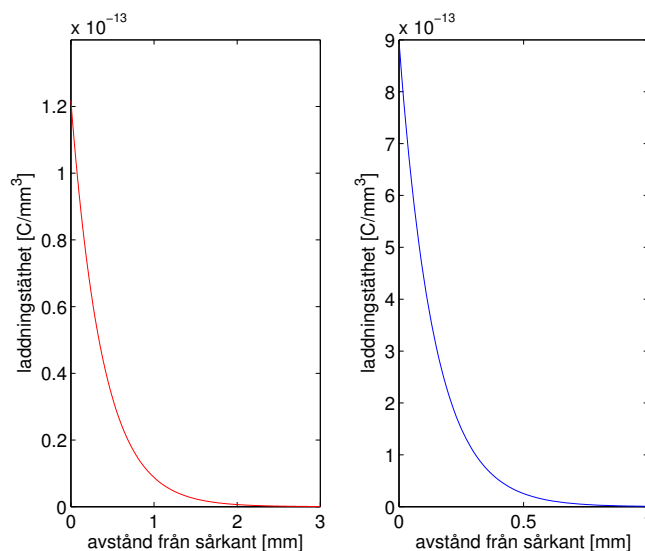
både hud och hornhinna väl.  $V_0$  och längdkonstanten  $\ell$  skiljer sig mellan olika vävnader.

$$V = V_0(1 - e^{-x/\ell}) \quad (17)$$

Enligt Poissons ekvation (7) gäller att laddningstätheten i ett medium är proportionell mot andraderivatan av potentialen. Under antagande att kabelekvationen (17) beskriver hur potentialen varierar i vävnad, erhålls det analytiska uttrycket för laddningstätheten enligt ekvation (18).

$$\rho = \frac{V_0 \epsilon}{\ell^2} e^{-x/\ell} \quad (18)$$

Laddningstätheten avtar exponentiellt mot noll, vilket illustreras i Figur 7. Detta beteende liknar hur laddningstätheten i en elektrolyt avtar. Därför undersöks i följande avsnitt om elektrolyten är en lämpligare modell för att beskriva potentialvariationen i vävnader.



**Figur 7:** Laddningstäthet i ett medium ges av Poissons ekvation (7). Under antagande att potentialen varierar enligt kabelekvationens lösning (17), kommer laddningstätheten att avta exponentiellt med avståndet från sårkanten. I bilden till vänster representerar den röda kurvan laddningstätheten i basala lagret hos marsvin. Den blå kurvan till höger visar laddningstätheten i understa epitellagret i hornhinnan hos råttan.

### 3.4.2 Elektrolytmodellen

En elektrolyt är ett vätska med laddade partiklar, exempelvis en jonlösning [30]. Vid temperaturen  $T$  och potentialen  $V(x)$  beskrivs laddningstätheten i elektrolyten av Boltzmanns uttryck.

$$\rho = \rho_0 e^{-\beta q V} \quad (19)$$

där  $\rho_0$  är jontätheten vid spänningen  $V = 0$  och  $\beta \equiv 1/k_B T$ , där  $k_B$  är Boltzmanns konstant och  $T$  är temperaturen [30]. Ekvationen gäller under antagande att elektrolyten endast består

av ett slags laddningar. Genom att kombinera ekvation (7) och ekvation (19) erhålls den så kallade Poisson-Boltzmannsekvationen.

$$\nabla^2 V = -\frac{\rho_o}{\epsilon} e^{-\beta q V} \quad (20)$$

En linjärisering av Boltzmanntermen under antagande att exponenten  $\beta q V$  är liten, ger följande uttryck för laddningstätheten där högre ordningens termer försummas.

$$\rho = \rho_o(1 - \beta q V) \quad (21)$$

Insättning av ekvation (21) i ekvation (7) ger följande differentialekvation i en dimension.

$$\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} = \kappa^2(V - V_s) \quad (22)$$

där  $\kappa^2 \equiv \rho_o \beta q / \epsilon_0 \epsilon_r$  och  $V_s \equiv 1 / \beta q = k_B T / q$ . Dimensionen av  $\kappa$  är  $m^{-1}$ , vilken är känd i litteraturen som Debyes skärmningslängd då den beskriver den relevanta längdskalan i problemet. Differentialekvationen (22) har en allmän lösning på formen

$$V = A e^{-\kappa x} + B e^{\kappa x} + V_0 \quad (23)$$

Ur Figur 5 utläses att andraderivatans för potentialen är strikt positiv. Då måste  $V_s \leq V_0$  gälla, och tillsammans med randvillkoren  $V(0) = 0$  och  $V(L) = V_0$  ger det lösningen till ekvation (23) på följande form,

$$V = V_0 \left( 1 + \frac{e^{\kappa(L-x)} - e^{\kappa(x-L)}}{e^{-\kappa L} - e^{\kappa L}} \right), \quad (24)$$

där  $L$  motsvarar avståndet från sårkanten där den vertikala potentialskillnaden i oskadad hud,  $V_0$ , upprätthålls. Under antagande att  $\kappa L \gg 1$  och  $x < L$  kan (24) förenklas till

$$V = V_0(1 - e^{-\kappa x}) \quad (25)$$

Detta förenklade uttryck för hur potentialen varierar i en elektrolyt har stora likheter med kabelekvationen (17). Då  $V_0 \propto T$  förutsäger modellen att potentialen är starkt temperaturberoende, vilket vore intressant att undersöka experimentellt. Det är sedan tidigare känt att cellmembranpotentialen är proportionell mot temperaturen, därför är det rimligt att även membranpotentialen i epitelet är temperaturberoende [28].

## 4 Numerisk simulering av elektriskt fält och celltransport

De modeller som presenterades i Kapitel 3 används nu för att numeriskt simulera cellmigrationen vid sårsläkning. Först simuleras det kroppsegna elektriska fältet med potentialvariationen i vävnaden som utgångspunkt. Fältet används sedan som indata vid simulering av cellmigrationen.

