

Vzdražne celice HEK in njihov odziv na električne pulze različnih dolžin

Tina Cimperman, Tina Batista Napotnik, Lea Rems

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

Povzetek. Elektroporacija je pojav, ki nastane, ko biološke celice izpostavimo visokonapetostnim električnim pulzom. Slednji povzročijo začasno permeabilizacijo celične membrane, ki omogoči povečano prehajanje snovi v celico in iz nje. Pri uporabi elektroporacije v medicini tarčno tkivo pogosto sestavljajo tudi vzdražne celice, kot so nevroni in mišične celice. V nasprotju z nevzdražnimi imajo vzdražne celice sposobnost proženja električnih signalov (akcijskih potencialov, AP). Mehanizmi elektroporacije vzdražnih celic in vpliv permeabilizacije membrane na proženje AP še niso podrobno raziskani. Za takšne raziskave potrebujemo ustrezeni eksperimentalni model. V članku predstavljamo gensko spremenjene celice HEK, ki stabilno izražajo napetostne natrijeve ionske kanale in pogojno izražajo kalijeve ionske kanale. Prisotnost obeh vrst ionskih kanalov omogoča celicam proženje AP. Hkrati je celice enostavno gojiti v kulturi in z njimi izvajati eksperimente, zato so zanimiv model za raziskave vpliva elektroporacije na celično vzdražnost. Prvi rezultati spremljanja AP s fluorescenčno mikroskopijo pri teh celicah kažejo, da ima dolžina dovedenega električnega pulza vpliv na prag proženja in karakteristike AP. Na sposobnost proženja AP pa vpliva tudi konfluentnost celične kulture. Ti rezultati odpirajo nova vprašanja, ki so pomembna za razumevanje elektroporacije vzdražnih tkiv in prilagajanja na njej temelječih zdravljenj.

Ključne besede: elektroporacija, akcijski potencial, celice HEK, minimalni model, fluorescenčna mikroskopija

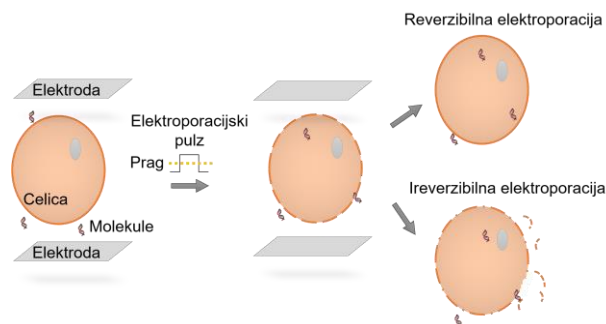
Excitable HEK cells and their response to electric pulses of different durations

Electroporation is a phenomenon associated with an increased permeability of biological cell membranes following exposure of cells to high-voltage electric pulses. An increased membrane permeability allows an increased transport of ions and molecules into and out of the cell. In medicine, the target tissue of electroporation often consists of excitable cells, such as neurons and muscle cells. Unlike non-excitable cells, excitable cells can trigger electric signals (action potentials, AP). The mechanisms by which electroporation influences AP generation are not yet well understood. To gain a better understanding, a suitable experimental model is needed. The paper presents a cell line of genetically modified HEK cells stably expressing voltage-gated sodium ion channels and conditionally expressing potassium ion channels, that together enable the cells to trigger AP. The cells can be easily grown in a cell culture and thus represent an interesting experimental model for investigating the effect of electroporation on cellular excitability. Monitoring AP with fluorescence microscopy in these cells shows that the duration of the applied electric pulse affects the threshold for triggering AP and the AP characteristics. Moreover, the cell confluency affects the ability of the cells to trigger AP. The presented results open new questions that are important for further research on electroporation of excitable tissues and the development of associated treatments.

Keywords: electroporation, action potential, HEK cells, minimal model, fluorescence microscopy

1 UVOD

Elektroporacija (ali elektropermeabilizacija) je pojav, ko izpostavitve bioloških celic *in vitro* ali tkiv *in vivo* visokonapetostnim električnim pulzom privede do začasno povečane prepustnosti celičnih membran za ione in molekule [1]. Povečana prepustnost je posledica električne napetosti, ki se ustvari na membrani zaradi zunanega električnega polja in jo imenujemo vsiljena transmembranska napetost (TMN). Da se poveča prepustnost membrane, mora TMN preseči določeno pragovno vrednost (reda nekaj 100 mV). V času povečane prepustnosti je mogoč vnos različnih učinkovin v celico in sprostitvev snovi iz nje (slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz elektroporacije.

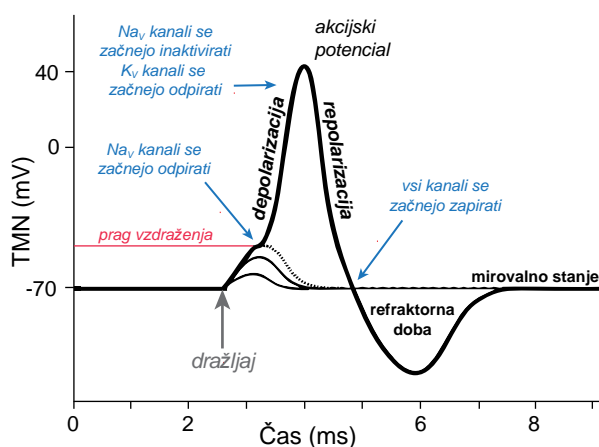
Med izpostavitvijo električnemu pulzu snovi prek membrane prehajajo predvsem s pomočjo elektroforetske sile, po izpostavitvi pa predvsem s pomočjo difuzije zaradi koncentracijskega gradienta [2]. Če se prepustnost membrane po koncu izpostavitve vrne v začetno stanje ter se celica vrne v homeostazo ter preživi, govorimo o reverzibilni elektroporaciji. Če celica ne more ponovno vzpostaviti homeostaze in nastopi celična smrt, pa govorimo o ireverzibilni elektroporaciji [3].

Elektroporacijo danes uspešno uporabljamo v medicini za zdravljenje raka (elektrokemoterapija, ablacija), gensko terapijo in DNK oz. RNK cepiva [4] ter vnos zdravil prek kože [5]. Uporabljamo jo tudi pri zdravljenju vzdražnih tkiv, kot so srce (zdravljenje srčnih aritmij [6]) in možgani (zdravljenje tumorjev [7] in epilepsije [8]). Pri zdravljenjih, ki temeljijo na elektroporaciji, električni pulzi vplivajo na vzdražne celice (živčne, mišične celice), tudi če te niso primarna tarča zdravljenja, kar lahko privede do neželenih stranskih učinkov, kot so bolečina, krčenje mišic in poškodbe živcev [9]. Na splošno je elektroporacija vzdražnih celic manj raziskana kot elektroporacija nevzdražnih celic, zato zahteva nadaljnje podrobnejše raziskovanje [10], [11].

Vzdražne celice, kot so živčne (nevroni), srčne (kardiomociti) in skeletnomišične celice (miociti), imajo sposobnost proženja in širjenja električnih signalov, znanih kot akcijski potenciali (AP). AP je kratkotrajna sprememba TMN vzdražne celice, ki jo običajno sproži neki električni dražljaj. Vzdražne celice igrajo ključno vlogo v različnih fizioloških procesih, med drugim pri električni aktivnosti možganov in perifernega živčnega sistema ter krčenju srčne mišice in skeletnih mišic [12].

AP je posledica odpiranja in zapiranja napetostno-odvisnih ionskih kanalov, tj. integralnih membranskih proteinov, ki spremenijo svojo konformacijo kot odgovor na spremembo TMN. V ravnovesnem stanju celica vzdržuje mirovno TMN, ki je pri vzdražnih celicah običajno bolj negativna od -70 mV, merjeno iz notranjosti celice proti zunanosti. Mirovna TMN je v veliki meri posledica razlike v znotrajcelični in zunajcelični koncentraciji ionov – predvsem natrija (Na^+) in kalija (K^+) – ki jo vzpostavijo ionski kanali in prenašalci. V zunanosti celice je več ionov Na^+ , v notranosti pa več K^+ . Prva faza proženja AP vključuje depolarizacijski dražljaj, ki odpre napetostnoodvisne natrijeve kanale, kar povzroči hiter dotok ionov Na^+ v celico, kar sproži depolarizacijo membrane (slika 2). Po kratkem obdobju depolarizacije se natrijevi kanali inaktivirajo in odprejo se napetostnoodvisni kalijeve kanali, kar povzroči iztok ionov K^+ iz celice, to pa sproži repolarizacijo. Temu sledi refraktorna doba, v času katere ni možno prožiti novega AP oz. je za sproženje potreben močnejši dražljaj, dokler TMN ponovno ne doseže mirovne vrednosti [12].

