

# Dinamika celične smrti v matematičnem modelu elektroporacije

Tamara Polajžer, Alenka Maček Lebar

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

**Povzetek.** Celična smrt je ključna za uspešno ireverzibilno elektroporacijo – metodo zdravljenja, ki se uporablja za uničenje rakavega tkiva ali/in uničenje nefunkcionalnega srčnega tkiva. Celična smrt pri elektroporaciji se ne zgodi zgolj med aplikacijo in tik po aplikaciji električnih pulzov, temveč poteka več ur ali celo dni, zato pravimo, da je celična smrt pri elektroporaciji dinamična. To dinamiko lahko opazujemo s spremljanjem prepustnosti membrane tako živih kot mrtvih celic – torej različnih populacij celic. Populacije ter njihovo dinamiko prepustnosti celične membrane smo želeli opisati tudi z matematičnim modelom, kar pa s trenutno obstoječimi modeli ni mogoče, zato smo pripravili nov matematični model, ki temelji na eksperimentalnih podatkih, pridobljenih na pretočnem citometru. Predlagani model je dobra osnova za model dinamične smrti pri elektroporaciji, vendar bo potrebnih še nekaj izboljšav za popolno sliko o celični smrti pri elektroporaciji.

**Ključne besede:** ireverzibilna elektroporacija, dinamika celične smrti, populacije celic, model

## A mathematical model of cell death dynamics due to electroporation

Cell death is the key to the success of irreversible electroporation, a treatment method that can kill cancerous tissue or destroy dysfunctional heart tissue. Cell death during electroporation is not an all-or-nothing response, but takes place over several hours or even days, which is why it is referred to as dynamic cell death during electroporation. This dynamic is also reflected in the changes in membrane permeability that can be detected in both living and dead cells, i.e. in different cell populations. We also wanted to describe the populations and their membrane permeability dynamics using a mathematical model. The mathematical model is based on population dynamics and experimental data obtained with a flow cytometer and provides a good basis for the description of cell death dynamics during electroporation, but some improvements are still needed to obtain a complete picture of cell death during electroporation.

**Keywords:** irreversible electroporation, cell death dynamics, cell populations, model

## 1 UVOD

Elektroporacija je biofizikalni pojav, pri katerem prisotnost električnega polja povzroči vsiljeno napetost na celični membrani. Zaradi povečane napetosti na celični membrani nastanejo v njej strukturne in kemijske spremembe. Te vodijo v povečano prepustnost celične membrane, kar omogoča prehod sicer neprepustnih molekul in ionov v celico in iz nje [1]. Z biološkega vidika nastanek strukturnih in kemijskih sprememb v celični membrani in njeno spremenjeno prepustnost opišemo kot poškodbo celične membrane [2], [3]. Poškodba celične membrane aktivira membranske

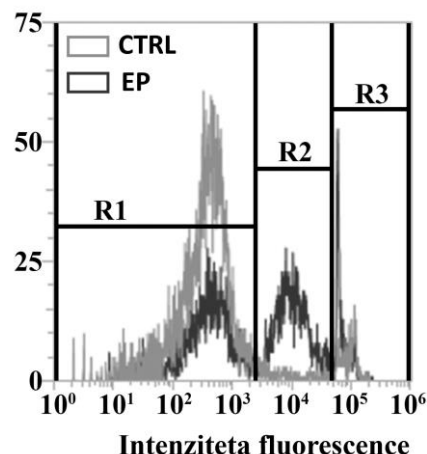
popravljanje mehanizme, ki poskušajo celično membrano zaceliti [3], [4]. Če ob zaceljeni celični membrani celici uspe ponovno vzpostaviti tudi ravnotežje, bo preživela. V tem primeru govorimo o reverzibilni elektroporaciji. Lahko pa se zgodi, da celici ne uspe zaceliti celične membrane oz. kljub zaceljeni celični membrani ne vzpostavi ponovno ravnotežja. Celica bo v tem primeru umrla in takrat govorimo o ireverzibilni elektroporaciji [5].

Tako reverzibilno kot ireverzibilno elektroporacijo uporabljamo pri različnih zdravljenjih v medicini. V zadnjem času je v razvoju predvsem uporaba ireverzibilne elektroporacije, ki je bila sprva nezaželen učinek pri zdravljenju z reverzibilno elektroporacijo, pozneje pa se je izkazala kot samostojna metoda zdravljenja mehkega rakavega tkiva, predvsem na kirurško težko dostopnih predelih [5]. V zadnjih letih se je ireverzibilna elektroporacija začela uporabljati tudi za zdravljenje motenj srčnega ritma z uničenjem/ablacijo srčnega tkiva, ki povzroča nepravilen srčni ritem [6], [7]. Srčna ablacija z elektroporacijo (PFA; angl. pulsed field ablation) je danes odobrena ablacijska tehnika v Evropi in ZDA [8], [9], [10]. Za uporabo elektroporacije kot ablacijske tehnike je postalo ključno razumevanje celične smrti, ki je posledica elektroporacije. Razumevanje procesa celične smrti in njenih posledic na celoten organizem namreč lahko omogoči izboljšanje ablacijskega protokola, z njim pa tudi izid zdravljenja. Pri PFA kirurgi spremljajo električno aktivnost srca pred ablacijo in po njej. Sprva so verjeli, da je odsotnost signala znak uspešnega zdravljenja, kmalu pa se je izkazalo, da je lahko odsotnost signala tudi le začasna in ni nujno znak uspešne ablacije [6], [7]. Razumevanje