### 4.1 Potentialens variation i basalmembranet

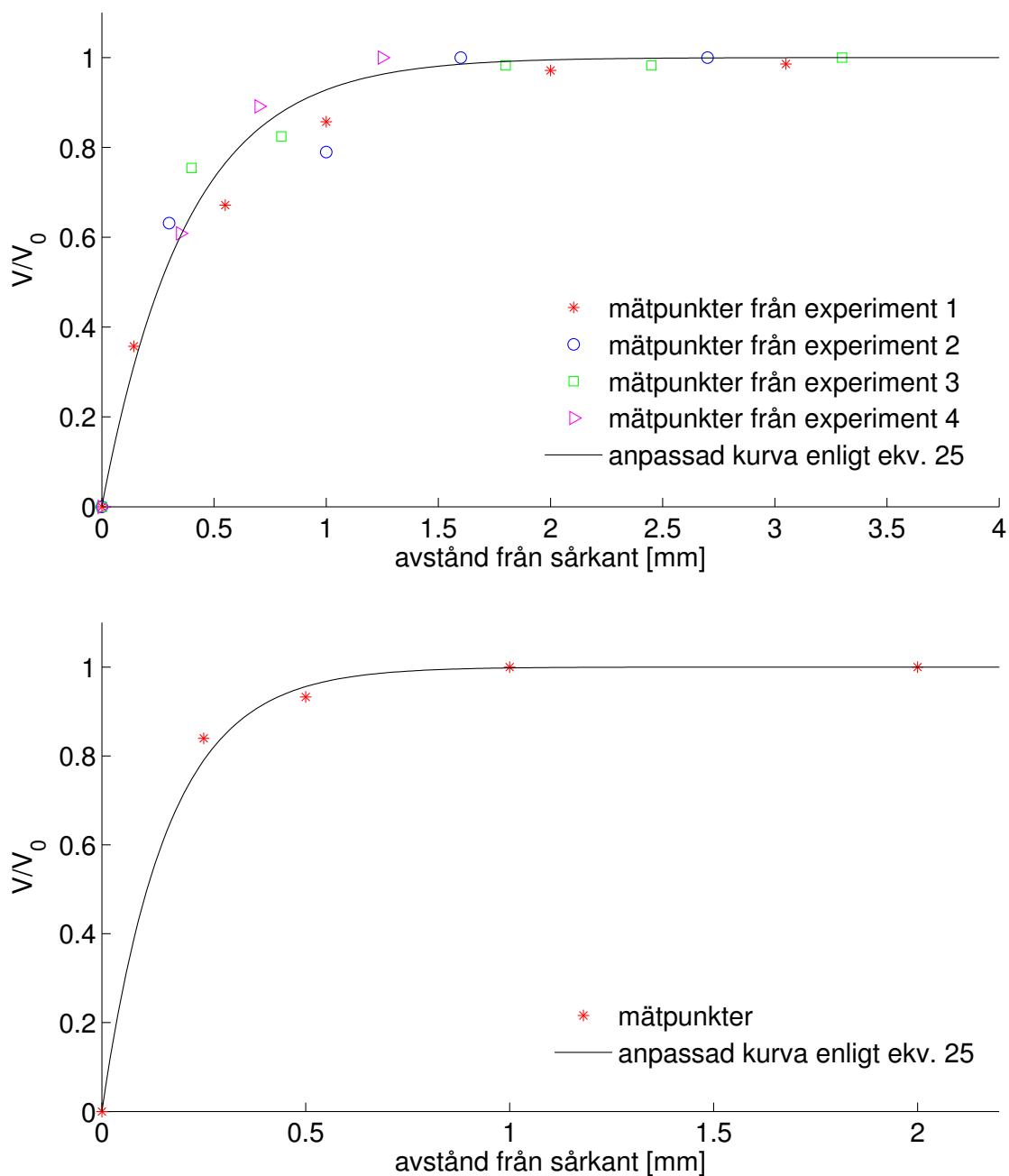
Ekvation (25) beskriver hur den laterala potentialen varierar med avståndet från sårkanten på ett sätt som överensstämmer väl med experimentella mätningar. Figur 8a visar data från fyra mätningar gjorda på hud hos marsvin. I experimenten uppmättes olika  $V_0$  i de olika vävnaderna [9]. I figuren har mätdata normerats mot respektive  $V_0$  för att tydliggöra att potentialen har ett liknade beteende i samtliga mätningar. I hud varierar potentialen med längdkonstanten  $1/\kappa = 0.38$  mm. Figur 8b visar data från en mätning i hornhinnan hos råtta. Här beskrivs potentialen med längdkonstanten 0.14 mm.

För att få en god illustration av potentialvariationen och det elektriska fältet i och kring ett sår simuleras skadad vävnad i två och tre dimensioner i ett senare avsnitt. I beräkningarna av det elektriska fältet vid dessa numeriska simuleringar försummas avvikelserna från exakta mätdata och potentialen antas beskrivas fullständigt av ekvation (25).

### 4.2 Bestämning av hudens dielektriska egenskaper

För att kunna modellera hud eller hornhinna, måste de dielektriska egenskaperna bestämmas. Detta är inte trivialt då vävnaden varken beter sig som en ideal ledare eller ett perfekt dielektrikum [8]. Människokroppen består av många olika material och varje material har sina egna specifika egenskaper. Dessa egenskaper har studerats alltmer intensivt de senaste 50 åren, men de parametervärden som presenteras i litteraturen gäller ofta vid höga frekvenser. Att mäta vävnaders dielektriska egenskaper vid statiska förhållanden innebär komplikationer som ger stora mätosäkerheter [31]. De dielektriska parametervärdena för hud och hornhinna bestäms därför genom att approximera med hjälp av uppmätta värden för liknande medier.

Vävnader består av celler som omges av en så kallad extracellulär vätska. Då strömmar propagerar väljer de vägen med minst resistans. Cellernas membran har kapacitiva egenskaper och har därför hög resistivitet vid låga frekvenser [32]. Vid statiska beräkningar är det därför en god approximation att antaga att hornhinnan har samma konduktivitet och relativa permittivitet som den extracellulära vätskan. Dessa dielektriska egenskaper hos den extracellulära vätskan har stora likheter med vattnets egenskaper. Detta är rimligt då människokroppen består av drygt 70% vatten [8]. I följande avsnitt simuleras skadad vävnad numeriskt. Vid dessa simuleringar används  $\epsilon_r = 80$  för vävnadens permittivitet och  $\sigma = 1.0$  A/Vm för konduktiviteten [8].