Nedavne študije so pokazale, da lahko elektroporacija povzroči spremembe v električnih in mehanskih lastnostih vzdražnih celic. Pri elektroporaciji kardiomiocitov so opazili začasno izginotje AP, začasne



Slika 2: Shematski prikaz akcijskega potenciala pri nevronu. Prirejeno po [12] in en.wikipedia.org/wiki/Action_potential.

oscilacije v znotrajceličnem kalciju ter dvig diastolične ravni kalcija, kar bi lahko imelo potencialne posledice pri srčni ablaciji z elektroporacijo, metodi za zdravljenje srčnih aritmij [10], [13]. Poleg tega lahko elektroporacija povzroči spremembe v presledkovnih stikih [14], [15], ki so kritični za pravilno prevajanje AP med povezanimi vzdražnimi celicami, zlasti med kardiomiociti. Elektroporacija pa lahko vpliva tudi na funkcijo napetostnoodvisnih ionskih kanalov [16].

Za sistematične raziskave elektroporacije vzdražnih celic potrebujemo ustrezne eksperimentalne in teoretične modele. Izolirane celice, kot so primarni kardiomiociti ali nevroni, bi bile najprimernejši eksperimentalni model. Vendar pa so primarne celice povezane s številnimi pomanjkljivostmi: izolacija iz živali je zapletena in dolgotrajna ter mora biti etično odobrena. Primarnih srčnih celic ne moremo uporabljati dlje od 24 ur, ker izgubijo svoje značilnosti in hitro propadejo [17]. Alternativa primarnim celicam je uporaba celičnih linij, kot so srčne celične linije H9c2, Ac16 in HL-1, ki so komercialno dostopne ter jih enostavno gojimo in razmnožujemo, vendar pa nimajo izraženih vseh lastnosti srčnih celic (npr. mišičnega krčenja). Inducirani pluripotentni kardiomiociti, pridobljeni iz matičnih celic, imajo nekaj prednosti pred celičnimi linijami (so sposobni krčenja), vendar so za zdaj še vedno omejeno komercialno dostopni [18].

Pri poskusih smo zato uporabili gensko spremenjeno celično linijo humanih embrionalnih ledvičnih celic HEK, ki izražajo minimalni nabor napetostnoodvisnih natrijevih in kalijevih ionskih kanalov, potrebnih za vzdražnost. Ker so celice sposobne proženja AP (*angl.* spiking), jih imenujemo S-HEK [19]. Zaradi svoje enostavnosti in v literaturi dobro ovrednotenih lastnosti kanalov, ki jih vsebujejo, so celice S-HEK zanimiv eksperimentalni model za proučevanje vpliva elektroporacije na vzdražne celice, ki nam olajša tudi teoretične študije odziva vzdražnih celic na elektroporacijske pulze.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Vzdražna celična linija S-HEK

Celično linijo S-HEK so z genskim inženirstvom razvili v skupini Adama E. Cohena na Univerzi Harvard [19]. Osnova za celice S-HEK je celična linija humanih embrionalnih ledvičnih celic (*angl.* human embryonic kidney cells) HEK293T (ATCC CRL-3216). Celice HEK293T se pogosto uporabljajo za elektrofiziološke študije ionskih kanalov; so namreč v osnovi nevzdražne, izražajo zelo malo endogenih ionskih kanalov, hkrati pa jih je mogoče relativno enostavno transfecirati [20], [21], [22]. Za razvoj celic S-HEK so HEK293T transfecirali, da stabilno izražajo natrijeve napetostne kanale $\text{Nav}1.5$ ter pogojno izražajo kalijeve kanale $\text{Kir}2.1$ (slika 3). $\text{Kir}2.1$ so izraženi skupaj z modrozelenim fluorescentnim proteinom (*angl.* cyan fluorescent protein, CyFP), kar omogoča preverjanje uspešnosti ekspresije s fluorescenčno mikroskopijo. Pogojno izražanje $\text{Kir}2.1$ deluje po *tet-on* sistemu, kjer antibiotik doksiciklin omogoči aktivacijo genske ekspresije [23]. Z gojenjem celic v prisotnosti doksiciklina tako dosežemo, da te postanejo vzdražne. $\text{Kir}2.1$ so pogojno izraženi, saj so empirično ugotovili, da se pri stabilnem izražanju število $\text{Kir}2.1$ s časom znatno manjša. Pogojno izražanje $\text{Kir}2.1$ pa ima za študij elektroporacije dodatno prednost, saj lahko hkrati proučujemo nevzdražno (brez $\text{Kir}2.1$) in vzdražno (z $\text{Kir}2.1$) različico iste celične linije ter tako sistematično raziskujemo vpliv vzdražnosti na odziv celic na elektroporacijo [24].

Naš laboratorij je celice S-HEK pridobil neposredno od Adama E. Cohena, danes pa so tudi že komercialno dostopne prek ameriške zbirke celičnih kultur ATCC (CRL-3479).



Slika 3. Izraženi ionski kanali pri celični liniji S-HEK (slika, narejena z BioRender.com).

2.2 Gojenje celic S-HEK

Celice S-HEK smo gojili v posodicah za celične kulture T75 (TPP, Švica) v 10 ml gojišča DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose, D5671, Sigma-Aldrich/Merck) z dodatkom 10 % telečjega seruma (F2442, Sigma-Aldrich/Merck), 2 mM glutamina (G7513, Sigma-Aldrich/Merck), antibiotikov penicilin in streptomycin (P07681, Sigma-Aldrich/Merck; penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml), 2 µg/ml puomicina, 5 µg/ml blastidina in 200 µg/ml geneticina (vsi od Thermo Fischer Scientific). Celice smo rutinsko presajali na tri ali štiri dni. Pred presajanjem smo jih najprej preverili pod svetlobnim mikroskopom, pri čemer smo

bili pozorni na konfluentnost (tj. delež pokritosti površine posodice s celicami) in morebitne okužbe. Nato smo celicam odsesali gojišče in jih sprali z 10 ml fiziološke raztopine (0,9 % NaCl, B. Braun). Zatem smo dodali 5 ml tripsina in celice za dve do dve minuti in pol postavili v inkubator na 37 °C in s 5 % CO_2 , da so se popolnoma odlepili od podlage. Tripsiniziranim celicam smo nato dodali 5 ml gojišča, da smo ustavili delovanje tripsina, in s pipeto dobro prepipetirali, da smo ustvarili homogeno celično suspenzijo. Na hemocitometer smo odmerili dvakrat po 10 µl celične suspenzije, celice pod svetlobnim mikroskopom prešteli in izračunali njihovo koncentracijo. Celice smo nato nasadili v posodice T75 oziroma jih pripravili za poskuse.

2.3 Priprava vzorcev za poskuse

Za poskuse smo celice nasadili v dvoprekatne komore za mikroskopijo Nunc Lab-Tek II (155379, Thermo Fischer Scientific) z dnom iz borosilikatnega stekla debeline št. 1,5 (tj. 0,16–0,19 mm). Komore smo najprej tretirali s polilizinom, in sicer v vsako jamico smo odpipetirali 2 ml fosfatnega pufru (PBS) in 3 µl polilizina. PBS je izotonični pufer, ki se pogosto uporablja v bioloških aplikacijah in posnema pH, osmolarnost in koncentracijo ionov v človeškem telesu, polilizin pa smo uporabili za spodbujanje adhezije celic na trdno podlago. To raztopino smo pustili v komori dve uri na sobni temperaturi in jo nato odsesali. V prekat komore smo zatem odpipetirali gojišče za celice HEK in celično suspenzijo v skupnem volumnu 1,5 ml. Ko smo pripravljali vzdražno različico celic S-HEK, smo v prekat dodali še 30 µl raztopine doksiciklina (končna koncentracija 4 µg/ml). Celice smo nato inkubirali dva ali tri dni.

