



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM VLIVU FARADAICKÝCH PROCESŮ NA ÚČINNOST ELEKTROPORACE KVASINEK

STUDY OF THE INFLUENCE OF FARADAIC PROCESSES ON THE EFFICIENCY OF YEAST
ELECTROPORATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Dominik Martinů

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Ehlich, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1946/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Dominik Martinů**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biochemická technologie
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Ehlich, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium vlivu faradaických procesů na účinnost elektroporace kvasinek

Zadání bakalářské práce:

V rámci bakalářské práce řešte tyto dílčí úkoly:

- Proveďte literární rešerši týkající se elektroporace v kontextu potravinářství, biotechnologií a medicíny.
- Proveďte literární rešerši zaměřující se na mechanismus elektroporace s důrazem na faradaické reakce a tvorbu reaktivních forem kyslíku.
- Porovnejte množství vyprodukovaných reaktivních forem kyslíku na elektrodách z různých materiálů ve standardních elektrolytech a pomocí standardních elektroporačních protokolů.
- Vyberte elektrodové materiály generující největší a nejmenší množství reaktivních forem kyslíku a zhodnoťte jejich vliv na účinnost elektroporace kvasinek.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Dominik Martinů
student

Ing. Jiří Ehlich, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Elektroporace je metoda široce využívaná v biotechnologii a ve zdravotnictví. Spočívá v aplikaci krátkých intenzivních elektrických pulzů, díky kterým dochází k tvorbě pórů v buněčné membráně. Skrze tyto póry následně dochází k výměně molekul mezi elektrolytem a intracelulárním prostředím.

Ačkoli je elektroporace standardně využívanou technikou, její přesný mechanismus je stále neznámý a předmětem současného výzkumu. Předpokládá se, že hlavním mechanismem elektroporace je samotné působení elektrického pole. Nedávné studie však naznačují, že jedním z doprovodných mechanismů může být také působení reaktivních forem kyslíku (ROS) a obecně produktů faradaických procesů. Tyto silně oxidující molekuly mohou mít vliv jak na účinnost elektroporace, tak na viabilitu buněk. Hypotézou bylo, že anodizací elektroporačních elektrod, tj. vytvořením tenké vrstvy dielektrika na jejich povrchu je možné zabránit produkci ROS. Následným srovnáním účinnosti elektroporace za použití připravených kapacitních elektrod a klasických faradaických elektrod lze odhalit efekt ROS na elektroporaci.

Byla zmapována produkce H_2O_2 jakožto zástupce ROS při použití standardních elektroporačních pufrů, protokolů a různých elektrodových materiálů. Koncentrace H_2O_2 byla stanovena spektrofotometricky jeho reakcí s 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinem (TMB) za katalýzy enzymem křenová peroxidáza (HRP). Byly vybrány takové elektrody, aby bylo dosaženo nízké, střední a vysoké produkce H_2O_2 . Vybrané elektrody byly použity k *in vitro* elektroporaci kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, přičemž účinnost permeabilizace byla stanovována elektrochemickou impedanční spektroskopií (EIS) a měřením fluorescence dopraveného propidium jodidu (PI).

Bylo zjištěno, že působení ROS není hlavním mechanismem tvorby pórů v buněčné membráně během elektroporace a nemá významný vliv na účinnost této metody. Výsledky však nevylučují jejich roli v sekundárních procesech, které ovlivňují kinetiku uzavírání pórů a viabilitu buněk po elektroporaci.

Klíčová slova

Elektroporace, Reaktivní formy kyslíku, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

Electroporation is a widely used method in biotechnology and healthcare. It involves the application of short, intense electric pulses, which create pores in the cell membrane. These pores allow the exchange of molecules between the electrolyte and the intracellular environment.

Although electroporation is a standard technique, its exact mechanism remains unknown and is the subject of current research. It is assumed that the primary mechanism of electroporation is the effect of the electric field itself. Recent studies, however, suggest that one of the accompanying mechanisms may also be the effect of reactive oxygen species (ROS) and generally the products of faradaic processes. These highly oxidizing molecules can influence both the efficiency of electroporation and cell viability. The hypothesis was that by anodizing electroporation electrodes, i.e., creating a thin dielectric layer on their surface, the production of ROS can be prevented. By subsequently comparing the efficiency of electroporation using prepared capacitive electrodes and classic faradaic electrodes, it would be possible to reveal the effect of ROS on electroporation.

The production of H₂O₂, as a representative of ROS, was mapped using standard electroporation buffers, protocols, and various electrode materials. The concentration of H₂O₂ was determined spectrophotometrically by its reaction with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) catalyzed by horseradish peroxidase (HRP). Electrodes were selected to achieve low, medium, and high production of H₂O₂. These selected electrodes were used for *in vitro* electroporation of *Saccharomyces cerevisiae* yeast, with the efficiency of permeabilization determined by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and fluorescence measurement of propidium iodide (PI) intake.

It was found that the action of ROS is not the primary mechanism of pore formation in the cell membrane during electroporation and does not significantly affect the efficiency of this method. However, the results do not exclude their role in secondary processes that affect the kinetics of pore closure and cell viability after electroporation.

Keywords

Electroporation, Reactive oxygen species, *Saccharomyces cerevisiae*

MARTINŮ, Dominik. *Studium vlivu faradaických procesů na účinnost elektroporace kvasinek*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156611>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jiří Ehlich.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem CEITEC a Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem obou institucí, vedoucího práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu mé práce, Jiřímu Ehlichovi, za šanci podílet se na něčem, co mi dává smysl, za vše, co mě naučil, a za veškerý čas, který mi při řešení této práce věnoval. Moc si toho vážím.