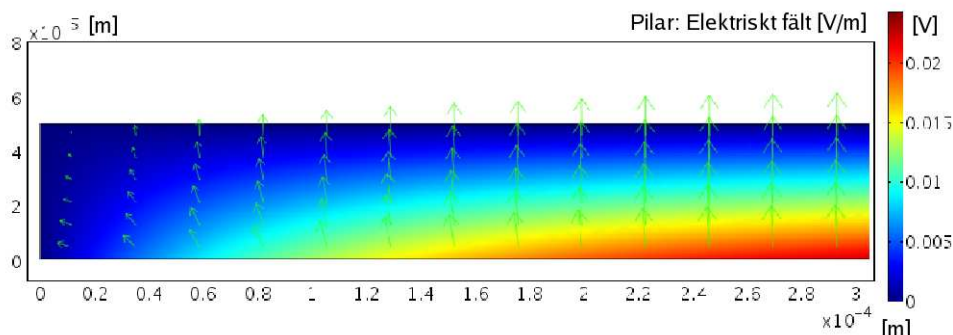
**Figur 8:** Den laterala potentialen i basalmembranet varierar med avståndet från sårkanten. Samtliga mätserier är normerade mot potentialskillnaden i epitellagret på långt avstånd från sårkanten,  $V_0$ . Till mätpunkterna anpassas en kurva enligt kabelekvationen. (a) Vid experiment 1 utfördes mätningar på ett ryggradsdjur, mätserierna två och tre är gjorda på hälen hos ett marsvin. Experiment fyra visar en mätserie gjord bakom örat på marsvin. Den till mätdata anpassade kurvan följer ekvation (25) och har längdkonstanten 0.38 mm. (b) Mätserien är gjord på hornhinnan hos en råtta. Den anpassade kurvan har längdkonstanten 0.14 mm.

### 4.3 Simulering av elektriskt fält

Simuleringen av det kroppsegna elektriska fältet sker i två och tre dimensioner. Vid de båda fallen simuleras endast ett sår i hornhinnan och inte i hud då fysiken för de två vävnaderna är densamma. Anledningen till att hornhinnan modelleras är att tårvätskan innebär vissa förenklingar vid simuleringen.

#### 4.3.1 Modellering av skadad vävnad i tvärsnitt

Figur 9 visar potentialen och fältbilden för en enkel tvådimensionell modell av ett sår i genomskärning i epitelet i hornhinnan. Figuren kan tänkas vara ett tvärsnitt av antingen ett cirkulärt sår eller ett snittsår. Sårkanten är abrupt då epitelet bara består av några celllager. Vid denna numeriska simulering antas potentialen i det basala lagret (se Figur 2) variera enligt ekvation (25). På långt avstånd från såret påverkas inte cellerna av skadan och potentialen  $V_0$  över basalmembranet upprätthålls av Na-K-pumparna, se kapitel 2.5. Denna vertikala potentialskillnad antas växa linjärt. Över epitellagret i hornhinnan ligger en hinna av tårvätska. Vätskan har mycket låg resistans jämfört med resistansen mellan epitelcellerna som skapas av tätt junctions. I modellen görs därför en rimlig approximation av att tårvätskan är en ekvipotentialyta, ett oändligt gott ledande material. Hela övre sidan antar därför samma potential som såret, vars potential sätts till 0 V.



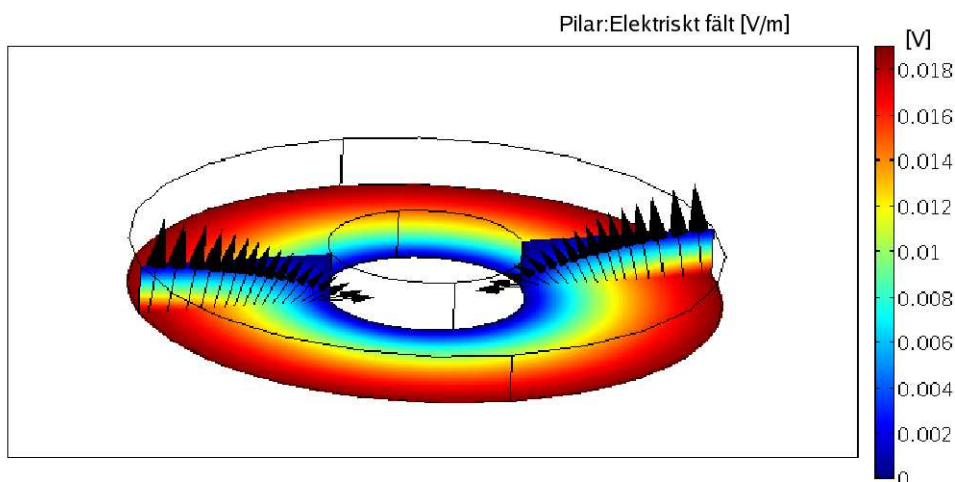
**Figur 9:** I ett tvärsnitt av en skadad hornhinna illustreras potentialens variation av färgskalan och det elektriska fältets amplitud och riktning ges av de gröna pilarna. Såret i hornhinnans epitelceller är längst till vänster i figuren och simuleras med abrupta kanter. Potentialvariationen i basala lagret ges av ekvation (25). På långt avstånd från sårkanten är det laterala fältet noll och det vertikala fältet konstant. Närmre såret avtar det vertikala fältet medan den laterala fältkomponenten blir allt tydligare.

I Figur 9 visar pilarna amplitud och riktning av det elektriska fältet, den skiftande färgskalan visar potentialen. Som det framgår av figuren är det laterala fältet som starkast vid sårkanten och avtar då avståndet till sårkanten ökar. På stort avstånd från sårkanten är det vertikala elektriska fältet konstant. Det beror på att cellerna långt från såret inte påverkas av kortslutningen i såret utan kan upprätthålla  $V_0$  med hjälp av Na-K-pumpen.

