

Različni modeli elektroporacije in transporta molekul prek celične membrane

Lea Rems, Damijan Miklavčič

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška 25, 1000 Ljubljana, Slovenija
E-pošta: lea.rems@fe.uni-lj.si

Povzetek. Elektroporacija je uveljavljena metoda, pri kateri z uporabo električnih pulzov »odpremo« membrane bioloških celic in omogočimo povečan vnos različnih učinkovin v celice, kot so zdravila in DNA-molekule. Dosežemo lahko tudi ekstrakcijo snovi iz celic, na primer sladkorja iz sladkorne pese. Za doseganje želenih rezultatov je ključnega pomena ustrezna izbira parametrov električnih pulzov, katerim izpostavimo celice. Pri načrtovanju parametrov električnih pulzov ali interpretaciji eksperimentalnih rezultatov pa si lahko pomagamo s teoretičnimi modeli elektroporacije. V tem prispevku na kratko opisujeva štiri modele elektroporacije, ki jih najpogosteje srečamo v literaturi. Obravnavava njihove osnovne značilnosti s posebnim poudarkom na tistih, ki so pomembne za modeliranje transporta molekul prek membrane. Opisujeva tudi model transporta molekul in način, kako ga povežemo z modelom elektroporacije. Na koncu predstavljava še dva primera uporabe modelov elektroporacije v praksi. Na podlagi primerjave posameznih modelov lahko povzameva, da je izbira modela elektroporacije odvisna predvsem od namena njegove uporabe. Ker vseh mehanizmov elektroporacije še vedno povsem ne razumemo, pa je potreben tudi nadaljnji razvoj modelov, ki bodo pripomogli k razumevanju samega pojava elektroporacije ter k optimizaciji obstoječih in bodočih eksperimentalnih protokolov.

Ključne besede: elektroporacija, transport molekul, teoretični model, lipidni dvosloj, celična membrana

Different models of electroporation and molecular transport across the cell membrane

Exposure of cells to electric pulses can enhance considerably molecular uptake into biological cells, a phenomenon known as electroporation. This phenomenon is nowadays widely used for intracellular drug and gene delivery, and also for extraction of molecules from cells, such as sugar from sugar beet. For each application of electroporation, appropriate parameters of electric pulses need to be chosen in order to achieve a desirable outcome. For such purpose, theoretical models of electroporation can give us an insight on how an experimental protocol should be designed. In addition, modeling can also help us explain different experimental observations. Several models have been proposed for modeling electroporation, and we describe here four of them, which are most widely used. We discuss the basic characteristic of each model and consider its application for modeling molecular uptake due to electroporation. We also describe a model of molecular transport and its coupling with a model of electroporation. Moreover, we present two examples of how the models can be used in practice. We conclude that the choice of the electroporation model mainly depends on the purpose of modeling. Further development of electroporation models is however needed, which may contribute to our understanding of the electroporation phenomenon and enable us further optimization of current and future experimental protocols.

1 UVOD

Elektroporacijo poznamo kot pojav, pri katerem se pod vplivom električnih pulzov znatno poveča prepustnost membran bioloških celic [1]. Pojav ima visoko uporabno vrednost, saj ga lahko izkoristimo za vnos

različnih molekul v celice, tj. molekul, ki celične membrane v normalnih razmerah ne morejo prosto prehajati. Med drugim lahko z elektroporacijo povečamo vnos kemoterapevtikov v tumorske celice in s tem izboljšamo učinkovitost kemoterapije ter vnesemo v celice molekule DNA za gensko transfekcijo ali kot DNA-cepivo [2]. Z elektroporacijo lahko dosežemo tudi ekstrakcijo molekul iz celic, na primer sladkorja iz sladkorne pese ter taninov in pigmentov iz grozdja pri proizvodnji vina [3].

Pri elektroporaciji je za doseganje želenih rezultatov ključnega pomena izbira parametrov električnih pulzov (oblike, dolžine, amplitude, števila in ponavljalne frekvence). Če so parametri pulzov ustrezno izbrani, je elektroporacija reverzibilna in celice se v nekaj sekundah ali minutah po izpostavitvi pulzom povrnejo v normalno stanje. Običajno se pri protokolih, ki zahtevajo reverzibilno elektroporacijo, uporablja zmerno število pravokotnih pulzov (1–8) pri ponavljalni frekvenci 1 Hz, z dolžino posameznega pulza v območju mikrosekund do milisekund in z amplitudo, ki zagotovi jakost električnega polja do nekaj 100 V/cm. Z večanjem števila, dolžine in/ali amplitude pulzov pa postanejo spremembe v celični membrani ireverzibilne in celice ne preživijo izpostavitve električnim pulzom. Ireverzibilna elektroporacija se uporablja za ablacijo tumorskih celic [4,5] in za inaktivacijo bakterij v vodi in

tekoči hrani [2,6]. Če skrajšamo dolžino pulzov v območje nanosekund in povišamo amplitudo na nekaj 10 kV/cm, pa lahko s pulzi sprožimo tudi programirano celično smrt – apoptozo [7,8].

Izbor parametrov električnih pulzov je torej odvisen predvsem od namena uporabe elektroporacije. Pri načrtovanju teh parametrov pa si lahko pomagamo s teoretičnimi modeli. V literaturi najdemo več modelov elektroporacije, pri čemer se ti razlikujejo bodisi v osnovnih enačbah, ki elektroporacijo opisujejo, bodisi v numerični metodi reševanja teh enačb. Praviloma različne numerične metode reševanja istih enačb vodijo do enakih rezultatov. Nasprotno pa lahko izbira matematično-fizikalne predstavitev elektroporacije pomembno vpliva na pridobljene rezultate ter posledično ugotovitve numeričnega modeliranja. Zato bova v nadaljevanju opisala štiri modele elektroporacije, ki jih najpogosteje srečamo v literaturi. Posebej se bova osredinila na značilnosti modelov, ki so pomembne za sočasno modeliranje transporta molekul prek membrane. Modeliranje transporta namreč lahko pomembno pripomore k optimizaciji eksperimentalnih protokolov za vnos molekul v celice. Za ustrezno modeliranje transporta prek elektroporirane membrane pa je temeljni pogoj ustrezna izbira modela elektroporacije. Da prikaževa tudi praktično vrednost modeliranja elektroporacije, bova na koncu predstavila še dva primera uporabe modelov, in sicer pri optimizaciji elektrozlivanja celic in pri interpretaciji eksperimentalnih rezultatov, povezanih z vnosom molekul v celice.

2 MODELI ELEKTROPORACIJE

Modeli elektroporacije, ki jih bova na kratko opisala, so si sorodni, saj vsi temeljijo na predpostavki, da pod vplivom električnega polja v lipidnem dvosloju (gradniku celične membrane) nastanejo vodne pore, ki ionom in molekulam omogočijo prehod prek membrane. Čeprav por v membrani z obstoječimi mikroskopskimi tehnikami za zdaj ni mogoče »videti«, so njihov nastanek potrdile simulacije molekularne dinamike lipidnega dvosloja v električnem polju [9,10]. Obenem je teorija nastanka por edina od predlaganih teorij elektroporacije ustrezno razložila eksperimentalna opažanja na ravninskih lipidnih dvoslojih in celicah ter je danes široko sprejeta [11–13].