Na dan poskusov smo celice najprej preverili pod svetlobnim mikroskopom, nato pa jim s pipeto previdno odsesali gojišče in dodali raztopino potenciometričnega barvila ElectroFluor630 (Di-4-ANEQ(F)PTEA, Potentiometric Probes, CT, USA). Barvilo ElectroFluor630 je molekula, ki se ji spremeni fluorescenca kot odziv na spremembe električnega polja v svojem okolju (membrani) in omogoča meritve sprememb v TMN. Raztopina z barvilom je vsebovala 997 µl gojišča in 3 µl ElectroFluor630 (končna koncentracija 12 µM). Celice z barvilom smo postavili v hladilnik (4 °C) za 20 minut, da se je celična membrana lepo obarvala. Inkubacija na hladnem minimizira difuzijo barvila v notranjost celice. Celicam smo po 20 minutah odvzeli barvilo in jih trikrat sprali z 1 ml pufru Tyrode sobne temperature (2 mM KCl, 125 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 30 mM glukoze, pH 7,3), nato pa dodali 1 ml pufru Tyrode z nižjo koncentracijo kalija (0,5 mM KCl, 126,5 mM NaCl, preostale komponente enako kot pri navadnem pufru Tyrode). Empirično smo ugotovili, da nižja koncentracija kalija omogoča bolj robustno proženje AP.

2.4 Mikroskopija

AP in druge spremembe TMN kot odziv na električne pulze smo spremljali z invertnim epifluorescenčnim mikroskopom Leica DMi8 Thunder Imager, ki smo ga krmilili s programskim orodjem Leica LAS-X pri 40-kratni povečavi objektivna (Leica HC PL FLUOTAR L 40 x/0,60 Corr). Celice smo osvetljevali z LED-viri Leica LED8, slike pa smo zajemali s kamero sCMOS Leica DFC9000 GT. Komoro Lab-Tek smo postavili na mikroskopsko mizico znotraj inkubatorja i8 BLACK (Pecon, Nemčija), ki je nameščen okrog mikroskopa, in sredino prekata s celicami namestili nad objektiv (slika 4). Najprej smo naredili svetlobni in fluorescenčni posnetek celic, kjer smo ekspresijo kanalov $K_{ir}2.1$ preverili z modrozelenim fluorescentnim proteinom CyFP, ki se izraža hkrati s kanali $K_{ir}2.1$ (slika 5), pri čemer smo upoštevali emisijski in eksitacijski spekter CyFP (slika 6). Kot vir svetlobe smo uporabili LED 390 nm s 100 % moči (200 mW) in opazovali emisijo prek večpasovnega filtra DFT51010, ki prepušča emisijsko svetlobo valovnih dolžin v območjih (sredina/pasovna širina) 435/30 nm, 519/25 nm, 594/32 nm, 695/58 nm.

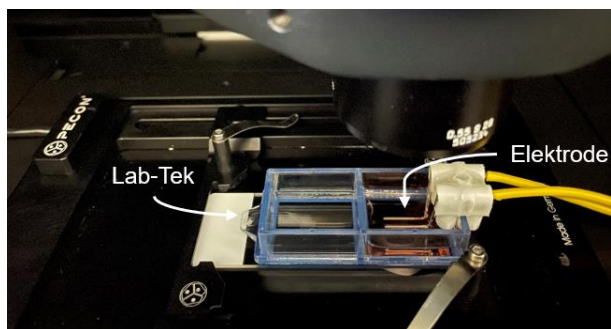
Nato smo upoštevali ekscitacijski in emisijski spekter barvila ElectroFluor630 (slika 6). To barvilo smo osvetljevali s svetlobo na robu ekscitacijskega spektra, da smo dosegli najboljšo občutljivost barvila za spremembe v TMN. Zato smo celice osvetljevali z LED pri valovni dolžini 635 nm s 50 % moči (100 mW), emisijo pa smo ponovno zaznavali prek večpasovnega filtra DFT51010. Za kontrolno svetlobno in fluorescenčno sliko smo uporabili čas izpostavljenosti 10 ms. Uporabili smo tudi 4 x binning, kar pomeni, da smo združili 4 x 4 zajete piksele v 1 piksel na sliki. Ločljivost se je posledično zmanjšala s faktorjem 16. S časovnim zajemanjem slik smo preverili, ali celice samodejno prožijo AP. Slike smo zajemali s časovnim intervalom 80 ciklov z najmanjšim možnim časom osvetlitve kamere, ki je 36 ms. Trajanje celotnega zajema je bilo 2,8 s.

Na komoro Lab-Tek smo nato namestili par vzporednih žičnih elektrod z razmikom 5 mm (slika 4) in ju priklopili na generator visokonapetostnih pulzov, razvit na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani [25]. Napetost in tok smo spremljali z osciloskopom LeCroy Wavepro 7300A (3 GHz), z visokonapetostno diferencialno sondo ADP305 (LeCroy, DC-100 MHz) in tokovno sondo AP015 (LeCroy, DC-50 MHz). Slika 7 prikazuje meritve dovedenih pulzov.

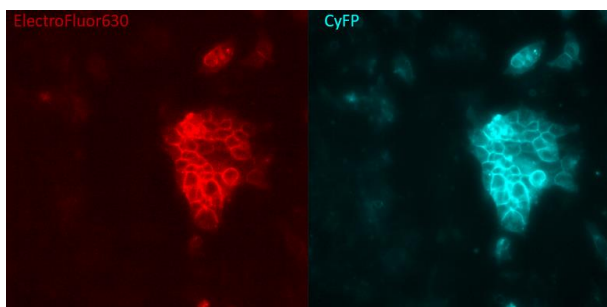
Za sinhronizacijo zajemanja slik z dovajanjem električnega pulza je poskrbela kontrolna enota mikroskopa, ki je ob 10. zajeti sliki (324 ms od začetka zajemanja slik) poslala signal TTL na elektroporator in ga sprožila.

2.5 Obdelava in analiza mikroskopskih slik

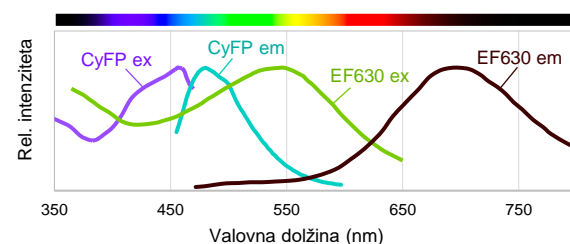
Zajete slike fluorescence ElectroFluor630 smo obdelali z namensko aplikacijo [24], narejeno v programu Matlab (Mathworks, Natick, MA, ZDA). Aplikacija je bila



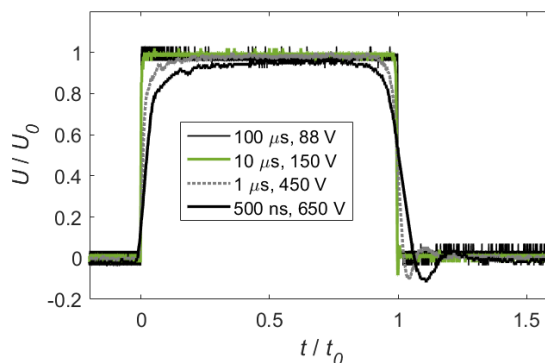
Slika 4: Postavitev komore Lab-Tek z elektrodami na mikroskopski mizici.



Slika 5: Slike obarvanosti celičnih membran s potenciometričnim barvilom ElectroFluor630 (levo) in ekspresije kanalov $K_{ir}2.1$, ki jo preverjamo s CyFP (desno).



Slika 6: Ekscitacijski in emisijski spekter ElectroFluor630 (EF630) in CyFP. Vir: potentiometricprobes.com in fpbase.org.