#### 4.3.2 Modellering av skadad vävnad i tre dimensioner

För en mer åskådlig figur av fältbilden och potentialvariationen modelleras ett sår i epitelet hos hornhinnan även i tre dimensioner. I Figur 10 modelleras ett cirkulärt sår. För att få en

överskådlig figur är sårets radie i samma storleksordning som hornhinns tjocklek. Randvillkoren för potentialen sätts utifrån samma resonemang som vid modellering i två dimensioner. Figuren visar hur fältbilden ser ut kring sårkanten i understa lagret av epitelet. Det är i detta cellager som celledelning och cellmigration sker. I figuren syns tydligt att det laterala fältet avtar med avståndet från sårkanten.



**Figur 10:** Den laterala komponenten av det elektriska fältet i basala lagret ökar längs en radie mot ett cirkulärt sår i hornhinna. Pilarna anger amplitud och riktning på det elektriska fältet i det basala lagret. Det är i detta lager som celledelning och cellmigration sker. Experiment har visat att både celledelning och cellmigration påverkas av elektriskt fält [7], det är därför av intresse att illustrera fältet just i det basala lagret.

#### 4.4 Simulering av celltransport

Utifrån antagandet att  $v(x) \propto E(x)$ , där  $E(x)$  är det laterala elektriska fältet, kan nu cellers rörelse in i sår börja simuleras. I följande simuleringar används  $v(x) = v_0 e^{-\kappa x}$ . Det värde på längdkonstanten  $\kappa$  som använts är det som stämmer på hornhinnan, alltså  $\kappa^{-1} = 140 \mu\text{m}$ . Simulering med både en diskret cellautomat och en mer kontinuerlig modell ger nu följande resultat.

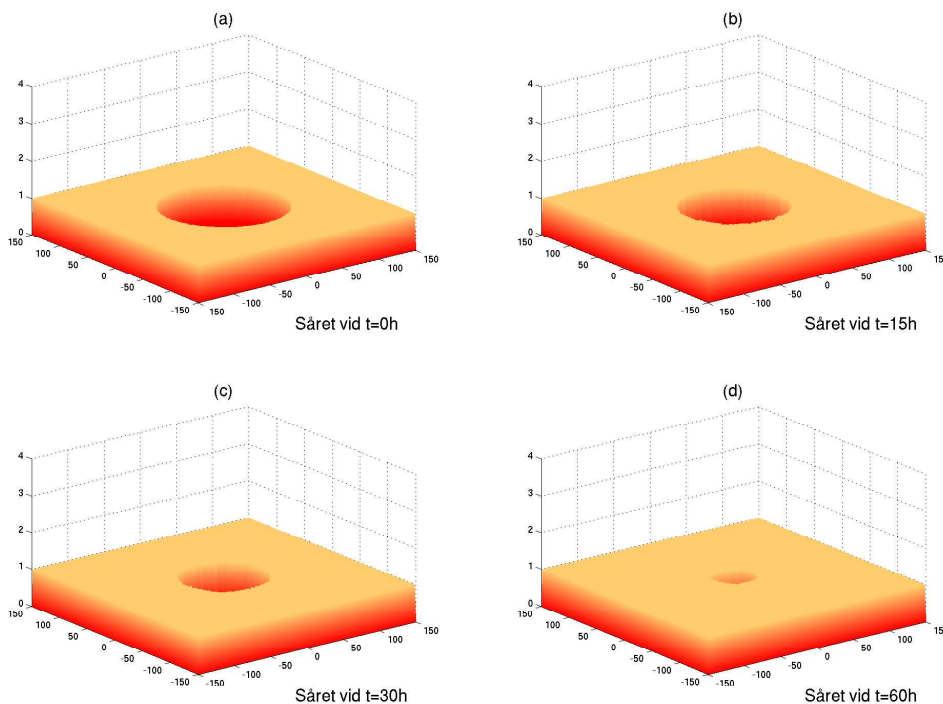
##### 4.4.1 Diskret modell av celltransport

Med tidigare beskriven diskret migrationsmodell från avsnitt 3.3 kan en cellfrontshastighet uppskattas som ett medelvärde av radieminskningen över lämpligt antal iterationer. Vid experimentella studier av sårhäkningskedan har man kunnat observera ungefärliga fronthastigheter. Hastigheten beror naturligtvis på hud- och sårtyp, men studier av hornhinnan har visat på ca  $15 \mu\text{m/h}$  [26].

De tre utvecklingsstegen (delning, förflyttning och fältberoende), beskrivna i avsnitt 3.3, ger olika hastigheter beroende på biologiska parametrar och man kan därmed bilda sig en uppfattning om hur de olika cellegenskaperna påverkar. I det enkla fallet med sårhäkning baserad på endast mitos, fås en konstant fronthastighet på ca  $5 \mu\text{m/h}$ .



Om man även tillåter förflyttning proportionell mot fältets riktning, får man en utveckling för ett cirkulärt sår enligt figur 11. Skalan på axlarna i planet är antal celler, och på z-axeln representeras en cell av etta och tom plats med nolla.