dinamike celične smrti pri elektroporaciji je torej ključno tudi za določitev ustreznega časovnega okvirja za detekcijo odmrlih celic oziroma oceno uspešnosti ablacije.

Trenutno znanje o celični smrti pri elektroporaciji je pomanjkljivo [3], vemo pa, da celična smrt pri elektroporaciji pomeni kompleksen odziv celice. Literatura poroča, da je delež mrtvih celic v različnih časovnih točkah po elektroporaciji različen [11], zato celično smrt pri elektroporaciji delimo na takojšnjo (angl. immediate) in zapoznelo (angl. delayed). Eksperimentalni rezultati so pokazali, da v treh urah po elektroporaciji umre del celic, ki jim ne uspe zaceliti celične membrane, in sicer v obliki nekroze. Ure pozneje, vse do 24 ur po elektroporaciji, pa umre še del celic, ki so celično membrano sprva uspešno zacelile, a jih je znotrajcelično neravnotežje vodilo po poti regulirane celične smrti, torej apoptoze, piroptoze in nekroptoze [11], [12]. Celična smrt po elektroporaciji je tako najprej odvisna od mehanizma popravljanja celične membrane, pozneje pa od vzpostavljanja homeostaze. Do zdaj je bila dinamika celične smrti po elektroporaciji prikazana s preprostimi testi preživetja in analizami izražanja genov, ki so bile izvedene v različnih časovnih točkah po elektroporaciji [12], [13], [14]. Mi smo dinamiko celične smrti spremljali s testi preživetja, kot so test prepustnosti membrane, metabolni test in test klonogenosti [15].

Spremenjena prepustnost membrane je znak nefunkcionalne membrane, ki pripada poškodovanim ali mrtvim celicam. Z uporabo fluorescenčnih barvil, kot je propidijev joidid (PI), ki prehajajo le skozi poškodovano membrano, lahko razlikujemo žive (PI-negativne) in mrtve celice oziroma celice s poškodovano membrano (PI-pozitivne). Če opazujemo obarvanost celic oziroma fluorescenco celic pod mikroskopom ali s pretočnim citometrom, načeloma velja, da imajo žive celice z zdravo nepoškodovano membrano nizek fluorescenčni signal (avtofluorescenco), medtem ko imajo mrtve celice z nefunkcionalno membrano visok fluorescenčni signal, saj se PI, ki prosto prehaja prek membrane, nasičeno veže na dedni material celice. Med območjema šibke avtofluorescence in močne fluorescence tako lahko opazimo še območje srednje močne fluorescence (slika 1, R2). Ta pripada živim celicam, ki imajo poškodovano membrano, kar omogoči vstop v celico manjšemu številu molekul PI. Pri elektroporaciji lahko PI torej obarva tudi žive celice, ki imajo poškodovano ali permeabilizirano membrano, česar rezultat je srednje močen signal fluorescence [15], [16]. Intenzivnost fluorescence PI je torej lahko mera, ki omogoča v opazovanem vzorcu določitev različnih populacij celic glede na prepustnost membrane. Če meritve izvedemo v različnih časovnih točkah po elektroporaciji, lahko spremljamo, kolikšno število celic v vzorcu v izbranem trenutku po elektroporaciji pripada posamezni populaciji.



Slika 1: Profil fluorescenčnega signala PI tipičnega kontrolnega (CTRL) in elektroporiranega (EP) vzorca ter določitev območij fluorescence populacije živih celic z nepoškodovano membrano (R1), živih celic s poškodovano membrano (R2) in mrtvih celic – celic z nefunkcionalno membrano (R3).

Čeprav iz opisanega eksperimentalnega postopka izvemo, kako se s časom v celičnem vzorcu spreminja delež živih in mrtvih celic ter celic z zgolj poškodovano celično membrano, bi za natančnejšo določitev celičnega stanja v izbranem časovnem trenutku morali poseči po karakterizaciji molekul, ki so vključene v regulirane oblike celične smrti. Potek posamezne oblike regulirane celične smrti namreč določajo značilni molekularni mehanizmi. A ker so nekateri med njimi skupni več oblikam regulirane celične smrti, za zdaj tipičen molekularni mehanizem, ki regulira izbiro in potek določene oblike celične smrti, ni določen. Za lažje razumevanje aktivacije in dinamike procesov celične smrti so se zato uveljavili matematični modeli. Zelo pogosti so populacijski modeli [17], [18], [19], ki mnogokrat opisujejo razvoj celičnih populacij v časovnem obdobju, daljšem od celičnega cikla, zato vključujejo kar kontinuirano rast celične populacije.