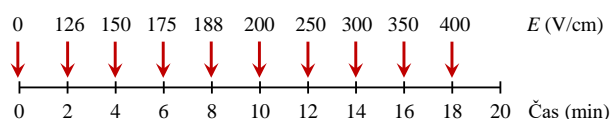
Slika 7. Oblika pulzov, ki so jim bile izpostavljene celice. Izmerjena napetost U je normirana na napetost, nastavljeno na pulznem generatorju (U_0). U_0 je bila izbrana kot tretja napetost, dovedena v sekvenci pulzov (tabela 1). Čas t je normiran na nastavljeno dolžino pulza t_0 . Krajša pulza (1 μ s in 500 ns) imata nekoliko daljši relativni dvižni čas kot daljša pulza (100 μ s in 10 μ s). Upornost vzorca, izračunana kot razmerje izmerjene napetosti in toka med pulzom, je približno 95 Ω .

zasnovana tako, da smo na podlagi prve zajete slike najprej določili spodnji in zgornji prag vrednosti slikovnih točk, s čimer smo izbrali zgolj točke z območja membran in tako dosegli večje razmerje med signalom in šumom. Časovni potek fluorescence F smo dobili tako, da smo na vsaki zajeti sliki izračunali povprečno vrednost vseh izbranih slikovnih točk. Bledenje barvila je povzročilo približno linearno upadanje signala $F(t)$ s časom. Ta padec smo odstranili tako, da smo od $F(t)$ odšteli linearno premico $F_0(t)$, ki smo jo napeli na signal, pridobljen s kontrolnih slik, zajetih brez dovajanja električnega pulza (0 V/cm). Grafi v članku prikazujejo relativno spremembo fluorescenčne intenzitete $R_{fluo} = 1 - F/F_0$ vseh celic v opazovanem območju.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

3.1 Prag proženja akcijskih potencialov

S poskusi smo najprej želeli preveriti, kakšen je prag električnega polja, s katerim dosežemo vzdraženje (proženje AP) pri celicah S-HEK v odvisnosti od dolžine dovedenega električnega pulza. Uporabili smo pravokotne pulze štirih različnih dolžin, in sicer 100 μ s, 10 μ s, 1 μ s in 500 ns (slika 7). Pri vsaki dolžini smo na vsake dve minuti dovedli vedno višjo napetost in s fluorescenčno mikroskopijo opazovali, kdaj pride do proženja AP. Osnovni protokol dovajanja zaporedja električnih pulzov posameznemu vzorcu celic prikazuje slika 8. Izbrana dvominutna pavza med posameznimi pulzi v zaporedju je kompromis med tem, da imajo celice dovolj časa, da si opomorejo od prejšnjega pulza, ter tem, da jih ne izpostavljam predolgo nefiziološkimi pogojem (en poskus traja približno 40 minut skupaj s časom barvanja celic).



Slika 8. Časovni potek dovajanja sekvence pulzov posameznemu vzorcu celic. Primer za 100 μ s dolžino pulza.

Ker moramo pri krajših dolžinah pulza celice izpostaviti znatno višjemu električnemu polju za proženje AP, smo za vsako dolžino pulza izbrali drugačen nabor amplitud (tabela 1). Električno polje E , ki so mu bile celice izpostavljene, smo ocenili kot kvocient napetosti na elektrodah in med-elektrodne razdalje. Na začetku vsakega poskusa smo posneli tudi časovni potek intenzitete barvila brez dovajanja pulza (0 V/cm), ki smo ga naknadno uporabili za korekcijo bledenja fluorescence barvila.

Pri vzpostavljanju protokola za iskanje praga proženja AP se je izkazalo, da ima na sposobnost S-HEK, da prožijo AP, pomemben vpliv konfluentnost celične kulture. Vzorce smo zato razdelili v štiri skupine, in sicer na tiste z nizko (< 50 %), srednjo (50–70 %), visoko (> 70 %) in popolno konfluentnostjo (100 %).

Tabela 1. Nabor amplitud v sekvenci pulzov za posamezno dolžino dovedenega pulza. Amplituda pulza je izražena kot približek električnega polja E (V/cm), ki so mu bile celice izpostavljene. Vsak posamezen pulz je bil doveden ob nakazanem času po začetku mikroskopiranja.

Pulz / Čas	100 μ s	10 μ s	1 μ s	500 ns
0 min	0	0	0	0
2 min	126	240	800	1100
4 min	150	280	860	1200
6 min	176	300	900	1300
8 min	188	330	960	1400
10 min	200	360	1000	1500
12 min	250	400	1100	1600
14 min	300	460	1200	1700
16 min	350	500	1300	1800
18 min	400	600	1400	1900
20 min				2000

Konfluentnost celične kulture smo določili na podlagi vizualizacije celic pod mikroskopom. V nadaljevanju se osredotočamo na poskuse, izvedene na celičnih kulturah s srednjo in visoko konfluentnostjo. Vloga konfluentnosti pa je podrobneje predstavljena v razdelku 3.4.

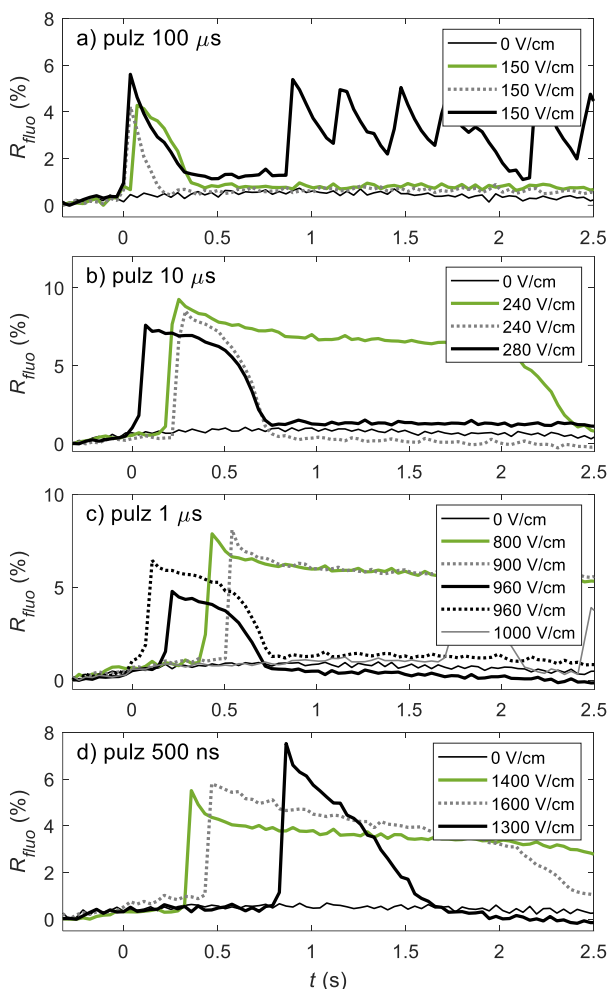
Z vsemi dolžinami pulzov smo dosegli vzdraženje celic, ko je električno polje E presegló določen prag. Ta prag je nekoliko variiral od vzorca do vzorca, v splošnem pa je bil prag mnogo višji pri krajših pulzih (najmanj 150 V/cm, 240 V/cm, 800 V/cm in 1300 V/cm pri 100 μ s, 10 μ s, 1 μ s in 500 ns pulzu; glej tudi legende na sliki 9 in tabelo 2). Slika 9 prikazuje primere prvega znatnega odziva v TMN, ki je bil dosežen z zaporedjem pulzov naraščajočih se E (tabela 1). Grafi torej prikazujejo odziv pri najnižjem E , ki je bil že dovolj visok za vzdraženje (prag proženja AP). Pri nižjih E se posamezni vzorec ni odzval in je bil signal TMN podoben kot pri kontrolnih meritvah (0 V/cm).

Pri 100 μ s pulzih je bil prag vzdraženja 150 V/cm (slika 9a). Celice so sprožile bodisi en bodisi več zaporednih AP, v skladu z našo prejšnjo študijo, v kateri smo podrobno proučili odziv celic S-HEK na 100 μ s pulze [24]. Dolžina AP pri 50 % maksimalnega odziva je bila okoli 200 ms.

Tudi s krajšimi pulzi (10 μ s, 1 μ s in 500 ns) smo sprožili AP, vendar smo pri tem opazili, da postajajo AP precej daljši kot pri 100 μ s (slika 9b–d). S krajšanjem dolžine pulza smo opazili tudi vse izrazitejši zamik med dovedenim pulzom ob času $t = 0$ s in proženjem AP. Pri nekaterih odzivih se TMN v opazovanem času sploh ni vrnila v začetno stanje (glejte npr. sivo črtkano črto na sliki 9c). To pomeni, da celice niso prožile AP, ampak so se na pulz odzvale s podaljšano depolarizacijo membrane. Tako dolgotrajnih odzivov pri pragovnem E nismo zaznali pri 100 μ s pulzih.