Za lažje razumevanje same elektroporacije je na slikah 1a–c shematsko prikazan običajni protokol elektroporacije celic. Slike 1d–f pa pomenijo podporo k razumevanju spodaj predstavljenih modelov.

2.1 Enačba Smoluchowskega

Prva obširna teoretična analiza elektroporacije v smislu nastanka por v membrani sega v leto 1979, ko je skupina ruskih znanstvenikov objavila rezultate raziskav na ravninskih lipidnih dvoslojih [14]. Da bi opisali časovno dinamiko širjenja in krčenja por v lipidni membrani, so uporabili enačbo Smoluchowskega [15]:

$$\frac{\partial n}{\partial t} + D_p \frac{\partial}{\partial r_p} \left(-\frac{\partial n}{\partial r_p} - \frac{n}{kT} \frac{\partial \Delta W}{\partial r_p} \right) = S_c(r_p) + S_d(r_p), \quad (1)$$

pri čemer $n(r_p, t)$ pomeni porazdelitveno funkcijo števila por v membrani glede na njihov radij r_p ob času t . Elektroporacija je namreč stohastičen proces in predvideva se, da se v membrani nahaja populacija por različnih velikosti. Tako je $n dr_p$ enako številu por z radijem med r_p in $r_p + dr_p$. Parametra D_p in $\Delta W(r_p)$ sta difuzijska konstanta por v prostoru njihovih radijev in sprememba energije lipidne membrane, ki je posledica nastanka pore, k je Boltzmannova konstanta, T pa temperatura.

Sprememba energije ΔW ima več prispevkov, od katerih je za elektroporacijo najpomembnejši prispevek električne energije. Ker je lipidna membrana električno slabo prevodna, se ob izpostavitvi električnemu polju na njej vzpostavi električna napetost U_m . Ko v lipidnem dvosloju z nizko relativno dielektričnostjo $\epsilon_l \approx 2$ nastane vodna pora z relativno dielektričnostjo $\epsilon_w \approx 80$, se sprememba v kapacitivnosti membrane ΔC_p odrazi kot sprememba kapacitivne energije:

$$\Delta W_{el} = -\frac{\Delta C_p U_m^2}{2} \quad (2)$$

Medtem ko leva stran enačbe (1) opisuje dinamiko obstoječih por, povzema desna stran enačbe nastajanje novih $S_c(r_p)$ in izginjanje obstoječih por $S_d(r_p)$. Izraz, ki opisuje nastajanje por, je proporcionalen eksponentu negativne spremembe električne energije in s tem kvadratu transmembranske napetosti [15,16]:

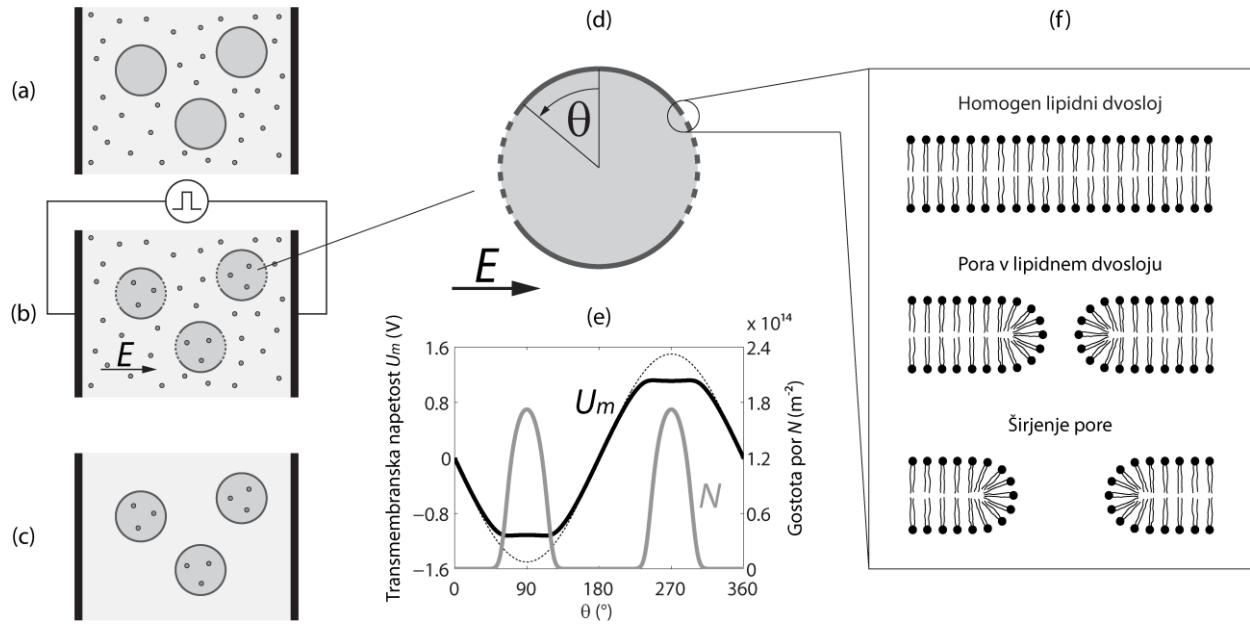
$$S_c(r_p) \propto \exp\left(-\frac{\Delta W_{el}}{kT}\right) = \exp\left(\frac{\Delta C_p U_m^2}{2kT}\right) \quad (3)$$

Transmembranska napetost torej igra ključno vlogo pri nastajanju, širjenju in krčenju por.

Čeprav je bila osnovna teorija elektroporacije razvita na podlagi raziskav na ravninskih lipidnih dvoslojih, je bilo pozneje pokazano, da se celične membrane kvalitativno obnašajo na enak način [12]. Tako enačbo Smoluchowskega danes uporabljamo tudi za opisovanje elektroporacije celičnih membran [17].

2.2 Asimptotični model elektroporacije

Zgoraj opisana enačba Smoluchowskega podrobno popisuje elektroporacijo, vendar je enačba analitično nerešljiva. Zaradi eksponentnega izraza (3) pa je zahtevna tudi za numerično reševanje. Zato sta Neu in Krassowska za opis elektroporacije predlagala asimptotično redukcijo parcialne diferencialne enačbe (1) v navadno diferencialno enačbo [15]:



Slika 1: Shematski prikaz elektroporacije. (a–c) Običajni protokol elektroporacije celic. (a) Celice v suspenziji ali pritrjene na podlago inkubiramo v mediju, ki vsebuje molekule, ki jih želimo vnesti v celice. Obenem v posodo, kjer se nahajajo celice, namestimo elektrode (prikazane kot črno območje na levi in desni strani). (b) Na elektrode dovedemo enega ali več električnih pulzov izbrane oblike, dolžine, amplitude in ponavljalne frekvence, ki povzročijo elektroporacijo celičnih membran. Dokler so celice elektroporirane, lahko molekule iz okoliškega medija prehajajo v celico. (c) Če so parametri pulzov ustrezno izbrani, se celične membrane po nekaj sekundah ali minutah (odvisno od vrste celic in eksperimentalnih pogojev) zacelijo. Vnesene molekule ostanejo ujetе v celici, kjer lahko začnejo učinkovati. (d) Povečan prikaz elektroporirane celice. (e) Graf, ki prikazuje transmembransko napetost (črna črta) in gostoto por v membrani (siva črta) 100 μ s po izpostavitvi pravokotnemu električnemu pulzu, ki povzroči električno poljsko jakost med elektrodama $E = 1$ kV/cm. Transmembranska napetost doseže najvišjo absolutno vrednost na levi in desni strani celice (glej d). Ker je nastanek por eksponentno odvisen od kvadrata transmembranske napetosti, na tem območju membrane nastane veliko por. Nastanek por znatno zmanjša upornost membrane, zato se transmembranska napetost nekoliko sesede. To opazimo kot sploščen potek transmembranske napetosti v okolici $\theta = 90^\circ$ in $\theta = 270^\circ$. Če ne bi prišlo do elektroporacije, bi bil potek transmembranske napetosti vzdolž membrane kosinusen, kar je na grafu nakazano s črno prekinjeno črto. Izračun je bil dobljen z asimptotičnim modelom elektroporacije (glej razdelek 2.2) za celico z radijem 10 μ m pri fizioloških pogojih. (f) Shematski prikaz nastanka pore na molekularni ravni. V lipidnem dvosloju, iz katerega je zgrajena celična membrana, nastane pora tako, da se lipidi s svojimi glavami obrnejo v notranjost pore. Če je transmembranska napetost prisotna dovolj dolgo, se pora začne širiti.