Na področju elektroporacije so z matematičnimi modeli dobro opisane odvisnosti preživetja celic in stopnje permeabilizacije celične membrane od parametrov električnih pulzov v izbranem trenutku po elektroporaciji [20]. Časovna odvisnost celičnih procesov po elektroporaciji pa v teh modelih ni zajeta.

Rezultate eksperimentov, pri katerih smo določili intenzivnost fluorescence PI v različnih časovnih točkah po elektroporaciji [15], smo uporabili v populacijskem modelu. V model smo poleg eksperimentalno opazovanih populacij živih in mrtvih celic ter celic s poškodovano celično membrano vključili tudi dve podpopulaciji živih celic: populacijo celic, ki se lahko deli, in populacijo celic z blokiranim celičnim ciklom. Z modelom smo želeli raziskati, kako se po uporabi različnih parametrov električnih pulzov, ki povzročijo različne stopnje poškodb v celični membrani celic v opazovani populaciji, s časom spreminja delež celic, ki

se še lahko deli, in kateri celični procesi so pri določenih parametrih električnih pulzov izrazitejši.

## 2 METODE IN MATERIALI

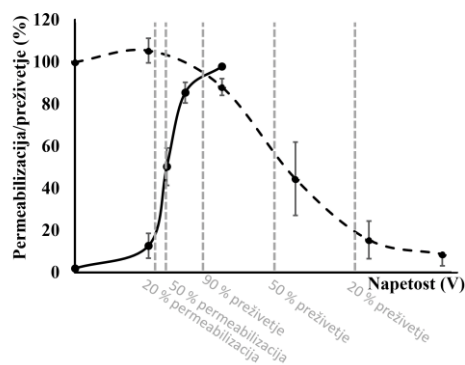
### 2.1 Poskusi na celicah

*In vitro* poskusi so potekali na celični liniji, pridobljeni iz ovarijev kitajskega hrčka (CHO) (European Collection of Authenticated Cell Cultures, Združeno kraljestvo Velike Britanije in Severne Irske). Celice so rasle pritrjene na dno plastičnih posod za gojenje celic v rastnem mediju HAM-F12 (PAA, Avstrija) z dodanim serumom, glutaminom in antibiotiki (Sigma-Aldrich, ZDA). Za poskuse smo celice odlepili s tripsinizacijo (PAA, Avstrija) in jih nato resuspendirali v svežem rastnem mediju, ki je bil krati tudi elektroporacijski medij, v celično suspenzijo z gostoto  $1 \times 10^6$  celic/ml. 150  $\mu$ l celične suspenzije smo prenesli v elektroporacijsko kiveto (razdalja med elektrodama je 2 mm) (Harvard Apparatus, ZDA) in nato dovedli elektroporacijske pulze. Uporabili smo osem pulzov, ki so trajali vsak 5 milisekund in si sledili s ponavljano frekvenco 1 Hz pri različnih napetostih (mPOR, Slovenija).

Za določitev celic, ki jim elektroporacijski pulzi poškodujejo celično membrano (permeabilizirane celice), smo celični suspenziji pred elektroporacijo dodali PI in 3 minute po izvedeni elektroporaciji pomerili fluorescenco celic s pretočnim citometrom (Attune NxT; Life Technologies, ZDA) z modrim laserjem (488 nm) in 574/26 nm filtrom. Za določitev celic, ki elektroporacijo preživijo, smo vzorec celic po elektroporaciji prenesli v mikrotitersko ploščo s 96 vdolbinicami (TPP, Švica) in jo za 24 ur postavili v inkubator (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) (Kambič, Slovenija). Po inkubaciji smo z metaboličnim testom CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, ZDA) določili delež preživelih celic v vzorcu. Delež celic s poškodovano oziroma permeabilizirano membrano in delež živih celic v vzorcu smo narisali v odvisnosti od napetosti elektroporacijskih pulzov (slika 2). Na podlagi obeh krivulj smo določili napetosti pulzov, ki ob 100-odstotnem preživetju vodijo v 20 % permeabiliziranih celic (100 V), in napetosti, ki ob 100-odstotni permeabilizaciji vodijo v različno preživetje celic, in sicer 90-odstotno (175 V) in 20-odstotno (250 V) preživetje.