Karakteristike pragovnih odzivov TMN na pulze različnih dolžin smo nadalje ovrednotili v Matlabu. Z vgrajeno funkcijo *findpeaks* smo določili amplitudo AP, čas v katerem je bil AP dosežen po izpostavitvi pulzu, širino AP pri 50 % vrha AP ter število AP (vrhov) v

odzivu. Rezultati so podani v tabeli 2. Analiza potrjuje trend, da se s krajšanjem dolžine pulza podaljšuje zamik med dovajanjem pulza in AP ter širina AP. Povečuje se



Slika 9. Odzivi TMN pri najnižjem električnem polju E , ki je izzval AP oz. drugo znatno spremembo v TMN (tj. pri pragovnem E). Vsak graf prikazuje odzive vsaj treh neodvisnih vzorcev S-HEK pri eni dolžini pulza. Pulz je bil doveden ob času $t = 0$ s. Legenda podaja E , pri katerem je bil dani prvi odziv dosežen. Za primerjavo je pri vseh grafih podan signal TMN kontrolnih meritev (0 V/cm).

Tabela 2: Analiza AP oz. drugih odzivov TMN na pulze različnih dolžin pri pragovnem E . Tabelirane so povprečne vrednosti \pm standardni odklon vsaj treh neodvisnih meritev.

Dolžina pulza	100 μ s	10 μ s	1 μ s	500 ns
Prag AP (V/cm)	150 ± 0	253 ± 23	924 ± 78	1433 ± 153
Amplituda AP (%)	4.7 ± 0.8	8.5 ± 0.8	6.3 ± 1.8	6.3 ± 1.1
Čas vrha AP (s)	0.05 ± 0.02	0.20 ± 0.12	0.61 ± 0.67	0.56 ± 0.27
Širina AP (s)	0.2 ± 0.1	1.0 ± 0.9	1.0 ± 0.8	1.4 ± 0.9
Št. AP	2.7 ± 2.9	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Št. vzorcev	3	3	5	3

tudi standardni odklon meritev, kar nakazuje večjo naključnost in slabšo ponovljivost rezultatov. Amplituda AP je podobna pri vseh dolžinah pulza. Pri večini vzorcev je pulz sprožil en AP, razen pri enem vzorcu, izpostavljenem 100 μ s pulzu, ki je prožil 6 AP (glej črno neprekinjeno črto na sliki 9a).

Daljšanje zamika proženja AP in dolžine AP ter slabša ponovljivost odzivov, ki jih opazimo s krajšanjem dolžine pulza, kažejo na to, da pri krajših pulzih verjetno prihaja do drugih mehanizmov proženja AP kot samo odpiranja napetostnoodvisnih ionskih kanalov. Daljšanje zamika nakazuje, da je nastanek AP lahko posledica elektroporacije membrane, ki privede do depolarizacije, ta pa sproži AP. Za nanosekundne pulze je bilo nakazano, da naj bi bil prag elektroporacije nižji kot prag proženja AP, kar pomeni, da pri zelo kratkih pulzih vzdraženje verjetno vedno spremlja tudi elektroporacija [26]. Ker za proženje AP s krajšimi pulzi potrebujemo višji E , lahko pri tem pride tudi do poškodb ionskih kanalov. S simulacijami molekularne dinamike smo ugotovili, da visoko električno polje lahko poškoduje (delno denaturira) nekatere ionske kanale tako, da v njegovem napetostnem senzorju nastanejo odprtine [16].

3.2 Podaljšana depolarizacija membrane pri višjih električnih poljih

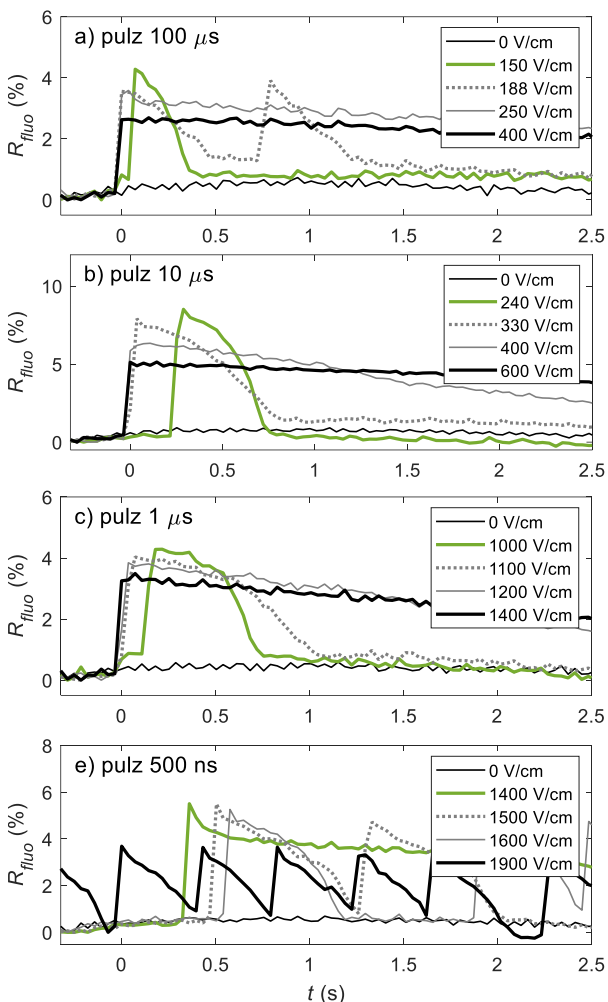
Vsak od vzorcev je bil izpostavljen celotnemu zaporedju pulzov z naraščajočim E (slika 8, tabela 1). Oglejmo si zdaj, kako se celice odzovejo na E , ki so višja od pragovne vrednosti. Slika 10 prikazuje primere odzivov na celotni razpon E pri različnih dolžinah pulzov. Vsak graf prikazuje rezultate, pridobljene na enem od vzorcev, pri čemer so zaradi preglednosti prikazani zgolj rezultati pri izbranih vrednostih E .

Pri vseh dolžinah pulza opazimo, da se v večini primerov z višanjem E najprej začne podaljševati AP, nato pa odziv preide v podaljšano depolarizacijo membrane. Podaljšana depolarizacija je značilna za pojav elektroporacije, ki povzroči neselektivni tok ionov prek celične membrane [27]. Elektroporacija namreč povzroči nastanek hidrofilnih por v lipidnem dvosloju, ki povečajo prepustnost in električno prevodnost membrane. Poleg tega v zadnjem času ugotavljamo, da pri elektroporaciji k povečanju prepustnosti membrane prispevajo tudi kemijske spremembe lipidov (oksidacija) in poškodba ionskih kanalov in črpalk [1], [16], [28]. Tok skozi pore in druge poškodbe v membrani je razmeroma neselektiven in ga ponazorimo s pomočjo veje z nizko upornostjo, prek katere teče tok mimo ionskih kanalov v membrani (slika 11) [29].

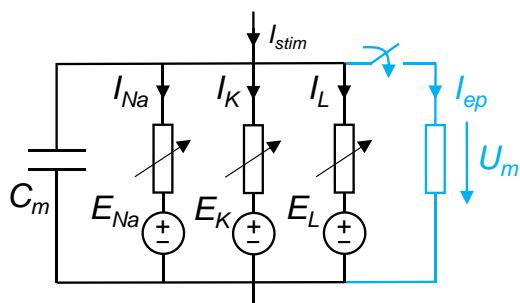
Pri 500 ns pulzu pri višjih E opazimo oscilacije TMV oz. periodično proženje AP. Takšne oscilacije sicer lahko dosežemo s pulzi vseh testiranih dolžin (ni prikazano). Oscilacije z nadaljnjim višanjem E preidejo v podaljšano depolarizacijo. Na tem mestu je treba omeniti, da smo pri 500 ns pulzu in dani eksperimentalni konfiguraciji lahko dosegli največ $E \approx 2000$ V/cm zaradi omejitve izhodne

napetosti pulznega generatorja. Z nadaljnjim večanjem E bi oscilacije najverjetneje zadušili.