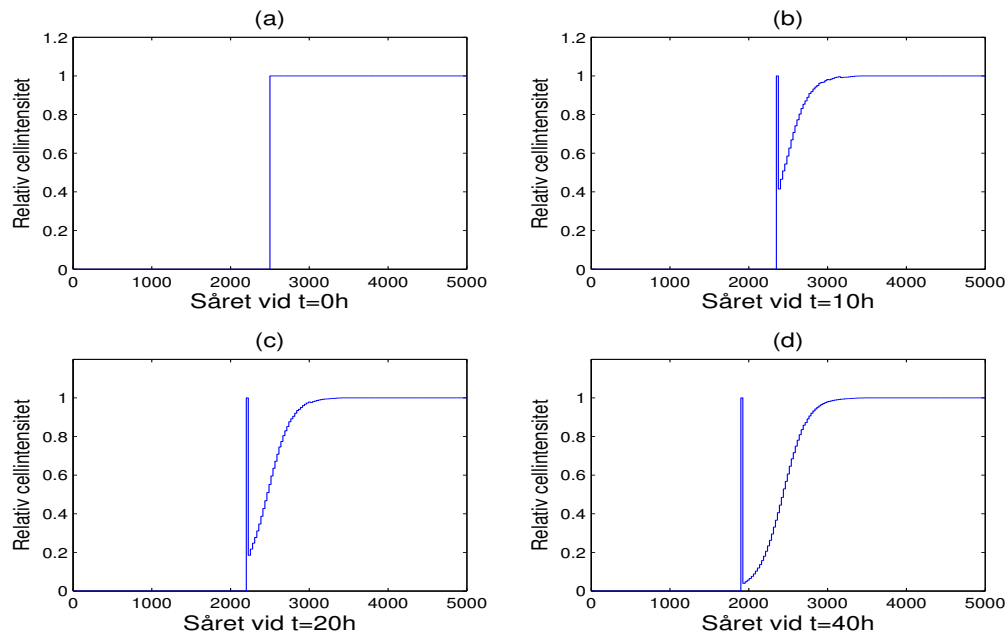


**Figur 11:** Bilden visar ett sårs utveckling enligt den diskreta modellen i avsnitt 3.3. Sårets celler tillåts, både med slumpmässighet och med avseende på det elektriska fältet, flytta sig in mot sårets mitt. Sårkanten får därför ett oregelbundet utseende.

Den resulterande fronthastigheten  $14 \mu\text{m}/\text{h}$  ligger mycket nära den experimentellt uppmätta för sårfronter i hornhinnan. Vår modell kan alltså sägas ge god förutsägelse om sårläkningstider, även om viss osäkerhet i parametrar finns. Uppenbart är dock att delning och slumpmässig förflyttning inte räcker för att ge realistiska fronthastigheter för sårets läkning.

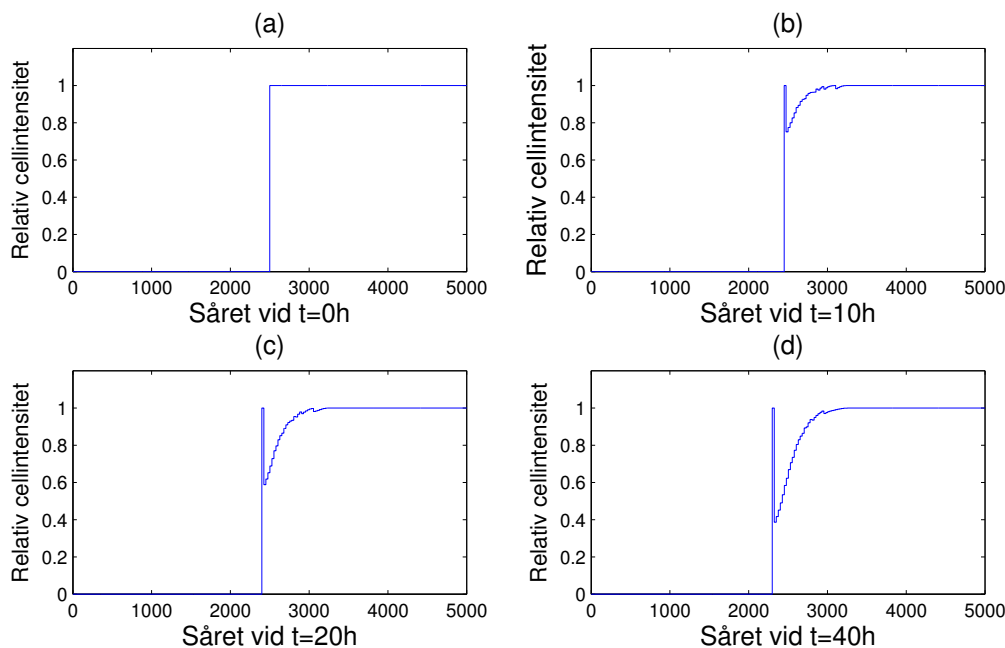
#### 4.4.2 Modellering med rörelseekvationen

Det elektriska fältets exponentiella avtagande ger vissa problem med upplösningen, då en cell per pixel eftersträvas i modelleringen. Beräkningar har därför nedan gjorts med 100 pixlar per cell, så att varje cellagers förflyttning per tidssteg (1 timme) är avrundad till närmaste  $0.1 \mu\text{m}$ .  $\Delta L$  i figurtexterna nedan är ett mått på hur långt cellfronten förflyttat sig relativt utgångspositionen.



**Figur 12:** Läkningprocessen hos ett sår modellerat i en dimension med hastigheten  $v = 15 \mu\text{m}/\text{h}$ . Observera hur tätheten precis bakom den ledande cellfronten går mot noll.

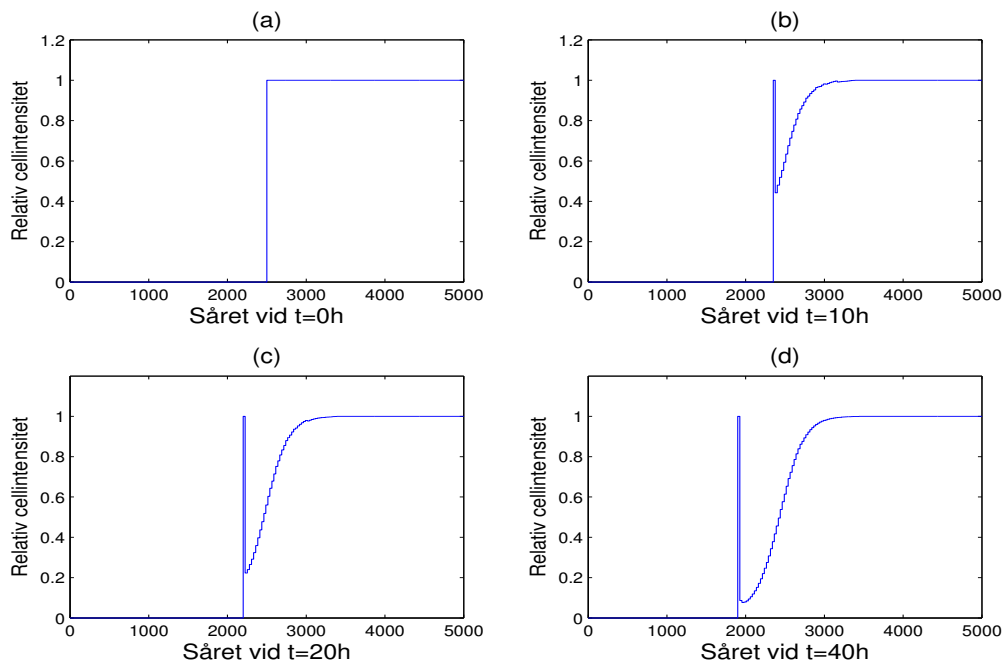
Simuleringen ovan gjordes med ett  $v_0$ , motsvarande det första cellagrets hastighet på  $15 \mu\text{m}/\text{h}$ . Denna sårläkningshastighet är väl dokumenterad i litteraturen, exempelvis i [26]. Simuleringen ovan ger som synes inte ett fullgott resultat, eftersom den främsta delen av sårfronten rör sig för fort relativt de bakomliggande cellagren, och därmed bildar ett allt för stort tomrum bakom sig. Utifrån detta endimensionella fall, och med de approximationer som gjorts är det dock intressant att studera med vilken hastighet man kan få såret att, med rimligt utseende på cellfronten, läka.