$$\frac{dN}{dt} = \alpha e^{\left(\frac{U_m}{U_{ep}}\right)^2} \left(1 - \frac{N}{N_0} e^{-q\left(\frac{U_m}{U_{ep}}\right)^2}\right) \quad (4)$$

Če v enačbi (1) n pomeni porazdelitev populacije por v prostoru njihovih radijev, potem N pomeni gostoto por (celotno število por na enoto površine membrane A_m), ki jo določimo kot:

$$N = \frac{1}{A_m} \int_0^\infty n dr_p \quad (5)$$

Parametri modela α , U_{ep} , N_0 in q so konstante, ki jih je sicer mogoče oceniti iz parametrov enačbe (1). Ker so zadnji na splošno znani le na velikostni razred natančno, pa so bili α , U_{ep} , N_0 in q izbrani tako, da je model ustrezno opisal rezultate eksperimentov na ovarijskih celicah morskega ježka [18,19].

2.3 Razširjeni asimptotični model elektroporacije

Pri asimptotičnem modelu predpostavimo, da imajo vse pore enak radij. Praktično gledano, enačba (4) povzema le hitrost nastajanja in izginjanja por, torej izraz $S_c(r_p) + S_d(r_p)$ na desni strani enačbe (1). Zaradi te omejitve sta Neu in Krassowska asimptotični model razširila s še eno navadno diferencialno enačbo, ki opisuje širjenje in krčenje vsake posamezne pore [20,21]:

$$\frac{dr_{p,j}}{dt} = -\frac{D_p}{kT} \frac{\partial \Delta W(r_{p,j})}{\partial r_{p,j}}, \quad j = 1, 2, \dots, M \quad (6)$$

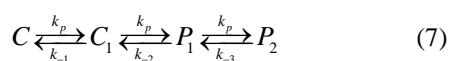
V enačbi (6) pomeni $r_{p,j}$ radij j -te pore v membrani, pri čemer je M celotno število por, ki so nastale v skladu z enačbo (4). ΔW je sprememba energije iz enačbe (1).

Omenimo na tem mestu, da je razširjeni asimptotični model sicer lažje rešljiv kot enačba Smoluchowskega. Vendar se moramo zavedati, da je treba enačbo (6) v

principu rešiti za vsako posamezno poro, ki nastane v membrani. Ker je por lahko tudi več kot 10^4 , postane reševanje modela zelo potratno v smislu računalniškega časa. Z dobrim računskim algoritmom pa je mogoče čas računanja skrajšati na sprejemljivo dolžino [21].

2.4 Elektroporacija kot reakcijska shema

V nasprotju z enačbo Smoluchowskega lahko nastajanje por predstavimo tudi z reakcijsko shemo, ki opisuje prehajanje lipidne membrane iz neelektroporirane faze (C) v elektroporirano fazo (P): $(C) \leftrightarrow (P)$ [22,23]. Na podlagi spremljanja vnosa molekul v celice med elektroporacijo je bilo pokazano, da morata obstajati najmanj dve stopnji C in dve stopnji P [22]. Najpreprostejša reakcijska shema je tako:



V zgornji shemi predpostavljamo, da obstajata dva tipa por, P_1 in P_2 . Pri tem so pore P_2 tiste, ki omogočajo transport molekul. Konstanta reakcijske hitrosti k_p pa je odvisna od eksponenta spremembe električne energije, enako kot pri izrazu (3):

$$k_p = k_{p0} \exp\left(\frac{\Delta C_p U_m^2}{2kT}\right) \quad (8)$$

Ob prisotnosti transmembranske napetosti je k_p bistveno večja od konstant k_{-1} , k_{-2} in k_{-3} in prevladuje nastajanje por. Po umiku transmembranske napetosti pa se pore začnejo celiti v skladu s hitrostnimi konstantami $k_{-3} < k_{-2} < k_{-1}$, ki jih lahko obravnavamo kot neodvisne od transmembranske napetosti [22].

S primerjavo vseh opisanih modelov opazimo, da so si v osnovi zelo podobni. Vsi vsebujejo sorodne izraze, ki opisujejo nastajanje por pod vplivom transmembranske napetosti. Bistvena razlika med modeli pa je način, kako obravnavajo velikost por. Asimptotični model in model po reakcijski shemi predpostavljata konstantne velikosti por, medtem ko enačba Smoluchowskega in razširjeni asimptotični model obravnavata pore kot dinamične strukture, ki se lahko s časom širijo in krčijo. Velikost por je pomembna, kadar želimo proučevati, katere molekule in v kakšni količini bi lahko prehajale membrano pri elektroporaciji s pulzi različnih dolžin. Znano je namreč, da nanosekundni pulzi povzročijo nastanek manjših por, ki v glavnem omogočajo prehod le molekulam, katerih premer je manjši od ~ 1 nm [24]. V tem primeru za opis elektroporacije povsem zadostuje asimptotični model [25]. Nasprotno lahko s pulzi v območju več sto mikrosekund ali nekaj milisekund vnesemo v celice tudi velike molekule DNA [21,26]. Za korektno modeliranje transporta velikih molekul moramo nujno uporabiti modele, ki zajemajo dinamiko velikosti por. Omenimo še, da je bilo eksperimentalno

pokazano, da je mogoče molekule RNA vnesti v lipidne vezikle tudi s pulzi dolžine 10 ns [27]. Povzamemo lahko, da je pri modeliranju transporta velikih molekul tako rekoč nujna uporaba enačbe Smoluchowskega ali razširjenega asimptotičnega modela, ne glede na dolžino obravnavanih pulzov.

3 MODEL TRANSPORTA MOLEKUL

Oglejmo si zdaj še princip modeliranja molekularnega transporta. Gibanje molekul kot posledico koncentracijskega gradienta in elektroforetske sile običajno opišemo z Nernst-Planckovo enačbo:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\nabla J_s = D_s \nabla \left(\nabla c + \frac{q_e z_s c}{kT} \nabla V \right). \quad (9)$$

Pri tem je c koncentracija molekul, D_s difuzijska konstanta molekul, q_e in z_s sta elementarni naboj in naboj molekule, V pa je električni potencial.