Tudi oscilacije oz. sproženje več AP z enim pulzom so lahko posledica elektroporacije. Spontano ritmično



Slika 10: Primeri odzivov na celoten razpon E v sekvenci pulzov. Vsak graf prikazuje odziv enega vzorca, ki je bil izpostavljen pulzom navedene dolžine. Pulz je bil doveden ob času $t = 0$ s.

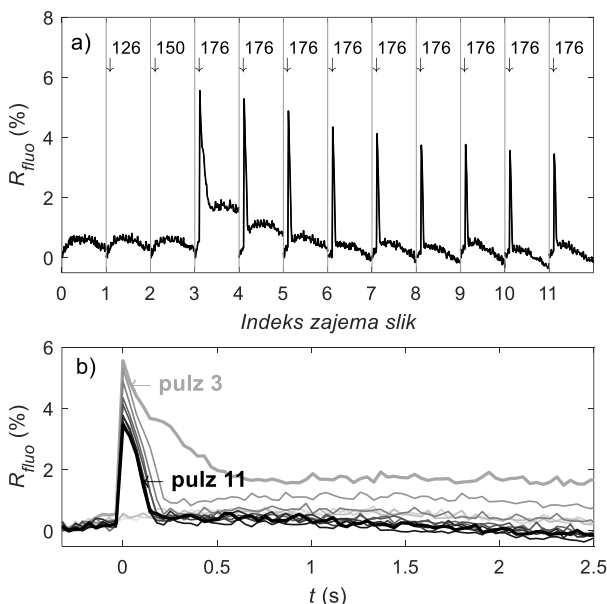


Slika 11: Poenostavljeno nadomestno vezje, ki predstavlja tok skozi napetostnoodvisne natrijeve in kalijeve ionske kanale (I_{Na} , I_K) ter preostale kanale (I_L). Ko se membrana elektroporira (stikalo se sklene), se pojavi dodatni neselektivni tok (I_{ep}). C_m predstavlja kapacitivnost celične membrane. I_{stim} predstavlja tok, ki teče med izpostavitvijo električnemu polju.

proženje namreč običajno sproži majhen neselektiven ionski tok prek celične membrane [30].

3.3 Sposobnost vzdraženja S-HEK v daljšem časovnem obdobju

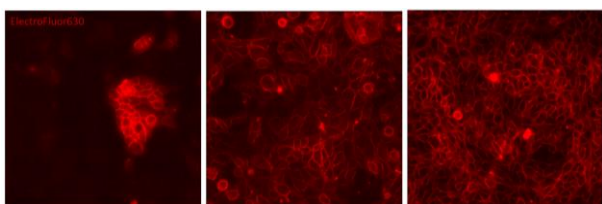
Celice so bile med poskusi kar 20 minut izpostavljene nefiziološkemu pogojem (sobna temperatura, pufer Tyrode namesto gojišča). Da bi preverili, ali so po 20 minutah še zmožne sproženja AP, smo uporabili naslednji protokol. Vzorec celic smo izpostavili zaporedju 100 μ s pulzov na vsake dve minuti, podobno kot pri vseh drugih poskusih. A ko smo dosegli prag vzdraženja, smo do konca poskusa dovajali pulze pri istem E . Slika 12 prikazuje primer, kjer je bil prag vzdraženja dosežen pri $E = 176$ V/cm. Z nadaljnjim dovajanjem 100 μ s, 176 V/cm pulzov na dve minuti, so celice vsakič sprožile AP. To pomeni, da celice S-HEK ohranjajo svojo sposobnost vzdražnosti vsaj 20 minut. Vendar pa opazimo, da se amplituda in širina AP z vsakim nadaljnjim pulzom rahlo manjšata. Vzroki za to bi lahko bili sledeči: a) postopna difuzija barvila ElectroFluor630 iz membrane v notranjost celic, kar zmanjšuje občutljivost detekcije, b) rahla spontana depolarizacija celic S-HEK pri sobni temperaturi, pri kateri imajo ionski kanali in črpalke, ki ohranjajo mirovno TMN, znižano aktivnost, c) kumulativni efekt šibke elektroporacije na sproženje AP. Za natančno razlago so potrebne nadaljnje raziskave. Vsekakor pa ti rezultati potrjujejo, da podaljšana depolarizacija kot odziv na pulz pri visokih E (razdelek 3.2) ni povezana z izgubo sposobnosti sproženja AP, temveč je povezana z elektroporacijo celičnih membran.



Slika 12: Izpostavitve sekvenci pulzov 100 μ s na 2 min. a) Zaporedni prikaz vseh 2,8 s dolgih zajemov slik, ločenih z vertikalnimi črtami. Čas izpostavitve pulzom in amplituda E (V/cm) sta označena s puščicami. b) Prikaz istih zajemov, poravnanih s časom dovajanja pulza ob $t = 0$ s.

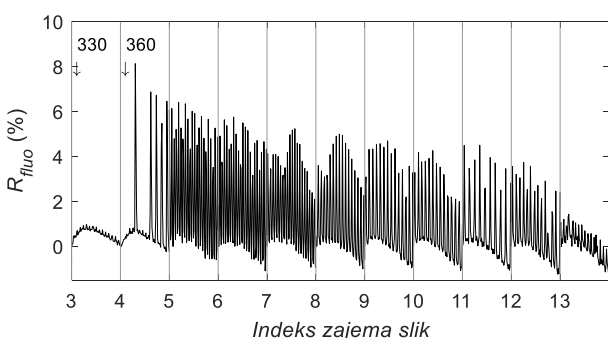
3.4 Vpliv konfluentnosti celične kulture

Vpliv konfluentnosti celične kulture se je izkazal kot pomemben, saj pri zelo nizki konfluentnosti ($< 50\%$) ali pri popolni konfluentnosti (100%) celice niso prožile AP. Slika 13 prikazuje različne konfluentnosti, kjer sicer ne vidimo celotnega dna komore Lab-Tek, temveč le opazovano vidno polje. Pri nizki konfluentnosti je možno najti manjše povezane zaplate celic, vendar te med seboj niso povezane. Pri srednji konfluentnosti ($50\text{--}70\%$) je možno najti večje zaplate, ki so med seboj povezane. Pri visoki konfluentnosti ($> 70\%$) je prekrita večina rastne površine, še vedno pa je možno najti manjša prazna območja brez celic. Pri popolni konfluentnosti pa je celotna rasna površina povsem prekrita s celično kulturo.



Slika 13: Od leve proti desni: primer nizke ($< 50\%$), srednje ($50\text{--}70\%$) in visoke ($> 70\%$) konfluentnosti celic.

Pri srednji in visoki konfluentnosti smo s pulzom lahko sprožili en ali več AP, rezultate smo prikazali v razdelkih 3.1, 3.2 in 3.3. Pri visoki konfluentnosti smo lahko z enim pulzom sprožili tudi dolgotrajne oscilacije, tj. spontano periodično proženje AP. Primer je prikazan na sliki 14, kjer je bil vzorec celic izpostavljen zaporedju $10\ \mu\text{s}$ pulzov. Pri tem vzorcu $E \leq 330\ \text{V/cm}$ ni bil dovolj visok, da bi sprožil AP. Naslednji višji $E = 360\ \text{V/cm}$ je sprožil oscilacije. Pri nadaljnjem zajemanju slik na dve minuti nismo več prožili pulza, celice pa so oscilirale do konca opazovanega časa (skupno 20 minut). Amplituda oscilacij se je s časom postopoma zmanjševala.

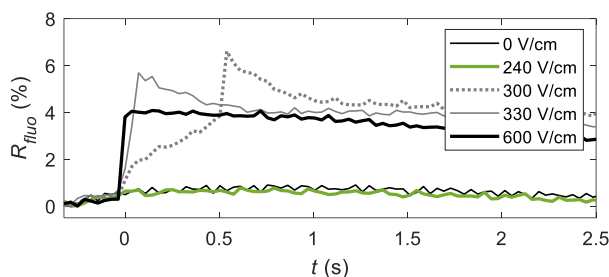


Slika 14: Dolgotrajne oscilacije pri kulturi z visoko konfluentnostjo, ki jih je sprožil $10\ \mu\text{s}$, $360\ \text{V/cm}$ pulz, doveden pri 4. zajemu slik. Vsak segment, ločen z vertikalnimi črtami, predstavlja $2,8\ \text{s}$ dolg signal, zajet na vsake 2 min.