Število živih celic z nepoškodovano celično membrano, število živih celic s poškodovano celično membrano in število mrtvih celic z nefunkcionalno membrano v elektroporiranem vzorcu celic smo določili 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 in 72 ur po elektroporaciji s prej omenjenimi tremi napetostmi elektroporacijskih pulzov. Celično suspenzijo smo po elektroporaciji prenesli v mikrotitersko ploščo z 12 vdolbinicami (TPP, Švica) in ji dodali svez rastni medij. Mikrotitersko ploščo smo do analize hranili v inkubatorju (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C). Za analizo smo zbrali vse celice iz vzorca (tako plavajoče kot

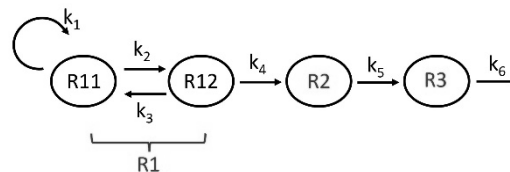
pritrjene), jih resuspendirali v svežem gojišču, dodali PI ter jih analizirali s pretočnim citometrom.



Slika 2: Določitev eksperimentalnih točk na podlagi krivulje, ki jo določa delež celic s permeabilizirano/poškodovano membrano (polna črta), in krivulje, ki jo določa delež živih celic (črtkana črta) v elektroporiranem vzorcu celic.

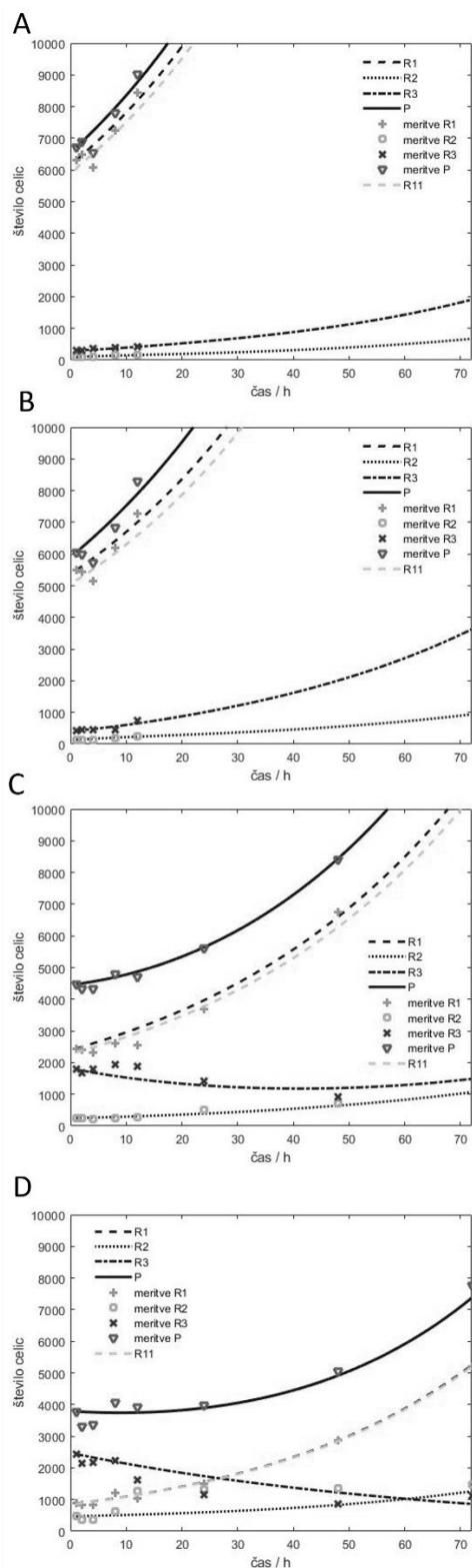
### 2.2 Matematični model elektroporacije

Čeprav smo na podlagi eksperimentov lahko ločili tri populacije celic v vzorcu elektroporiranih celic, smo v matematični model vključili štiri populacije (slika 3). Populacijo živih celic R1 smo razdelili v dva razreda: v razredu R11 so celice, ki se lahko delijo, v razredu R12 pa celice z blokiranim celičnim ciklom. Populacijo celic s poškodovano celično membrano smo označili z R2, populacijo mrtvih celic pa z R3. Proces delitve celic določa hitrostna konstanta  $k_1$ , prehajanje med preostalimi razredi pa hitrostne konstante  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $k_4$  in  $k_5$ . Hitrostna konstanta  $k_6$  opisuje proces razpadanja mrtvih celic. Odmrle celice namreč s časom razpadejo na manjše fragmente, ki jih pri analizi s pretočnim citometrom zanemarimo.



Slika 3: Populacijski model elektroporiranega vzorca celic. R1: populacija živih celic je razdeljena v dva razreda; v razredu R11 so celice, ki se lahko delijo, v razredu R12 celice z blokiranim celičnim ciklom. R2: populacija celic s poškodovano celično membrano. R3: populacija mrtvih celic.