Enačba (9) opisuje prosto gibanje molekul v prostoru. Za opis transporta prek membrane pa lahko privzamemo nekaj poenostavitev. Ker je membrana zelo tanka (~ 5 nm), lahko predpostavimo, da transport prek membrane poteka le pravokotno na membrano. Zaradi tanke membrane lahko znotraj membrane predpostavimo tudi kvazistatičnost enačbe (9); velja torej $\partial c / \partial t = 0$. Ta predpostavka je upravičena, saj se koncentracija molekul znotraj membrane zelo hitro uravnesi (v nanosekundah) [28]. Če še gradient električnega potenciala ∇V zapišemo kot kvocient transmembranske napetosti U_m in debeline membrane d_m , se izraz za pretok molekul J_s poenostavi v:

$$J_s = -D_s \left(\frac{\partial c}{\partial x} + \frac{q_e z_s c}{kT} \frac{U_m}{d_m} \right) \quad (10)$$

Z integracijo zgornje enačbe dobimo rešitev:

$$J_s = \begin{cases} -D_s \frac{c_i - c_e}{d_m} & u_m = 0 \\ -D_s \frac{u_m}{d_m} \frac{c_i - c_e e^{u_m}}{e^{u_m} - 1} & u_m \neq 0 \end{cases}, \quad (11)$$

pri čemer je u_m brezdimenzionalna transmembranska napetost, $u_m = \{q_e z_s / (kT)\} U_m$, c_i in c_e pa sta koncentraciji molekul na notranji in zunanji strani membrane. Kadar je membrana v elektroporiranem stanju bistveno dlje (lahko tudi nekaj minut), kot traja samo dovajanje pulzov, se večji del molekularnega transporta odvija po dovajanju pulzov [29,30]. V tem primeru lahko prispevek zaradi elektroforetske sile zanemarimo oziroma privzamemo, da je $u_m = 0$.

Pretok molekul pa ne teče prek celotne membrane, temveč le prek por v membrani. Najpreprostejši način, kako J_s omejimo zgolj na elektroporirano površino

membrane, je, da J_s množimo s skupnim deležem vseh por v membrani δA_p [28]. Ta delež zapišemo različno glede na model elektroporacije, ki smo ga uporabili. Če smo na primer uporabili enačbo Smoluchowskega, je izraz za δA_p enak

$$\delta A_p = \frac{\pi}{A_m} \int_0^\infty n r_p^2 d r_p, \quad (12a)$$

če smo uporabili razširjeni asimptotični model, pa

$$\delta A_p = \frac{\pi}{A_m} \sum_j r_{p,j}^2, \quad (12b)$$

kjer je A_m površina membrane, ki jo opazujemo. Pri tem smo predpostavili, da lahko najozži del notranjosti pore opišemo s krogom, katerega radij je r_p . Površina ene pore, ki je na voljo za prehajanje molekule, je potem določena kot πr_p^2 .

Pri množenju J_s z δA_p pa naletimo na omejitve. Ne moremo namreč ločiti transporta večjih molekul od transporta manjših. Z drugimi besedami, skupna površina por je lahko enaka, če je v membrani bodisi večje število manjših por bodisi manjše število večjih por. Vemo pa, da molekule ne morejo prehajati skozi pore, ki so manjše od njih samih [24,31].

Velikost molekul lahko upoštevamo s faktorjem steričnega oviranja, $H(r_p, r_s)$, ki je odvisen od radija por r_p in radija molekule r_s . Eden od izrazov, s katerim ga opišemo, je [25]:

$$H = \left(1 - \left(\frac{r_s}{r_p}\right)\right)^2 \left(1 - 2.1 \left(\frac{r_s}{r_p}\right) + 2.09 \left(\frac{r_s}{r_p}\right)^3 - 0.95 \left(\frac{r_s}{r_p}\right)^5\right) \quad (13)$$

Faktor H lahko zavzame vrednosti med 0 in 1; manjša je pora, manjši je H (molekule težje prehajajo skozi manjše pore), ter manjša je molekula, večji je H (manjše molekule lažje prehajajo skozi pore).

Poleg faktorja H lahko v model dodamo faktor $K(r_p, z_s, U_m)$, s katerim upoštevamo še naboj molekul. Bolj nabite molekule namreč težje prehajajo pore, saj je energijsko neugodno, da nabit delec zaide v poro v lipidni membrani. Ko je nabit delec prisoten v pori, se namreč v stenah pore ustvarijo navidezni naboji nasprotnega predznaka kot sam delec, in ga zato odbijajo. Faktor K lahko zapišemo kot [16,18,25]:

$$K = \frac{e^{u_m} - 1}{\frac{w_0 e^{w_0 - \eta u_m} - \eta u_m}{w_0 - \eta u_m} e^{u_m} - \frac{w_0 e^{w_0 + \eta u_m} + \eta u_m}{w_0 + \eta u_m}}, \quad (14)$$

kjer je w_0 Bornova energija (v enotah kT), potrebna za postavitev iona na sredino pore, η pa je geometrijski

faktor, ki opisuje obliko pore. Tudi faktor K lahko zavzame le vrednosti med 0 in 1.

Oba faktorja preprosto vnesemo v model z množenjem izraza za δA_p :

$$\delta A_p = \pi \int_0^\infty n r_p^2 K H d r_p, \quad (15a)$$

$$\delta A_p = \pi \sum_j r_{p,j}^2 K H. \quad (15b)$$

Dodatne podrobnosti o modeliranju transporta molekul prek elektroporirane membrane in o tem, kako lahko upoštevamo tudi obliko molekul, pa najdemo v [17].

4 UPORABA MODELOV ELEKTROPORACIJE

Opisane modele elektroporacije lahko uporabimo za načrtovanje novih eksperimentalnih protokolov ali za interpretacijo pridobljenih eksperimentalnih rezultatov. V nadaljevanju se bova omejila na dva konkretna primera uporabe, in sicer za:

1. optimizacijo elektrozlivanja celic različnih velikosti in
2. interpretacijo eksperimentalnih rezultatov, ki so pokazali povečan vnos molekul v celice pri nižji prevodnosti zunajceličnega medija.

4.1 Optimizacija elektrozlivanja celic različnih velikosti

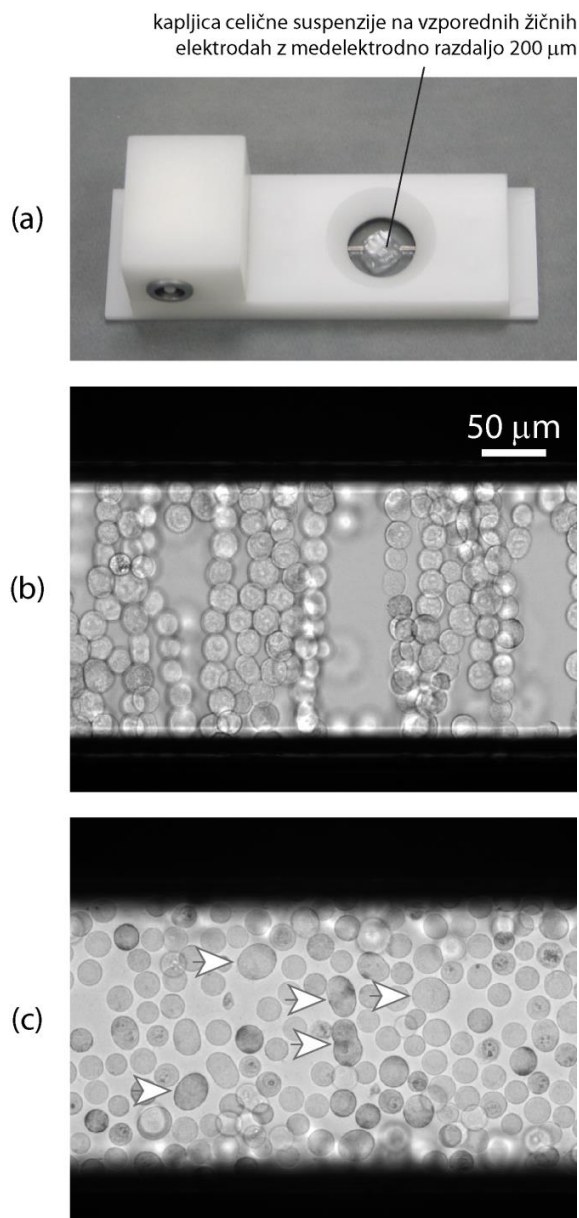
Elektrozlivanje je metoda, pri kateri z elektroporacijo dosežemo, da se različne celice lahko zlijejo med sabo. Nastanek por v membrani namreč povzroči, da celična membrana postane fuzogena, tj. sposobna zlivanja z drugo celično membrano. Če se torej dve celici z elektroporiranimi membranama nahajata v stiku, se lahko zlijeta v eno celico (slika 2) [32].