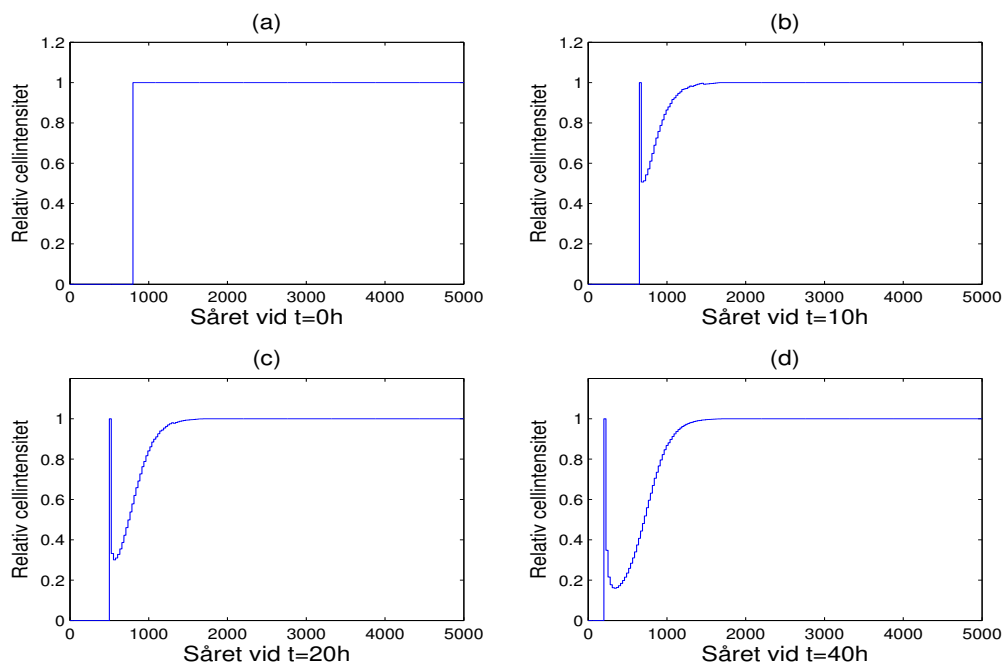
**Figur 13:** Läkningprocessen hos ett sår modellerat i en dimension med hastigheten  $v = 10 \mu\text{m}/\text{h}$ . Tätheten precis bakom cellfronten är här högre än i figur 12.

I denna simulering har en hastighet på  $v = 10 \mu\text{m}/\text{h}$  använts, alltså endast  $2/3$  av den uppmätta hastigheten. För att klara av en snabbare sårhäkningsprocess krävs fler celler, och detta löser sig till viss del när modellerings sättet förflyttas till två dimensioner.

Resultatet av den tvådimensionella modelleringen är, för stora sår, i princip detsamma som i en dimension. Den stora skillnaden är att det uppkommer ett starkare beroende på  $x$ . Då ett område av celler rör sig inåt får som sagt endast en viss procent av dem plats. Denna procent sats minskar då  $x$  blir mindre så att fler celler ligger kvar i området bakom, och nästa cellfront har ett mindre hål att fylla. Den tvådimensionella simuleringen motverkar alltså utdragningen av cellerna, jämfört med den endimensionella. En konsekvens av detta blir att små sår har, i denna modell, möjlighet att läka med en högre hastighet än stora, en förutsägelse som stämmer väl in med verkligheten. Bilderna nedan visar ett tvärsnitt av den tvådimensionella celltätheten för två sår med stor respektive liten radie, och samma sårhäkningshastighet,  $15 \mu\text{m}/\text{h}$ .



Figur 14: Läkningprocessen hos ett stort sår modellerat i två dimensioner med hastigheten  $v = 15 \mu m/h$



Figur 15: Läkningprocessen hos ett litet sår modellerat i två dimensioner med hastigheten  $v = 15 \mu m/h$

Den ledande cellfronten har i det lilla såret i figur 15 börjat vidgas i botten och i figur 15(d) ser man tydligt hur det blir ett överflöd av celler precis bakom cellfronten. Detta fenomen syns inte på samma sätt i det stora såret, men även här kan resultatet av cellöverskottet skönjas om man jämför tätheten bakom cellfronten i figur 14(d) och figur 12(d). Det lilla sårets ursprungsradien var 0.6 mm och det stora var 2.5 mm. Det är alltså extremt små sår som visar upp denna egenskap i den här modellen. För större sår ger den endimensionella simuleringen en bra uppskattning av cellfrontens utseende.

## 5 Diskussion och slutsatser

Denna studie tillhandahåller en ny infallsvinkel på sårläkningsproblemet. Rapporten väcker många intressanta frågor som vore av relevans att undersöka experimentellt. Studien är av teoretiskt slag och de nödvändiga antaganden som gjorts är väl grundade på tidigare experiment.