Model smo zapisali s sistemom pripadajočih diferencialnih enačb in upoštevali, da je vsota števila celic v populacijah R1, R2 in R3 celotno število analiziranih celic s pretočnim citometrom P. Število celic v posamezni populaciji, ki smo ga določili uro po elektroporaciji, je služilo kot začetna vrednost posamezne populacije. V tem času je že umrla večina celic, in sicer po poti takojšnje celične smrti. Tako smo



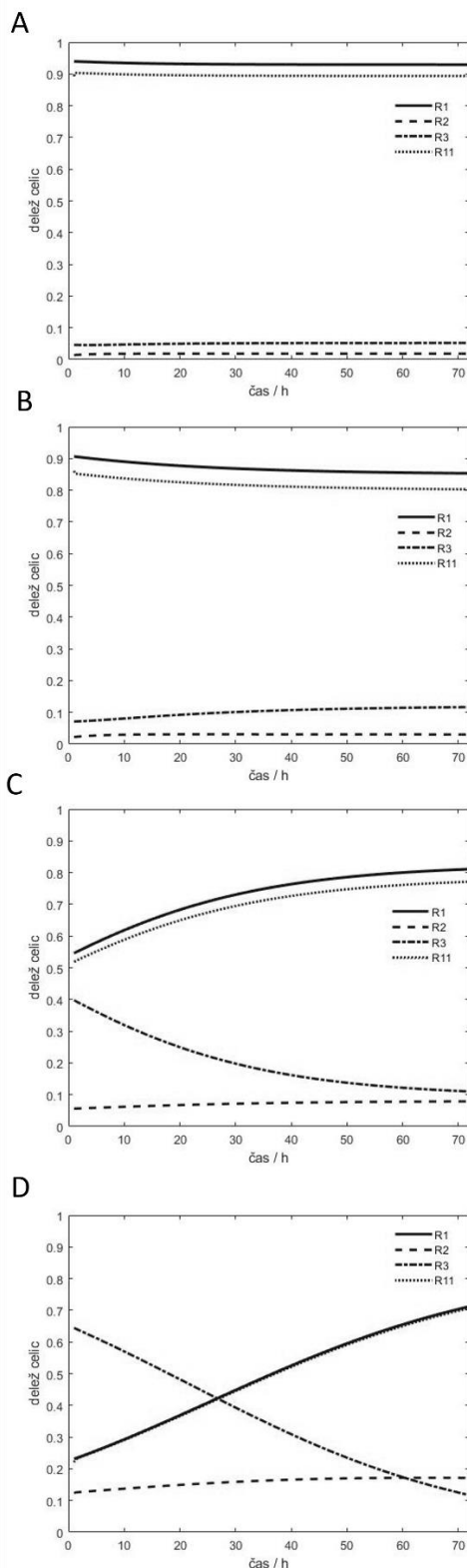
Slika 4: Eksperimentalni podatki in rezultati populacijskega modela. R1 označuje populacijo živih celic, R2 populacijo celic s poškodovano membrano, R3 populacijo mrtvih celic, R11 populacijo celic, ki se lahko delijo, in P populacijo vseh celic. A – kontrola (0 V), B – 20-odstotna permeabilizacija (100 V), C – 90-odstotno preživetje (175 V), D – 20-odstotno preživetje (250 V).

predpostavili, da uro po elektroporaciji populacijo živih celic sestavlja 95 % celic, ki se lahko delijo (R11), in 5 % celic, ki imajo blokiran celični cikel (R12). Hitrostne konstante modela po elektroporaciji z različnimi napetostmi električnih pulzov smo poiskali v programskem okolju Matlab s prilagoditvijo rešitev diferencialnih enačb eksperimentalnim podatkom po metodi najmanjših kvadratov. V programu smo zahtevali, da so vrednosti hitrostnih konstant pozitivne. Ker je podvojitveni čas celic določen z vrsto celične kulture, smo hitrostno konstanto  $k_1$ , ki določa proces delitve celic, določili na osnovi meritev kontrolnega vzorca (vzorec celic, ki je bil izpostavljen napetosti 0 V). Vrednosti konstante  $k_1$  nato nismo spreminjali ob prilagajanju rešitev diferencialnih enačb eksperimentalnim podatkom, ki so bili pridobljeni po elektroporaciji z izbranimi napetostmi električnih pulzov.

### 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

S pretočno citometrijo analiziramo veliko število celic v nekaj sekundah, in tako hitro dobimo informacije o fluorescenci, velikosti in granuliranosti celic v opazovanem vzorcu. Pri poskusih smo iz opazovanega vzorca izločili le objekte, ki so ustrezali velikosti celic, in glede na intenziteto fluorescence PI ločili tri populacije (slika 1): R1 – žive celice z nepoškodovano membrano, R2 – žive celice z deloma poškodovano oziroma permeabilizirano membrano, R3 – mrtve celice z nefunkcionalno membrano. Ker že med elektroporacijo in v obdobju inkubacije po elektroporaciji zelo poškodovane celice razpadejo, hkrati pa se žive celice po obdobju prilagajanja na novo rastno okolje oziroma po vzpostavljeni homeostazi delijo, se število celic v analiziranem vzorcu spreminja s časom inkubacije pa tudi z amplitudo električnih pulzov. Analiza s pretočnim citometrom je bila omejena na največ 10.000 delcev, zato v nekaterih vzorcih nismo mogli analizirati vseh celic v vzorcu. Za določitev hitrostnih konstant smo zato upoštevali le vzorce, v katerih je bilo število celic manjše od 10.000, kar pomeni, da smo analizirali vse celice vzorca.