Z zlivanjem običajno pridobivamo hibridne celice, ki združujejo lastnosti starševskih celic, iz katerih so nastale. Tako je mogoče hibridizirati rastline, ki postanejo odporne na različne okoljske dejavnike [33], pripraviti celična cepiva za stimulacijo imunskega odziva pri zdravljenju raka [34] ter celice, ki proizvajajo inzulin in jih lahko uporabimo pri raziskavah in zdravljenju diabetesa [35]. Najbolj razširjen primer zlivanja, ki si ga bomo v nadaljevanju tudi podrobneje ogledali, pa je zlivanje limfocitov B in mielomskih celic v t. i. hibridome, ki proizvajajo monoklonska protitelesa [36].

Limfociti B so bele krvne celice, ki proizvajajo posebne proteine, imenovane protitelesa, s katerimi onesposobijo različne tuje/sovražne celice v našem telesu. Vsak limfocit B proizvaja le en tip protiteles, medtem ko več limfocitov B lahko proizvaja isti tip protiteles. Vsako protitelo pa ima specifično vezavno mesto za natančno določen antigen (na primer molekulo

v membrani bakterije ali virusa). Ko se protiteleso veže na ta antigen, ga s svojo vezavo onesposobi ali ga označi za napad s strani celic imunskega sistema.

Kadar imunski sistem ne zmore prepoznati sovražnih celic v telesu (npr. pri raku), ali napačno prepozna lastne celice kot sovražne (pri avtoimunskih boleznih),



Slika 2: Osnovni postopek elektrozlivanja celic. (a) Komora za zlivanje celic (Eppendorf). (b,c) Mikroskopske slike svetlobnega polja pri povečavi $\times 20$. Črno območje zgoraj in spodaj so elektrode. Med elektrodama so celice mišjih melanomov B16-F1. (b) Celice najprej dielektroforetsko uredimo v verige z izmeničnim sinusnim električnim signalom (tukaj 2 MHz, 5 V_{pp}, 30 s). Potem jih izpostavimo elektroporacijskim pulzom (tukaj 20 pravokotnih pulzov 100 ns, 180 V, ponavljalna frekvenca 1 kHz) in nato ponovno dielektroforetskemu signalu, da celice ostanejo v stiku in se lahko zlijejo. (c) Celice 8 minut po dovajanju pulzov. Nekaj zlitih celic je označenih s puščicami.

lahko imunski sistem stimuliramo oz. zavremo z vnosom ustreznih protiteles v krvni obtok. Takšna zdravila, ki spadajo med biološka, veljajo za eno najbolj avtoimunskih strategij pri zdravljenju določenih vrst raka, avtoimunskih in infekcijskih boleznih [37–39].

Protitelesa zaradi svoje specifične vezave na točno določen antigen lahko uporabimo tudi za detekcijo različnih molekul. Tako imenovani imunski testi (ang. *immunoassay*) se med drugim uporabljajo pri ugotavljanju nosečnosti, alergij in različnih okužb (HIV, hepatitis, malarija, tuberkuloza idr.). Poleg uporabe v medicini pa so imunski testi že desetletja nepogrešljivo orodje pri raziskavah v biologiji, biotehnologiji, biokemiji, farmaciji in drugih sorodnih vedah [40,41].

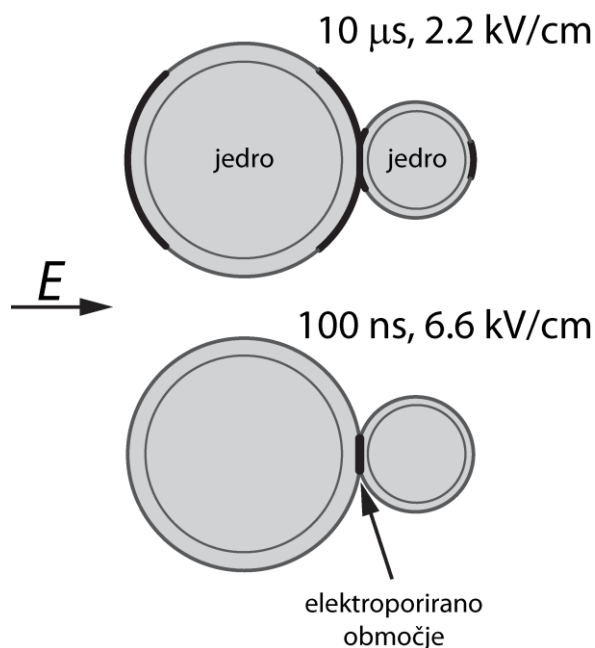
Kot je bilo že rečeno, so osnovni vir protiteles limfociti B. Žal samih limfocitov B ne moremo gojiti zunaj njihovega naravnega okolja, saj odmrejo po nekaj dneh. Če pa jih zlijemo z mielomskimi celicami (rakavimi limfociti), ki so nesmrtni, pridobimo zlite celice (hibridome), ki jih lahko leta uporabljamo za pridobivanje določenih protiteles. Ker vsa protitelesa prihajajo iz enega klona zlitih celic, jih imenujemo monoklonska protitelesa, celotno tehnologijo tako pridobljenih protiteles pa hibridna tehnologija.

Konvencionalna metoda zlivanja v hibridni tehnologiji je sicer uporaba polietilen glikola, vendar se je elektrozlivanje izkazalo za učinkovitejše glede števila pridobljenih hibridomov [42]. Žal pa ima tudi elektrozlivanje svoje omejitve, saj je obsežnost elektroporacije celične membrane sorazmerna z velikostjo celic, limfociti B pa so približno dvakrat manjši od mielomskih celic. Če torej limfocite B in mielomske celice hkrati izpostavimo električnim pulzom, ki zagotovijo elektroporacijo limfocitov B, lahko ti pulzi ireverzibilno elektroporirajo mielomske celice [36]. Tako je tudi število preživelih hibridomov zelo majhno. V najboljšem primeru dosežemo največ ~1 % hibridomov na število uporabljenih limfocitov B [42,43].