Visokokonfluentne kulture so lahko oscilirale oz. prožile periodične AP tudi same od sebe brez dovajanja pulza. V

eni od prejšnjih študij [31] takšnega periodičnega proženja AP niso mogli razložiti samo z matematičnimi modeli kanalov $\text{Na}_v1.5$ in $\text{K}_i2.1$. K periodičnemu proženju tako lahko prispevajo drugi endogeno izraženi kanali kot tudi medcelični stiki. Celice v tkivu in v celični kulturi tvorijo medcelične stike. Celice HEK izražajo koneksina 43 in 45, kar pomeni, da so prek presledkovnih stikov povezane med seboj [31], [32], [33]. Povezave omogočajo tudi električno sklopljenost, kar ima lahko pomemben vpliv na vzdražnost celic S-HEK v kulturi. Bolj je konfluentna celična kultura, več je stikov med celicami, in zato je tudi povezanost med njimi boljša. Konfluentnost celične kulture vpliva tudi na ekspresijo genov [34], kar bi lahko vplivalo na število izraženih ionskih kanalov.

Pri nizki konfluentnosti celične kulture nismo zaznali AP (slika 15), temveč so celice pri dovolj visokem E neposredno prešle v podaljšano depolarizacijo. Prav tako pri popolni konfluentnosti (100%) celice niso prožile AP. Slednje se sklada z ugotovitvami ene izmed prejšnjih študij s celicami S-HEK [35], kjer so celice prenehale spontano proženje, če so preveč prerasle podlago. Za podrobnejšo analizo bi bilo treba narediti še več ponovitev pri različnih konfluentnostih.



Slika 15: Pri nizki konfluentnosti celice niso prožile AP, ampak so neposredno prešle v podaljšano depolarizacijo. Primer vzorca, ki je bil izpostavljen sekvenci $10\ \mu\text{s}$ pulzov.

4 ZAKLJUČEK

Celice S-HEK, model vzdražnih celic, pridobljen s pomočjo genskega inženiringa, se je izkazal za zelo koristnega pri raziskavah vpliva elektroporacije na vzdražne celice. Z izpostavitvijo celic pulzom različnih dolžin smo ugotovili, da se s krajšanjem dolžine pulza povečuje prag električnega polja (amplitude pulza), ki je potreben za vzdraženje. To je značilno za vse vzdražne celice, pri čemer soodvisnost dolžine pulza in praga vzdraženja imenujemo intenzivnostno-časovna krivulja [36]. Ugotovili pa smo tudi, da se s krajšanjem dolžine pulza spreminjajo karakteristike AP, natančneje, daljša se dolžina trajanja AP in čas nastopa AP po dovedenem pulzu. Zanimivo je izpostaviti, da smo pri krajših pulzih opazili tudi večjo naključnost oz. večjo razpršenost v karakteristikah AP v primerjavi z AP, proženih s $100\ \mu\text{s}$ pulzi. Daljšanje dolžine AP in zamika v času proženja AP ter večja naključnost nakazujejo, da pri danih pogojih

prihaja do elektroporacije celične membrane. S poenostavljenim električnim vezjem smo ponazorili, kako nastanek por in drugih poškodb v membrani zaradi elektroporacije deluje podobno kot veja z nizko upornostjo, prek katere teče neselektivni tok mimo ionskih kanalov. Ta neselektivni tok je lahko vzrok za spremembe karakteristik AP pri pragovnih vrednostih E , podaljšano depolarizacijo pri višjih vrednostih E , proženje več zaporednih AP z enim pulzom ter spontano periodično proženje AP (oscilacije) [37], ki smo jih opazili pri poskusih. Vendar so za natančnejše razumevanje mehanizmov teh pojavov potrebne nadaljnje eksperimentalne in teoretične raziskave. Rezultati poskusov so pokazali še, da ima na sposobnost celic S-HEK, da prožijo AP, pomemben vpliv konfluentnost celic. Pri nizki in popolni konfluentnosti nismo mogli sprožiti AP. Konfluentnost bi lahko vplivala na število stikov med celicami ter njihovo električno sklopljenost in/ali na ekspresijo genov ter število izraženih ionskih kanalov. Zato nameravamo v nadaljnjih raziskavah proučevati tudi vpliv medceličnih povezav in izraženosti ionskih kanalov na proženje AP. Vsekakor uporaba celic S-HEK prinaša nove možnosti odgovarjanja na vprašanja, ki so pomembna za razumevanje mehanizmov vpliva elektroporacije na vzdražnost in posledično za nadaljnji razvoj zdravljen vzdražnih tkiv, ki temeljijo na elektroporaciji.

5 ZAHVALA

Raziskave je podprla Javna agencija za znanstveno-raziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS šifre P2-0249, J2-2503, IO-0022 in financiranje za mlade raziskovalce). Raziskave sta podprla tudi okvirni program Evropske unije Obzorje Evropa (ERC-2023-STG, projekt 101115323 – REINCARNATION) in Univerza v Ljubljani (financiranje za zagonske programe).

LITERATURA / LITERATURE

- [1] T. Kotnik, L. Rems, M. Tarek in D. Miklavčič, „Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models“, *Annu Rev Biophys*, let. 48, str. 63–91, maj 2019, doi: 10.1146/annurev-biophys-052118-115451.
- [2] G. Pucihar, T. Kotnik, D. Miklavčič in J. Teissié, „Kinetics of Transmembrane Transport of Small Molecules into Electropermeabilized Cells“, *Biophysical Journal*, let. 95, št. 6, str. 2837–2848, sep. 2008, doi: 10.1529/biophysj.108.135541.
- [3] K. N. Aycok in R. V. Davalos, „Irreversible Electroporation: Background, Theory, and Review of Recent Developments in Clinical Oncology“, *Bioelectricity*, let. 1, št. 4, str. 214–234, dec. 2019, doi: 10.1089/bioe.2019.0029.
- [4] K. E. Broderick in L. M. Humeau, „Electroporation-enhanced delivery of nucleic acid vaccines“, *Expert Rev. Vaccines*, let. 14, št. 2, str. 195–204, feb. 2015, doi: 10.1586/14760584.2015.990890.
- [5] M. L. Yarmush, A. Golberg, G. Serša, T. Kotnik in D. Miklavčič, „Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges“, *Annu Rev Biomed Eng*, let. 16, str. 295–320, jul. 2014, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071813-104622.
- [6] A. Verma *idr.*, „Pulsed Field Ablation for the Treatment of Atrial Fibrillation: PULSED AF Pivotal Trial“, *Circulation*, let. 147, št. 19, str. 1422–1432, maj 2023, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.123.063988.
- [7] E. P. W. Jenkins, A. Finch, M. Gerigk, I. F. Triantis, C. Watts, in G. G. Malliaras, „Electrotherapies for Glioblastoma“, *Advanced Science*, let. 8, št. 18, str. 2100978, 2021, doi: 10.1002/advs.202100978.
- [8] E. Acerbo *idr.*, „Non-thermal electroporation ablation of epileptogenic zones stops seizures in mice while providing reduced vascular damage and accelerated tissue recovery“, *Front. Behav. Neurosci.*, let. 15, str. 774999, 2021, doi: 10.3389/fnbeh.2021.774999.
- [9] A. Cvetkoska, A. Maček-Lebar, P. Trdina, D. Miklavčič, in M. Reberšek, „Muscle contractions and pain sensation accompanying high-frequency electroporation pulses“, *Sci Rep*, let. 12, št. 1, Art. št. 1, maj 2022, doi: 10.1038/s41598-022-12112-9.
- [10] S. Chaigne *idr.*, „Reversible and Irreversible Effects of Electroporation on Contractility and Calcium Homeostasis in Isolated Cardiac Ventricular Myocytes“, *Circ: Arrhythmia and Electrophysiology*, let. 15, št. 11, nov. 2022, doi: 10.1161/CIRCEP.122.011131.
- [11] J. Dermol-Černe *idr.*, „Plasma membrane depolarization and permeabilization due to electric pulses in cell lines of different excitability“, *Bioelectrochemistry*, let. 122, str. 103–114, avg. 2018, doi: 10.1016/j.bioelechem.2018.03.011.
- [12] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts in P. Walter, „Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes“, v *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*, Garland Science, 2002. Pridobljeno: 16. februar 2024. [Na spletu]. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26910/>
- [13] D. W. Hunter, G. Kostecki, J. M. Fish, J. A. Jensen in H. Tandri, „In Vitro Cell Selectivity of Reversible and Irreversible: Electroporation in Cardiac Tissue“, *Circ Arrhythm Electrophysiol*, let. 14, št. 4, str. e008817, apr. 2021, doi: 10.1161/CIRCEP.120.008817.
- [14] A. Steuer, A. Schmidt, P. Labohá, P. Babica in J. F. Kolb, „Transient suppression of gap junctional intercellular communication after exposure to 100-nanosecond pulsed electric fields“, *Bioelectrochemistry*, let. 112, str. 33–46, dec. 2016, doi: 10.1016/j.bioelechem.2016.07.003.
- [15] B. Markelc *idr.*, „Increased permeability of blood vessels after reversible electroporation is facilitated by alterations in endothelial cell-to-cell junctions“, *Journal of Controlled Release*, let. 276, str. 30–41, apr. 2018, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.02.032.
- [16] L. Rems, M. A. Kasimova, I. Testa in L. Delemotte, „Pulsed Electric Fields Can Create Pores in the Voltage Sensors of Voltage-Gated Ion Channels“, *Biophys J*, let. 119, št. 1, str. 190–205, jul. 2020, doi: 10.1016/j.bpj.2020.05.030.
- [17] W. E. Louch, K. A. Sheehan, in B. M. Wolska, „Methods in Cardiomyocyte Isolation, Culture, and Gene Transfer“, *J Mol Cell Cardiol*, let. 51, št. 3, str. 288–298, sep. 2011, doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.06.012.
- [18] J. G. Oh, C. Kho, R. J. Hajjar in K. Ishikawa, „Experimental models of cardiac physiology and pathology“, *Heart Fail Rev*, let. 24, št. 4, str. 601–615, jul. 2019, doi: 10.1007/s10741-019-09769-2.
- [19] H. M. McNamara, H. Zhang, C. A. Werley in A. E. Cohen, „Optically Controlled Oscillators in an Engineered Bioelectric Tissue“, *Phys. Rev. X*, let. 6, št. 3, str. 031001, jul. 2016, doi: 10.1103/PhysRevX.6.031001.
- [20] Y. Cao *idr.*, „Nontoxic nanopore electroporation for effective intracellular delivery of biological macromolecules“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, let. 116, št. 16, str. 7899–7904, apr. 2019, doi: 10.1073/pnas.1818553116.
- [21] J. Hu *idr.*, „Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology“, *CTO*, let. 205, št. 1, str. 1–8, 2018, doi: 10.1159/000485501.