Celice, ki so 1 uro po elektroporaciji v populaciji R3 (slika 1), so odmrle po poti takojšnje celične smrti. Celice, ki so v populaciji R3 ob preostalih urah izvajanja analiz, pa so umrle tudi zaradi zapoznele celične smrti. V kontrolnem vzorcu (vzorec celic, ki je bil izpostavljen napetosti 0 V), smo opazili 4 % mrtvih celic (R3), kar je posledica ravnanja s celicami med poskusom. S povečevanjem napetosti električnih pulzov med elektroporacijo se 1 uro po elektroporaciji število (slika 4) in delež (slika 5) mrtvih celic povečuje. To pomeni, da ob večji napetosti električnih pulzov takoj odmrje večji delež celic. Eksperimentalni rezultati in rezultati modela nakazujejo, da ostaja delež mrtvih celic v kontrolnem vzorcu vseh 72 ur opazovanja enak (slika 5A). Delež



Slika 5: Rezultati populacijskega modela, delež celic, ki pripada posamezni populaciji. R1 označuje populacijo živih celic, R2 populacijo celic s poškodovano membrano, R3 populacijo mrtvih celic in R11 populacijo celic, ki se lahko delijo. A – kontrola (0 V), B – 20-odstotna permeabilizacija (100 V), C – 90-odstotno preživetje (175 V), D – 20-odstotno preživetje (250 V).

mrtvih celic se v vzorcu, ki je bil izpostavljen električnim pulzom napetosti 100 V, s časom nekoliko povečuje (slika 5B), v vzorcih, ki so bili izpostavljeni električnim pulzom napetosti 175 V in 250 V, pa se delež mrtvih celic s časom zmanjšuje (sliki 5C in 5D). Zmanjševanje števila mrtvih celic s časom pri teh dveh napetostih (sliki 4C in 4D) je gotovo posledica razpadanja mrtvih celic s časom, a rezultati modela so pokazali, da se tudi hitrostna konstanta  $k_5$  z naraščajočo napetostjo zmanjšuje (tabela 1), kar pomeni, da pri večji napetosti manjše število celic prehaja iz populacije R2 v populacijo R3.

Tabela 1: Hitrostne konstante populacijskega modela, ki smo jih pridobili s prilagoditvijo rešitev diferencialnih enačb eksperimentalnim podatkom.

hitrostna konstanta	kontrola	100 V	175 V	250 V
$k_2$	0,800	0,965	0,097	0,042
$k_3$	19,843	15,199	1,723	5,089
$k_4$	0,133	0,101	0,153	0,616
$k_5$	0,236	0,147	0,056	$1,4 \times 10^{-7}$
$k_6$	0,059	0,015	0,026	0,015

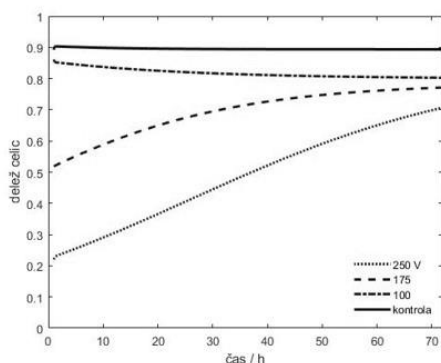
Zapoznena celična smrt naj bi prišla do izraza šele več ur po elektroporaciji [11]. V tem času se namreč prej neprepustna membrana živih celic zaradi procesov regulirane celične smrti toliko poškoduje, da omogoča vstop nekaj molekul PI v notranjost celic.

Eksperimentalni rezultati so pokazali, da se število celic v populaciji R2 elektroporiranih vzorcev z napetostjo električnih pulzov in s časom povečuje (slika 4). To so potrdili tudi rezultati populacijskega modela. Hitrostna konstanta  $k_4$ , ki opisuje prehajanje celic iz populacije živih celic R1 v populacijo celic s poškodovano membrano R2, se z napetostjo električnih pulzov, ki so bili uporabljeni za elektroporacijo, povečuje (tabela 1), še bolj intenzivno pa razmerje konstant  $k_4/k_5$ .