Običajno se za elektrozlivanje uporabljajo električni pulzi z dolžinami v območju od 10–100 μs . Z uporabo numeričnega modeliranja pa smo ugotovili, da lahko s skrajšanjem dolžine pulzov v območju nanosekund omejimo elektroporacijo le na območje stika med celicami, torej le tam, kjer je to potrebno za elektrozlivanje (Slika 3) [44]. Načeloma pri tem ne poškodujemo nobene od celic, ne glede na njihovo velikost, s tem pa lahko izboljšamo število pridobljenih hibridomov.

Model, s katerim smo prišli do opisanih ugotovitev, je temeljil na asimptotičnem modelu elektroporacije. Ker vemo, da je temeljni pogoj za elektrozlivanje elektroporacija celičnih membran na območju stika med celicami [32], je ta model zadostoval za raziskovanje možnosti elektrozlivanja celic z različnimi parametri električnih pulzov. Na podlagi primerjave rezultatov elektrozlivanja celic mišjih melanomov B16-F1 z napovedmi numeričnega modela pa smo ugotovili, da

se model dobro ujema z eksperimentalnimi rezultati [44].



Slika 3: Primerjava elektroporacije dveh različnih celic v stiku z 10 μ s in 100 ns pravokotnim pulzom [44]. Znotraj celic se nahajajo še celična jedra. Elektroporirano območje membran je označeno odebeljeno. 10 μ s pulz povzroči obsežno elektroporacijo velike celice, kar celico lahko poškoduje do te mere, da ne preživi. 100 ns pulz nasprotno povzroči samo elektroporacijo stika med celicami. Teoretično lahko torej z nanosekundnim pulzom dosežemo elektrozlivanje, ne da bi poškodovali katerikoli od celic.

4.2 Povečan vnos molekul v celice pri nižji prevodnosti zunajceličnega medija

Z električnega stališča ima celična membrana zelo nizko prevodnost v nasprotju z zunajceličnim medijem in notranjostjo celice (citoplazme), ki sta zaradi visoke vsebnosti ionov razmeroma dobro prevodni. Hkrati je celična membrana zgrajena iz lipidov in proteinov in ima zato nizko relativno dielektričnost (~ 5). Celico tako lahko poenostavljeno obravnavamo kot vase sklenjen kondenzator.

Pri izpostavitvi električnemu pulzu se celična membrana (kondenzator) naelektri prek upornosti zunajceličnega medija in citoplazme. V mediju z višjo upornostjo (nižjo prevodnostjo) se bo membrana naelektrila počasneje, obenem pa bo tudi najvišja dosežena transmembranska napetost nekoliko nižja, saj del napetosti, kateri izpostavimo celice, pade že na upornosti zunajceličnega medija [45].

V razdelku 2 smo prikazali, da je nastajanje por eksponentno odvisno od kvadrata transmembranske napetosti U_m . Povsem upravičeno bi potem pričakovali, da bo celična membrana v nižje prevodnem mediju manj elektroporirana in da bo transport molekul prek

membrane posledično manjši. Vendar nekateri poskusi kažejo drugače.

Djuzenova in sodelavci so pokazali, da se je količina vnesenih molekul propidijevega jodida v celice monotono povečevala, če so prevodnost zunajceličnega medija znižali iz ~ 0.5 S/m na ~ 0.1 S/m [46]. Pri tem so celice izpostavili eksponentno padajočemu pulzu s časovno konstanto 40 μ s, ki je povzročil maksimalno amplitudo električne poljske jakosti od 0.7 do 6 kV/cm. Podobno so pokazali Müller in sodelavci, le da so celice izpostavili pravokotnemu pulzu z dolžino od 11 do 95 ns, ki je povzročil električno poljsko jakost od 40 do 160 kV/cm [47]. Rezultati Sadika in sodelavcev so bili v skladu z zgornjimi raziskavami, pri čemer so ti uporabili zunajcelični medij s prevodnostjo od 0.2 do 0.01 S/m ter pravokotni pulz z dolžino 100 ms z amplitudo 0.8 kV/cm [48].

Kako torej razložiti povečan vnos propidijevega jodida? Müller in sodelavci so predlagali elektrodeformacijo kot odgovorni mehanizem. V mediju z nižjo prevodnostjo se celice podaljšajo v smeri električnega polja, kar naj bi povzročilo obsežnejšo elektroporacijo celic [47]. Teoretična študija, ki so jo naredili Li in sodelavci, pa je predlagala drug mehanizem [49]. Njihov model, ki je temeljil na razširjenem asimptotskem modelu elektroporacije in modelu transporta molekul po Nernst-Planckovi enačbi, je pokazal naslednje. V zunajceličnem mediju z nižjo prevodnostjo je električno polje v neposredni okolici celice večje kot v mediju z višjo prevodnostjo. Elektroforetska sila, ki med prisotnostjo električnega pulza vleče molekule propidijevega jodida v celico, je potem v nižje prevodnem mediju večja, zato je tudi vnos molekul v nižje prevodnem mediju večji.

Pri tem je seveda treba predpostaviti, da je večina molekul vnesena v celico elektroforetsko že med samim pulzom, difuzija molekul po pulzu pa manj pripomore k celotnemu transportu. To se sicer sklada z eksperimentalnimi rezultati Sadika in sodelavcev [48], ne pa z rezultati Puciharja in sodelavcev [30]. Ti so pokazali, da je vnos molekul propidijevega jodida med samim pulzom zanemarljiv v primerjavi z vnosom po pulzu. Razlog za nesoglasje med omenjenima eksperimentalnima raziskavama bi lahko bil v uporabljeni dolžini električnega pulza. Pucihar in sodelavci so uporabili pulz z dolžino 1 ms, medtem ko so Sadik in sodelavci uporabili bistveno daljši pulz, 100 ms. Pri daljšem pulzu je elektroforetska sila prisotna dlje, zato je tudi elektroforetski prispevek transporta molekul večji. Morda še pomembnejši razlog za nesoglasje pa je razlika v času celjenja celičnih membran po izpostavitvi pulzu (poskusi so bili narejeni na celicah različnega tipa). Iz eksperimentalnih rezultatov lahko razberemo, da je bil čas celjenja pri poskusu Puciharja in sodelavcev daljši od 8 s, medtem ko se je pri poskusu Sadika in sodelavcev končal po približno 1.5 s. Daljši čas celjenja membran omogoča, da difuzno gibanje molekul poteka še dolgo po pulzu,

prispevek vnesenih molekul zaradi difuzije pa prevlada nad prispevkom zaradi elektroforeze.

Zgoraj opisani primer nazorno prikaže, kako sočasno modeliranje elektroporacije in transporta molekul lahko razloži določen pojav na način, do katerega ne moremo priti zgolj intuitivno. Obenem pa opisano nesoglasje v raziskavah nakaže na dejstvo, da modeli elektroporacije in transporta molekul še zdaleč niso razviti do te mere, da bi lahko razložili vse, kar nam kažejo poskusi [50].