Vid numeriska beräkningar av elektriska fält i skadad vävnad måste randvillkor anges. Ett lämpligt randvillkor i detta fall är potentialvariationen över de olika ytorna. Det visade sig att det förenklade uttrycket för hur potentialen varierar i en elektrolyt (se ekvation (25)) anpassar väl experimentella mätningar av potentialvariationen i basalmembranet hos skadad vävnad. Att likna epidermis vid en elektrolyt verkar vara ett rimligt antagande, dels då den fysikaliska kopplingen går att påvisa men även då potentialen i en elektrolyt avtar på samma sätt som uppmätt potential i skadad hud. De avvikelser som förekommer kan dels förklaras av mätosäkerheter vid experimenten, men troligare är att epidermis inte kan liknas vid en ideal elektrolyt. För vidare studier inom ämnet vore det av intresse att undersöka elektrolytmodellen mer ingående. En möjlig förbättring av modellen är att vid lineariseringen ta med högre ordningens termer. Dessutom förutsäger modellen ett temperaturberoende hos  $V_0$  vilket vore mycket intressant att undersöka experimentellt.

Den vertikala potentialskillnaden på långt avstånd från sårkanten antas variera linjärt, till skillnad från det laterala fältet som varierar exponentiellt. Detta innebär att samtliga celler i epitelet approximeras med samma resistivitet vilket ger en linjär spänningsvariation. Antagandet verkar rimligt då experiment visar att pålagd spänning över fettceller fördelar sig homogent över de olika lagren [33]. Vidare antas att såret och hela ovensidan av hornhinnan är en ekvipotentialyta, vilket innebär att tårvätskans resistans försummas. Antagandet grundas i att resistansen mellan cellerna är mycket högre än tårvätskans, dock innebär det att fältets riktning ändras lite. Fältets amplitud bör också bli en aning för stor då förlusterna i tårvätskan försummas vid simuleringen.

Numeriska beräkningarna av fält i tre dimensioner i skadad hornhinna visar att det laterala fältet avtar med ökat avstånd från sårkanten. Detta stämmer väl överens med experimentella mätningar enligt Figur 5. Detta stärker att modellen som gjorts av sår i hornhinnan ger en bra representativ bild av både potentialskillnad och fält trots gjorda approximationer. För att kunna skapa en ännu bättre modell av olika vävnader krävs en djupare analys och förståelse av deras dielektriska egenskaper. Vid simuleringen modelleras hornhinnan som ett dielektrikum med samma egenskaper som den extracellulära vätskan. På grund av cellmembranets höga resistans vid låga frekvenser tas ingen hänsyn till membranens inverkan på vävnadens

dielektriska egenskaper. Sannolikt är dock att cellmembranen i viss mån påverkar både konduktivitet och permittivitet.

Vid modellering av hornhinnan antas potentialens variation enligt ekvation (25) vara applicerbar på sår av alla storlekar och former. Figur 8a som visar att mätpunkter från olika stora sår kan anpassas till en och samma kurva stöder denna teori. Även fysikern Emil Du-Bois Reymond gjorde samma observation för 150 år sedan, då han fastställde att sårets storlek inte inverkar på varken riktning eller amplitud hos det kroppsegna elektriska fältet [7]. Det krävs dock fler experiment på många olika storlekar av sår innan ett sådant antagande kan bekräftas. Däremot är det tydligt att potentialen  $V_0$  och längdkonstanten  $1/\kappa$  varierar mellan olika vävnader. Vad som bestämmer dessa konstanter är fortfarande inte utrett, men kapitel 2.5, 3.4 och 4.2 ger en indikation på vad de beror av.

Simuleringen av hur celler tar sig in i sår använder sig av att cellhastigheten är proportionell mot det elektriska fältet. Hastighetens exponentiella utseende skapar, i den kontinuerliga modellen, en relativt sett allt för snabb sårkant. För att närma sig den fysikaliska hastigheten krävs en starkare tillväxt av celler i det aktiva området runt såret. I simuleringar med realistiska fronthastigheter uppstår ett alltför stort glapp mellan den ledande sårfronten och bakomliggande cellager. Tätheten bör inte sjunka under 50 % av normala tätheten i någon punkt, om huden skall kunna betraktas som intakt. Hudceller har möjlighet att tillfälligt fördubbla sin volym, varför en relativ täthet på 0.5 representerar cellernas maximala utsträckning enligt experiment. Både biologiskt och matematiskt sett är det denna täthet som ger maximal celltillväxt, och är alltså eftersträvansvärd att hålla.

Oavsett vilken term som styr celltransporten, diffusion eller annat hastighetsutseende, räcker alltså inte celltillväxten i modellen till för att fylla det tomrum som skapas bakom de migrerande cellerna i fronten, om de ska kunna röra sig så snabbt som  $15 \mu\text{m/h}$ . Med största sannolikhet är alltså simuleringen av tillväxten svagare än den i verkligheten. Då modellen inte ger ett realistiskt resultat på denna punkt, kan inte hastighetens exponentiella utseende vare sig vidimeras eller förkastas. Det finns däremot framförallt två andra interaktioner mellan elektriska fält och hudceller, som inte har tagits med i simuleringen. Den första är det faktum att celler i förstärkt fält har en större benägenhet att dela sig än celler i ett obehandlat sår. Ett sätt att utveckla modellen till att även ta detta i beaktande, är att införa en effektiv delningskonstant,  $s(E) = s_0 + s_1(E)$ . Den andra är att fältstyrkan styr delningsriktningen så att ett starkare fält ger en delningsriktning vinkelrätt mot fältriiktningen. Dessa egenskaper har i riktiga sår uppmätts vara beroende av samma faktorer som hastigheten. Experimentellt har man inte hittat några andra faktorer än det elektriska fältet, som besitter liknande avtagande utseende i rummet som cellhastigheten gör.

Nuvarande modellering grundar sig på att fältstyrkan oförändrad flyttar sig med cellfronten, vilket, med resultatet i åtanke, kanske inte är helt fysiologiskt rimligt. En mer realistisk modell skulle möjligtvis kunna erhållas om man beräknade fältet utifrån den rådande celltäthetsfördelningen. En sådan beräkning borde ge ett mer utsmetat utseende på fältprofilen, vilket i sin tur skulle motverka cellfrontens benägenhet att dra ifrån bakomliggande lager. Det skulle också innebära en tidsberoende hastighet som har observerats i olika experimentella sammanhang. Detta ligger dock utanför ramen för den här undersökningen, då osäkerheten i en sådan simulering skulle vara alltför stor. Allt för lite är, som redan nämnts, känt om

cellers dielektriska egenskaper, och denna databrist blir än tydligare då celler rör sig. Vad som behövs är fler experiment som undersöker potentialen hos migrerande celler.