Delež populacije živih celic R1 v kontrolnem vzorcu se s časom ne spreminja. Rezultati modela pa so pokazali, da se delež populacije živih celic R1 v vzorcu, ki je bil izpostavljen električnim pulzom z napetostjo 100 V, s časom nekoliko zmanjšuje (slika 5). Zmanjševanje je posledica povečevanja deleža populacije R2, kar pomeni, da pri nizki elektroporacijski napetosti zapoznena celična smrt igra pomembno vlogo. Delež populacije živih celic R1 v vzorcih, ki sta bila izpostavljena električnim pulzom z napetostjo 175 V in 250 V, se s časom večja. Večanje je intenzivnejše v primeru večje napetosti, saj so tako rekoč vse žive celice v populaciji R11, ki vsebuje deleže celice (slika 5).

Na sliki 6 so prikazane odvisnosti deleža celic, ki se lahko deli, od časa po elektroporaciji z električnimi pulzi obravnavanih napetosti, ki smo jih izračunali s populacijskim modelom. Vidimo, da se v kontrolnem vzorcu delež deležih se celic s časom ne spreminja. Po elektroporaciji z električnimi pulzi napetosti 100 V se

delež delečih se celic s časom nekoliko manjša, kar nakazuje na prisotnost procesov zapoznele celične smrti. Po elektroporaciji z električnimi pulzi visokih napetosti pa se delež delečih se celic s časom povečuje. To pomeni, da se celice, ki so elektroporacijo preživele, večinoma lahko tudi delijo.



Slika 6: Rezultati populacijskega modela; odvisnost deleža celic, ki pripadajo populaciji R11, od časa po izpostavitvi električnim pulzom različnih napetosti.

Pri zdravljenju z elektroporacijo v pogojih *in vivo* sta neizogibno prisotni tako reverzibilna kot ireverzibilna elektroporacija, saj intenzivnost elektroporacije upada z oddaljenostjo od elektrod. To pomeni, da v neposredni bližini elektrod, kjer je jakost električnega polja največja, celice odmrejo tudi pri zdravljenjih z reverzibilno elektroporacijo [21], [22]. Dinamična celična smrt je torej prisotna tudi pri zdravljenju, ki temelji na reverzibilni elektroporaciji.

Glede na rezultate modela predvidevamo, da se bodo celice, katerih membrana je 1 uro po ireverzibilni elektroporaciji nepoškodovana, delile, kar bi pomenilo nezadovoljivo ablacijo tkiva na tem področju. Po drugi strani pa lahko na področjih tkiva, ki so bila izpostavljena nizki jakosti električnega polja, t. i. reverzibilni elektroporaciji, pričakujemo nezaželeno zapoznelo celično smrt. Oba omenjena pojava imata pomemben vpliv na rezultate zdravljenja [23].

#### 4 ZAKLJUČEK

Opisani model je dobra osnova za model dinamične celične smrti pri elektroporaciji, vendar bo za popolnejšo sliko o celični smrti pri elektroporaciji verjetno treba vključiti še dodatne že znane celične procese, kot so kemične reakcije na celični membrani. Z nekaj izboljšavami lahko model služi za boljše razumevanje in napovedovanje odziva celične populacije na elektroporacijo.

#### 5 ZAHVALA

Raziskavo je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije v okviru programa P2-0249 – Elektroporacija v biologiji, biotehnologiji in medicini ter infrastrukturnega centra Celične elektrotehnike, ki je del mreže raziskovalnih infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani (I0-0022).