5 SKLEP

Modeliranje elektroporacije je poseben izziv, saj pojav še vedno ni povsem razumljen [50]. Ker por v membrani ne moremo neposredno opazovati v realnem času, jih lahko proučujemo le posredno prek molekularnega transporta, meritev transmembranske napetosti in prevodnosti membrane [1,19]. V zadnjem desetletju so k razumevanju elektroporacije močno pripomogle simulacije molekularne dinamike, vendar so te računsko zelo zahtevne. Zato smo pri simulacijah omejeni na opazovanje majhnega koščka membrane (reda 100 nm^2), katerega gibanje lahko spremljamo do nekaj 100 ns po izpostavitvi električnemu polju [9,10]. Čeprav simulacije ponujajo nepogrešljiv vpogled v dogajanje na molekularni ravni, trenutno še ne morejo ponuditi odgovorov na vsa vprašanja. Ne nazadnje pa se je treba zavedati, da so lipidni dvosloji, ki jih opazujemo v simulacijah, bistveno preprostejši od celičnih membran. Še vedno ni povsem znano, v kolikšni meri in na kakšen način pri elektroporaciji sodelujejo druge membranske strukture, kot so membranski proteini in citoskelet.

Posebna uganka elektroporacije pa je pravzaprav celjenje membran po dovajanju električnih pulzov. Simulacije molekularne dinamike kažejo, da se pore po umaknitvi transmembranske napetosti zaprejo v nekaj nanosekundah [10], celice pa lahko ostanejo elektroporirane tudi več minut [50]. V prejšnjem razdelku smo omenili, da ima časovna konstanta celjenja celičnih membran pomembno vlogo predvsem pri transportu molekul, saj je lahko bistveno daljša od trajanja samih pulzov in se zato lahko večina transporta odvije po dovajanju pulzov.

Fizikalne razlage za dolgotrajno celjenje membran po elektroporaciji še ni na voljo. V modele ga lahko dodamo »umetno«, tako da v enačbah spreminjamo vrednosti parametrov, ki opisujejo celjenje, ali obstoječim enačbam dodamo izraz, ki povzema eksperimentalne rezultate [18,23]. Za mehanistični opis celjenja celične membrane so torej potrebni nadaljnje raziskave in razvoj modelov.

Dokler pa novejših in bolj izpopolnjenih modelov elektroporacije ni na voljo, si moramo pomagati z obstoječimi. Kateri model bomo izbrali, je odvisno od namena njegove uporabe. Posebej pozorni moramo biti pri obravnavi transporta velikih molekul, saj potrebujemo informacijo o velikosti por, če želimo napovedati, ali bodo molekule sploh lahko prehajale membrano. Zaradi zahtevnosti numerične

implementacije in računske zahtevnosti modelov, ki opisujejo dinamiko velikosti por, pa je smiselno premisliti, ali za svojo raziskavo res potrebujemo tako kompleksen model. V določenih primerih ponujata asimptotični model in model po reakcijski shemi povsem zadovoljive rezultate [18,22,23,25,44].

ZAHVALA

Raziskave je podprla Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) v okviru programov P2-0249 in IP-0510 ter financiranja za mladega raziskovalca 35414. Raziskave so bile izvedene pod okriljem Evropskega laboratorija za aplikacije pulznih električnih polj v biologiji in medicini (LEA EBAM).

LITERATURA

- [1] T. Kotnik, P. Kramar, G. Pucihar, D. Miklavčič, M. Tarek, Cell membrane electroporation - Part 1: The phenomenon, *IEEE Electr. Insul. Mag.*, 28 (2012) 14–23.
- [2] S. Haberl, D. Miklavčič, G. Serša, W. Frey, B. Rubinsky, Cell membrane electroporation - Part 2: The applications, *IEEE Electr. Insul. Mag.*, 29 (2013) 29–37.
- [3] M. Sack, J. Sigler, S. Frenzel, C. Eing, J. Arnold, T. Michelberger, W. Frey, F. Attmann, L. Stukenbrock, G. Müller, Research on industrial-scale electroporation devices fostering the extraction of substances from biological tissue, *Food Eng. Rev.*, 2 (2010) 147–156.
- [4] R. E. Neal, J. H. Rossmesl, P. A. Garcia, O. I. Lanz, N. Henao-Guerrero, R. V. Davalos, Successful treatment of a large soft tissue sarcoma with irreversible electroporation, *J. Clin. Oncol.*, 29 (2011) e372–e377.
- [5] A. Županič, D. Miklavčič, Segrevanje tkiva med ablacijo tumorjev z ireverzibilno elektroporacijo, *Elektroteh. Vestn.*, 78 (2011) 42–47.
- [6] C. Gusbeth, W. Frey, H. Volkmann, T. Schwartz, H. Bluhm, Pulsed electric field treatment for bacteria reduction and its impact on hospital wastewater, *Chemosphere*, 75 (2009) 228–233.
- [7] S. J. Beebe, N. M. Sain, W. Ren, Induction of cell death mechanisms and apoptosis by nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs), *Cells*, 2 (2013) 136–162.
- [8] D. Pavliha, M. Reberšek, D. Miklavčič, Krmilnik biomedicinskega visokonapetostnega signalnega generatorja z grafičnim uporabniškim vmesnikom, *Elektroteh. Vestn.*, 78 (2011) 79–84.
- [9] L. Delemotte, M. Tarek, Molecular dynamics simulations of lipid membrane electroporation, *J. Membr. Biol.*, 245 (2012) 531–543.
- [10] A. A. Gurtovenko, J. Anwar, I. Vattulainen, Defect-mediated trafficking across cell membranes: insights from in silico modeling, *Chem. Rev.*, 110 (2010) 6077–6103.
- [11] J. C. Weaver, Y. A. Chizmadzhev, Theory of electroporation: A review, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 41 (1996) 135–160.
- [12] L. V. Chernomordik, S. I. Sukharev, S. V. Popov, V. F. Pastushenko, A. V. Sokirko, I. G. Abidor, Y. A. Chizmadzhev, The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies, *Biochim. Biophys. Acta* 902 (1987) 360–373.
- [13] P. Kramar, D. Miklavčič, A. Maček Lebar, Merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev, *Elektroteh. Vestn.*, 76 (2009) 293–298.
- [14] I. G. Abidor, V. B. Arakelyan, L. V. Chernomordik, Y. A. Chizmadzhev, V. F. Pastushenko, M. P. Tarasevich, Electric breakdown of bilayer lipid membranes: I The main experimental facts and their qualitative discussion, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 6 (1979) 37–52.