Det elektriska fältets roll i sårhäkning är ännu inte helt bestämd, men experiment indikerar att fältet spelar en central roll i läkningsprocessen. Genom att först beräkna det kroppsegna fältets styrka och rumsberoende utseende och sedan direkt koppla det till cellhastigheten, presenteras här en ny infallsvinkel till det ytterst komplexa sårhäkningsproblemet. Att låta fältet styra läkeprocessen så totalt har inte tidigare gjorts och, även om denna modell inte är fulländad, så är det en utgångspunkt för ytterligare studier och modeller.

## Tack

Ett stort tack till Colin McCaig och Bing Song för värdefulla upplysningar, inspirerande mailkorrespondens och tillstånd att använda deras figurer. Vi vill även tacka Thomas Rylander och David Degerfeldt för hjälp med elektrostatiska problemställningar och tips vid användning av Comsol. Till sist vill vi rikta ett stort tack till vår handledare Peter Apell för inspiration, ovärderlig hjälp och ett stort engagemang!



## Referenser

- [1] C. Lindholm, *Sår, andra upplagan* (2003)
- [2] A. Jercinovic, F. Bobanovic och L. Vodovnik, *Endogenous potentials in two different models of human skin injuries*, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **30**, 221 (1993)
- [3] R. Karba et al., *DC electrical stimulation for chronic wound healing enhancement. Part 1. Clinical study and determination of electrical field distribution in the numerical wound model*, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **43**, 265 (1997)
- [4] B. Song et al., *Nerve regeneration and wound healing are stimulated and directed by an endogenous electrical field in vivo*, *Journal of cell science* **117**, 4681 (2004)
- [5] O. Knudsen, *Biological Membranes: Theory of Transport, Potentials and Electric Impulses*, Cambridge University Press (2002)
- [6] C. D. McCaig et al., *Controlling cell behavior electrically: Current views and future potential*, *Physiol. Rev.* **85**, 943 (2005)
- [7] M. Zhao et al., *Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase and PTEN*, *Nature* **442**, 457 (2006)
- [8] E. C. Fear och M. A. Stuchly, *A novel equivalent circuit model for gap-connected cells*, *Phys. Med. Bio.*, **43**, 1439 (1998)
- [9] A. T. Barker, L. F. Jaffe och J. W. Vanable Jr., *The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery* *American Physiological Society* **242**, 358 (1982)
- [10] L. C. Kloth, *Wound healing: Alternatives in management*, Chapter 9, F. A. Davis Company, Philadelphia (2002)
- [11] G. J. Tortora och S. R. Grabowski, *Introduction to the human body*, John Wiley and Sons, (2004)
- [12] Adam Healthcare Center. Hämtad 2007-05-10.  
Tillgänglig på <http://adam.about.com/encyclopedia/Skin-layers.htm>
- [13] Wikipedia, the free encyclopedia. Hämtad 2007-05-11.  
Tillgänglig på <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Skinlayers.png>
- [14] A. L. Kierszenbaum, *Histology and cell biology, an introduction to pathology*, Mosby Inc. (2002)
- [15] A. Anseth, *Nordisk lärobok i oftalmiatrik*, Esselte Studium, Stockholm (1975)
- [16] B. Jeppson et al., *Kirurgi*, Studentlitteratur (2005)
- [17] R. Nuccitelli, *A role for endogenous electric fields in wound healing*, RPN Research, (2003)
- [18] P. K. Maini, D. L. S. McElwain och D. I. Leavesley, *Traveling Wave Model to Interpret a Wound-Healing Cell Migration Assay for Human Peritoneal Cells*, *Tissue Eng.* **10**, 475 (2004)

- [19] A. Schwab et. al., *Cells Move When Ions and Water Flow*, Eur. J. Physiol. **453**, 421 (2007)
- [20] M. Zhao et al., *Wound healing in rat cornea: the role of electric currents*, FASEB Journal **19**, 379 (2005)
- [21] M. Chiang, K. R. Robinson och J. W. Vanable Jr., *Electrical Fields in the Vicinity of Epithelial Wounds in the Isolated Bovine Eye*, Exp. Eye Res. **54**, 999 (1992)
- [22] J. W. Vanable Jr. et al., *Electric Fields In Vertebrate Repair*, Liss, New York (1989)
- [23] E. C. Fear och M. A. Stuchley *Modelling assemblies of biological cells exposed to electric field*, IEEE 1997 Canadian conference on electrical and computer eng. **2**, 1621 (1997)
- [24] I. S. Foulds och A. T. Barker, *Human skin battery potentials and their possible role in wound healing*, British Journal of Dermatology **109**, 515 (1983)
- [25] D. K. Cheng, *Fundamentals of Engineering Electromagnetics*, Addison-Wesley (1993)
- [26] J. A. Sherratt och J.D. Murray, *Models of Epidermal Wound Healing*, Proceedings: Biological sciences **341**, 29 (1990)
- [27] T. Callaghan et al., *A Stochastic Model for Wound Healing*, Journal of statistical physics **122**, 909 (2006)
- [28] B. Alberts et. al., *The Cell, fourth edition*, Garland Science (2002)
- [29] M. S. Cooper, *Gap junctions increase the sensitivity of tissue cells to exogenous electric fields*, J. Theor. Biol. **111**, 123 (1984)
- [30] D. Boal, *Mechanics of The Cell*, Cambridge (2002)
- [31] D. Miklavcic, N. Pavseli och F. X. Hart, *Electric Properties of Tissues*, Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering (2006)
- [32] D. A. Stewart Jr., T. R. Gowrihsankar och J. C. Weaver, *Transport Lattice Approach to Describing Cell Electroporation: Use of Local Asymptotic Model*, IEEE Transactions on Plasma Science **32**, 1696 (2004)
- [33] Y. A. Chizmadzhev et al., *Electrical properties of skin at moderate voltages: contribution of appendageal macropores*, Biophysical Journal **74**, 843 (1998)