#### LITERATURA

- [1] T. Kotnik, L. Rems, M. Tarek, and D. Miklavčič, "Membrane Electroporation and Electroporabilization: Mechanisms and Models," vol. 48, pp. 63–91, May 2019.
- [2] M. A. Miller and J. F. Zachary, "Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death," *Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult*, pp. 2-43.e19, Jan. 2017, doi: 10.1016/B978-0-323-35775-3.00001-1.
- [3] T. B. Napotnik, T. Polajžer, and D. Miklavčič, "Cell death due to electroporation - A review," *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 141, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.BIOELECTCHEM.2021.107871.
- [4] N. W. Andrews, P. E. Almeida, and M. Corrotte, "Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair.," *Trends in cell biology*, vol. 24, no. 12, pp. 734–42, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.tcb.2014.07.008.
- [5] R. V. Davalos, I. L. M. Mir, and B. Rubinsky, "Tissue ablation with irreversible electroporation.," *Annals of biomedical engineering*, vol. 33, no. 2, pp. 223–31, Feb. 2005.
- [6] E. Ekanem *et al.*, "Multi-national survey on the methods, efficacy, and safety on the post-approval clinical use of pulsed field ablation (MANIFEST-PF)," *Europace*, vol. 24, no. 8, pp. 1256–1266, Sep. 2022, doi: 10.1093/europace/euac050.
- [7] A. Verma *et al.*, "Pulsed Field Ablation for the Treatment of Atrial Fibrillation: PULSED AF Pivotal Trial," *Circulation*, vol. 147, no. 19, pp. 1422–1432, May 2023, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.123.063988.
- [8] "FDA Approves First Pulsed Field Ablation System for AF," *Medscape*. Accessed: Jan. 05, 2024. [Online]. Available: <https://www.medscape.com/viewarticle/fda-approves-first-pulsed-field-ablation-system-af-2023a1000vit>
- [9] B. Schmidt *et al.*, "European real-world outcomes with Pulsed field ablation in patients with symptomatic atrial fibrillation: lessons from the multi-centre EU-PORIA registry," *Europace*, vol. 25, no. 7, p. euad185, Jul. 2023, doi: 10.1093/europace/euad185.
- [10] R. A. Tilz *et al.*, "A worldwide survey on incidence, management, and prognosis of oesophageal fistula formation following atrial fibrillation catheter ablation: the POTTER-AF study," *European Heart Journal*, vol. 44, no. 27, pp. 2458–2469, Jul. 2023, doi: 10.1093/eurheartj/ehad250.
- [11] M. B. Sano, C. B. Arena, M. R. DeWitt, D. Saur, and R. V. Davalos, "In-vitro bipolar nano- and microsecond electro-pulse bursts for irreversible electroporation therapies," *Bioelectrochemistry*, vol. 100, pp. 69–79, 2014, doi: 10.1016/j.bioelechem.2014.07.010.
- [12] B. Mercadal, N. Beitel-White, K. N. Aycock, Q. Castellví, R. V. Davalos, and A. Ivorra, "Dynamics of Cell Death After Conventional IRE and H-FIRE Treatments," *Annals of Biomedical Engineering*, pp. 1–12, Feb. 2020, doi: 10.1007/s10439-020-02462-8.
- [13] P. W. Sowa *et al.*, "How to alleviate cardiac injury from electric shocks at the cellular level," *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, vol. 9, 2022, Accessed: Feb. 02, 2023. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2022.1004024>
- [14] V. M. Ringel-Scaia *et al.*, "High-frequency irreversible electroporation is an effective tumor ablation strategy that induces immunologic cell death and promotes systemic anti-

- tumor immunity,” *EBioMedicine*, vol. 44, pp. 112–125, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.036.
- [15] W. Peng, T. Polajžer, C. Yao, and D. Miklavčič, “Dynamics of Cell Death Due to Electroporation Using Different Pulse Parameters as Revealed by Different Viability Assays,” *Ann Biomed Eng.*, Sep. 2023, doi: 10.1007/s10439-023-03309-8.
- [16] V. Novickij, J. Dermol, A. Grainys, M. Kranjc, and D. Miklavčič, “Membrane permeabilization of mammalian cells using bursts of high magnetic field pulses,” *PeerJ*, vol. 5, p. e3267, 2017, doi: 10.7717/peerj.3267.
- [17] M. Srinivasan, R. Clarke, and P. Kraikivski, “Mathematical Models of Death Signaling Networks,” *Entropy*, vol. 24, no. 10, Art. no. 10, Oct. 2022, doi: 10.3390/e24101402.
- [18] M. D. Johnston, C. M. Edwards, W. F. Bodmer, P. K. Maini, and S. J. Chapman, “Mathematical modeling of cell population dynamics in the colonic crypt and in colorectal cancer,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 10, pp. 4008–4013, Mar. 2007, doi: 10.1073/pnas.0611179104.
- [19] N. Terranova *et al.*, “Mathematical modeling of growth and death dynamics of mouse embryonic stem cells irradiated with  $\gamma$ -rays,” *J Theor Biol*, vol. 363, pp. 374–380, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.jtbi.2014.08.042.
- [20] J. Dermol-Černe and D. Miklavčič, “Modeliranje elektroporacije na več ravneh”.
- [21] J. Zmuc *et al.*, “Large Liver Blood Vessels and Bile Ducts Are Not Damaged by Electrochemotherapy with Bleomycin in Pigs,” *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-40395-y.
- [22] H. Cindrič, B. Kos, and D. Miklavčič, “Electrodes and Electric Field Distribution in Clinical Practice,” in *Electroporation in Veterinary Oncology Practice: Electrochemotherapy and Gene Electrotransfer for Immunotherapy*, J. A. Impellizzeri, Ed., Cham: Springer International Publishing, 2021, pp. 21–59. doi: 10.1007/978-3-030-80668-2\_2.
- [23] T. Polajžer and D. Miklavčič, “Immunogenic Cell Death in Electroporation-Based Therapies Depends on Pulse Waveform Characteristics,” *Vaccines*, vol. 11, no. 6, Art. no. 6, Jun. 2023, doi: 10.3390/vaccines11061036.

**Tamara Polajžer** je leta 2022 na Biotehniški fakulteti v Ljubljani doktorirala iz raziskovalnega dela, opravljenega na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Zaposlena je kot raziskovalka na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Njeno raziskovalno področje zajema proučevanje bioloških odzivov celic na električno pulzirajoče polje.

**Alenka Maček Lebar** je leta 1991 doktorirala na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Zaposlena je kot izredna profesorica in asistentka z doktoratom na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Raziskovalno se ukvarja z vplivi električnih polj na biološke sisteme.