- [15] J. C. Neu, W. Krassowska, Asymptotic model of electroporation, *Phys. Rev. E*, 59 (1999) 3471–3482.
- [16] R. W. Glaser, S. L. Leikin, L. V. Chernomordik, V. F. Pastushenko, A. I. Sokirko, Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores, *Biochim. Biophys. Acta*, 940 (1988) 275–287.
- [17] K. C. Smith, A unified model of electroporation and molecular transport, PhD thesis, Massachusetts Institute of Technology, 2011.
- [18] K. A. DeBruin, W. Krassowska, Modeling electroporation in a single cell I. Effects Of field strength and rest potential, *Biophys. J.*, 77 (1999) 1213–1224.
- [19] M. Hibino, M. Shigemori, H. Itoh, K. Nagayama, K. Kinoshita, Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential, *Biophys. J.*, 59 (1991) 209–220.
- [20] J. C. Neu, W. Krassowska, Modeling postshock evolution of large electropores, *Phys. Rev. E*, 67 (2003) 021915.
- [21] K. C. Smith, J. C. Neu, W. Krassowska, Model of creation and evolution of stable electropores for DNA delivery, *Biophys. J.*, 86 (2004) 2813–2826.
- [22] E. Neumann, K. Toensing, S. Kakorin, P. Budde, J. Frey, Mechanism of electroporative dye uptake by mouse B cells, *Biophys. J.*, 74 (1998) 98–108.
- [23] D. Miklavcic, L. Towhidi, Numerical study of the electroporation pulse shape effect on molecular uptake of biological cells, *Radiol. Oncol.*, 44 (2010) 34–41.
- [24] O. M. Nesin, O. N. Pakhomova, S. Xiao, A. G. Pakhomov, Manipulation of cell volume and membrane pore comparison following single cell permeabilization with 60- and 600-ns electric pulses, *Biochim. Biophys. Acta*, 1808 (2011) 792–801.
- [25] Z. Vasilkoski, A. Esser, T. Gowrishankar, J. Weaver, Membrane electroporation: The absolute rate equation and nanosecond time scale pore creation, *Phys. Rev. E*, 74 (2006).
- [26] S. Haberl, M. Kandušer, K. Flisar, D. Hodžić, V. B. Bregar, D. Miklavčič, J. M. Escoffre, M. P. Rols, M. Pavlin, Effect of different parameters used for in vitro gene electrotransfer on gene expression efficiency, cell viability and visualization of plasmid DNA at the membrane level, *J. Gene Med.*, 15 (2013) 169–181.
- [27] M. Breton, L. Delemotte, A. Silve, L. M. Mir, M. Tarek, Transport of siRNA through lipid membranes driven by nanosecond electric pulses: An experimental and computational study, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 13938–13941.
- [28] J. Li, H. Lin, Numerical simulation of molecular uptake via electroporation, *Bioelectrochemistry*, 82 (2011) 10–21.
- [29] K. C. Smith, J. C. Weaver, Transmembrane molecular transport during versus after extremely large, nanosecond electric pulses, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 412 (2011) 8–12.
- [30] G. Pucihar, T. Kotnik, D. Miklavčič, J. Teissié, Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electroporated cells, *Biophys. J.*, 95 (2008) 2837–2848.
- [31] A. M. Bowman, O. M. Nesin, O. N. Pakhomova, A. G. Pakhomov, Analysis of plasma membrane integrity by fluorescent detection of Ti^+ uptake, *J. Membr. Biol.*, 236 (2010) 15–26.
- [32] J. Teissié, C. Ramos, Correlation between electric field pulse induced long-lived permeabilization and fusogenicity in cell membranes, *Biophys. J.*, 74 (1998) 1889–1898.
- [33] M. Greplová, H. Polzerová, H. Vlastníková, Electrofusion of protoplasts from *Solanum tuberosum*, *S. bulbocastanum* and *S. pinnatisectum*, *Acta Physiol. Plant.*, 30 (2008) 787–796.
- [34] C. Tan, J. Dannull, S. K. Nair, E. Ding, D. S. Tyler, S. K. Pruitt, W. T. Lee, Local secretion of IL-12 augments the therapeutic impact of dendritic cell-tumor cell fusion vaccination, *J. Surg. Res.*, 185 (2013) 904–911.
- [35] J. T. McCluskey, M. Hamid, H. Guo-Parke, N. H. McClenaghan, R. Gomis, P. R. Flatt, Development and functional characterization of insulin-releasing human pancreatic beta cell lines produced by electrofusion, *J. Biol. Chem.*, 286 (2011) 21982–21992.
- [36] K. Trontelj, M. Reberšek, M. Kandušer, V. Čurin-Šerbec, M. Šprohar, D. Miklavčič, Optimization of bulk cell electrofusion in vitro for production of human-mouse heterohybridoma cells, *Bioelectrochemistry*, 74 (2008) 124–129.
- [37] A. L. Nelson, E. Dhimolea, J. M. Reichert, Development trends for human monoclonal antibody therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9 (2010) 767–774.
- [38] A. M. Scott, J. D. Wolchok, L. J. Old, Antibody therapy of cancer, *Nat. Rev. Cancer*, 12 (2012) 278–287.
- [39] D. H. Barouch, J. B. Whitney, B. Moldt, F. Klein, T. Y. Oliveira, J. Liu, K. E. Stephenson, H.-W. Chang, K. Shekhar, S. Gupta, J. P. Nkolola, M. S. Seaman, K. M. Smith, E. N. Borducchi, C. Cabral, J. Y. Smith, S. Blackmore, S. Sanisetty, J. R. Perry, M. Beck, et al., Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys, *Nature*, 503 (2013) 224–228.
- [40] M. Z. Siddiqui, Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal, *Indian J. Pharm. Sci.*, 72 (2010) 12–17.
- [41] A 40-year-old paradox: the fascinating history of the ELISA, <http://blog.bosterbio.com/elisa-history> (3. 3. 2014).
- [42] X. Yu, P. A. McGraw, F. S. House, J. E. Crowe, An optimized electrofusion-based protocol for generating virus-specific human monoclonal antibodies, *J. Immunol. Methods*, 336 (2008) 142–151.
- [43] E. W. M. Kemna, F. Wolbers, I. Vermes, A. van den Berg, On chip electrofusion of single human B cells and mouse myeloma cells for efficient hybridoma generation, *Electrophoresis*, 32 (2011) 3138–3146.
- [44] L. Rems, M. Ušaj, M. Kandušer, M. Reberšek, D. Miklavčič, G. Pucihar, Cell electrofusion using nanosecond electric pulses, *Sci. Rep.*, 3 (2013) 3382.
- [45] T. Kotnik, F. Bobanović, D. Miklavčič, Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields—A theoretical analysis, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 43 (1997) 285–291.
- [46] C. S. Djuzenova, U. Zimmermann, H. Frank, V. L. Sukhorukov, E. Richter, G. Fuhr, Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electroporated myeloma cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1284 (1996) 143–152.
- [47] K. J. Müller, V. L. Sukhorukov, U. Zimmermann, Reversible electroporation of mammalian cells by high-intensity, ultra-short pulses of submicrosecond duration, *J. Membr. Biol.*, 184 (2001) 161–170.
- [48] M. M. Sadik, J. Li, J. W. Shan, D. I. Shreiber, H. Lin, Quantification of propidium iodide delivery using millisecond electric pulses: experiments, *Biochim. Biophys. Acta*, 1828 (2013) 1322–1328.
- [49] J. Li, W. Tan, M. Yu, H. Lin, The effect of extracellular conductivity on electroporation-mediated molecular delivery, *Biochim. Biophys. Acta*, 1828 (2013) 461–470.
- [50] J. Teissié, M. Golzio, M. P. Rols, Mechanisms of cell membrane electroporation: a minireview of our present (lack of?) knowledge, *Biochim. Biophys. Acta*, 1724 (2005) 270–280.

Lea Rems je diplomirala leta 2012 na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, kjer trenutno obiskuje doktorski študij in je zaposlena kot mlada raziskovalka. Njena raziskovalna zanimanja vključujejo numerično modeliranje elektroporacije in drugih bioloških procesov ter eksperimentalno delo *in vitro*, povezano z elektroporacijo.

Damijan Miklavčič je doktoriral leta 1993 na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, kjer je trenutno zaposlen kot redni profesor, in je vodja katedre za Biomedicinsko tehniko ter predstojnik Laboratorija za biokibernitiko. Njegovo raziskovalno delo je v zadnjih letih povezano s prenosom genov in zdravilnih učinkovin pri zdravljenju raka z elektroporacijo, razvojem strojne opreme in numeričnim modeliranjem bioloških procesov.