- [22] J. Zhang, H. Yuan, X. Yao in S. Chen, „Endogenous ion channels expressed in human embryonic kidney (HEK-293) cells“, *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, let. 474, št. 7, str. 665–680, jul. 2022, doi: 10.1007/s00424-022-02700-z.
- [23] H. Tian *idr.*, „Video-based pooled screening yields improved far-red genetically encoded voltage indicators“, *Nat Methods*, str. 1–13, jan. 2023, doi: 10.1038/s41592-022-01743-5.
- [24] T. Batista Napotnik, B. Kos, T. Jarm, D. Miklavčič, R. P. O'Connor in L. Rems, „Genetically engineered HEK cells as a valuable tool for studying electroporation in excitable cells“, *Sci Rep*, let. 14, št. 1, Art. št. 1, jan. 2024, doi: 10.1038/s41598-023-51073-5.
- [25] D. C. Sweeney, M. Reberšek, J. Dermol, L. Rems, D. Miklavčič in R. V. Davalos, „Quantification of cell membrane permeability induced by monopolar and high-frequency bipolar bursts of electrical pulses“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, let. 1858, št. 11, str. 2689–2698, nov. 2016, doi: 10.1016/j.bbamem.2016.06.024.
- [26] A. G. Pakhomov in O. N. Pakhomova, „The interplay of excitation and electroporation in nanosecond pulse stimulation“, *Bioelectrochemistry*, let. 136, str. 107598, dec. 2020, doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107598.
- [27] V. P. Nikolski in I. R. Efimov, „Electroporation of the heart“, *Europace*, let. 7 Suppl 2, str. 146–154, sep. 2005, doi: 10.1016/j.eupc.2005.04.011.
- [28] B. Gabriel in J. Teissié, „Generation of reactive-oxygen species induced by electroporation of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability“, *Eur. J. Biochem.*, let. 223, št. 1, str. 25–33, jul. 1994, doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18962.x.
- [29] L. Vodovnik, *Nevrokibernetika*, 2. izd. Ljubljana: Fakulteta za elektrotehniko in računalništvo, 1991.
- [30] B. Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd edition. Sunderland, Mass: Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press, 2001.
- [31] H. Ori *idr.*, „Observation of topological action potentials in engineered tissues“, *Nat. Phys.*, let. 19, št. 2, Art. št. 2, feb. 2023, doi: 10.1038/s41567-022-01853-z.
- [32] H. M. McNamara, S. Dodson, Y.-L. Huang, E. W. Miller, B. Sandstede in A. E. Cohen, „Geometry-Dependent Arrhythmias in Electrically Excitable Tissues“, *cels*, let. 7, št. 4, str. 359–370.e6, okt. 2018, doi: 10.1016/j.cels.2018.08.013.
- [33] H. M. McNamara *idr.*, „Bioelectrical domain walls in homogeneous tissues“, *Nat. Phys.*, let. 16, št. 3, Art. št. 3, mar. 2020, doi: 10.1038/s41567-019-0765-4.
- [34] J. Han *idr.*, „Quality prediction of cell substrate using gene expression profiling“, *Genomics*, let. 87, št. 4, str. 552–559, apr. 2006, doi: 10.1016/j.ygeno.2005.11.017.
- [35] J. Park *idr.*, „Screening Fluorescent Voltage Indicators with Spontaneously Spiking HEK Cells“, *PLOS ONE*, let. 8, št. 12, str. e85221, dec. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0085221.
- [36] D. Boinagrov, J. Loudin in D. Palanker, „Strength–Duration Relationship for Extracellular Neural Stimulation: Numerical and Analytical Models“, *Journal of Neurophysiology*, let. 104, št. 4, str. 2236–2248, okt. 2010, doi: 10.1152/jn.00343.2010.
- [37] L. Rems, A. Rainot, D. Wiczew, N. Szulc in M. Tarek, „Cellular excitability and ns-pulsed electric fields: Potential involvement of lipid oxidation in the action potential activation“, *Bioelectrochemistry*, let. 155, str. 108588, feb. 2024, doi: 10.1016/j.bioelechem.2023.108588.

Medicinski fakulteti UL. Zaposlena je kot znanstvena sodelavka na Fakulteti za elektrotehniko UL v Laboratoriju za biokibernetiko. Njeno glavno raziskovalno zanimanje je področje elektroporacije, predvsem *in vitro* eksperimentiranje in raziskovanje bioloških odzivov na električne pulze.

Lea Rems je leta 2012 diplomirala, leta 2016 pa doktorirala na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, kjer je zdaj zaposlena kot znanstvena sodelavka v Laboratoriju za biokibernetiko. Podoktorska usposabljanja je opravljala na Tehniški univerzi v Delftu in Kraljevem inštitutu za tehnologijo v Stockholmu. Njeno raziskovanje vključuje razvoj numeričnih modelov elektroporacije in drugih bioloških procesov ter eksperimentalno delo *in vitro*, povezano z elektroporacijo.

Tina Cimperman je mlada raziskovalka v Laboratoriju za biokibernetiko. Leta 2021 je magistrirala na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Njeno raziskovanje vključuje numerično modeliranje elektroporacije in uporabo teh modelov pri eksperimentalnem delu s celičnimi kulturami v laboratoriju ter analizo rezultatov za nadaljnje delo v okviru doktorske disertacije.

Tina Batista Napotnik je leta 1997 diplomirala iz biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani (UL), leta 2000 magistrirala na isti fakulteti ter leta 2004 doktorirala na