Dále bych chtěl poděkovat Ericu D. Glowackému za cenné rady a konverzace nejen o vědě, Marii Jakešové za trpělivost v čistých prostorách a pomoc s přípravou napařených elektrod, Anně Tvrdoňové za čas v čistých prostorách a SEM fotky elektrod, Čendovi Vašíčkovi a Amedeovi Ruggierovi za to, že v laboratoři nikdy nebyla nuda, a celému týmu Bioelektronické materiály a systémy na CEITEC VUT za cenné připomínky k mým prezentacím a celkově skvělý kolektiv.

Velký dík patří také Michalu Cifrovi, Kateřině Červinkové, Tomášovi Zakarovi a celému týmu z ÚFE za to, že mi dali šanci se na projektu podílet, pracovat v jejich laboratořích, a za výborné, vydatné obědy.

Také bych chtěl poděkovat Pavlovi Šilerovi z Fakulty chemické VUT za provedení XRF analýzy elektrod.

Největší dík patří mé rodině a mé přítelkyni, bez kterých bych studium nezvládl. Jste mi neustálou oporou a za to vám z celého srdce děkuji.

1	Úvod	1
2	Teoretická část	2
2.1	Elektroporace	2
2.1.1	Princip a historie elektroporace	2
2.1.2	Reverzibilní elektroporace (RE)	3
2.1.3	Ireverzibilní elektroporace (IRE)	3
2.1.4	Mechanismus elektroporace	3
2.1.4.1	Vliv externího elektrického pole na membránový potenciál	4
2.1.4.2	Tvorba a zánik pórů	6
2.2	Využití elektroporace	7
2.2.1	Genová transfekce	7
2.2.2	Elektrofúze buněk	8
2.2.3	Pulzní elektrické pole	8
2.2.4	Elektrochemoterapie	9
2.2.5	Ablace tkání	9
2.2.5.1	N-TIRE (Non-thermal irreversible electroporation)	9
2.2.5.2	H-FIRE (High-frequency irreversible electroporation)	10
2.3	Elektroporace v praxi	11
2.4	Faradaické a kapacitní procesy přenosu náboje	14
2.4.1	Kapacitní přenos náboje	14
2.4.2	Faradaický přenos náboje	15
2.4.3	Ekvivalentní obvod pro znázornění kapacitních a faradaických procesů	16
2.4.4	Možné faradaické reakce během elektroporace	18
2.4.4.1	Elektrolýza vody	18
2.4.4.2	Redukční reakce kyslíku (ORR)	18
2.4.4.3	Oxidace chloridů	18
2.4.4.4	Rozpouštění elektrod	19
2.4.4.5	Redukční reakce dusíku (NRR)	19
2.4.5	Reaktivní formy kyslíku (ROS)	20
2.4.6	Peroxidace lipidů	20
3	Experimentální část	23
3.1	Cíl práce	23
3.2	Seznam použitých chemikálií	23
3.3	Seznam použitých přístrojů	24
3.4	Návrh a výroba elektroporační cely	25
3.5	Příprava faradaických a kapacitních elektrod	27
3.6	Spektrofotometrické stanovení H ₂ O ₂	30
3.7	Měření proudu během elektroporace	31
3.8	Kultivace kvasinek a příprava jejich suspenze	31
3.9	Protokol pro elektroporaci kvasinek	32
3.10	Měření fluorescence propidium jodidu (PI)	33
3.10.1	Celková fluorescence	33
3.10.2	Fluorescenční mikroskop	33
3.11	Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)	34
3.12	Výsledky a diskuze	36
4	Závěr	50
5	Seznam použité literatury	51

6	Seznam použitých zkratek	60
7	Přílohy	62

1 Úvod

Elektroporace, metoda pro dopravení cizorodých molekul do buněk aplikací krátkých elektrických pulzů, se stala nepostradatelnou v různých oblastech včetně molekulární biologie, genového inženýrství a zdravotnictví [1, 2]. Od svého objevu v 60. letech 20. století [3] se stala všestranným nástrojem využívaným v široké škále aplikací, od genové transfekce a dopravení léčiv až po úpravu potravin a léčbu rakoviny.

Navzdory širokému využití jsou její přesné mechanismy neznámé a zůstávají předmětem neustálého zkoumání. Podstatou elektroporace je vytvoření přechodných pórů v buněčné membráně, které jsou příčinou aplikace elektrického pole. Tyto póry umožňují průchod molekul, které by jinak byly pro buněčnou membránu nepropustné [4].

Výsledek elektroporace ovlivňuje celé množství faktorů, mezi hlavní patří intenzita elektrického pole a délka pulzů. Vědecká komunita se však domnívá, že jedním z nich je i výskyt faradaických procesů na elektrodách během aplikace elektrických pulzů. Faradaické procesy zahrnují přenos elektronů mezi povrchem elektrody a okolním elektrolytem, což vede ke vzniku elektrochemických produktů, jako jsou například ROS (reaktivní formy kyslíku), které mohou ovlivnit tvorbu a/nebo uzavření pórů či viabilitu buněk. Právě působení ROS na buněčnou membránu je považováno za jeden z mechanismů elektroporace [5]. I přesto výzkum zaměřený na faradaické procesy během elektroporace a jejich vliv na její účinnost prakticky neexistuje.

Cílem této bakalářské práce je prozkoumat vliv faradaických procesů na účinnost elektroporace za použití kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* jako modelového systému. Hypotéza je, že vytvořením tenké vrstvy dielektrika na povrchu elektrod jejich anodizací je možné připravit kapacitní elektrody, a zamezit tak tvorbě produktů elektrochemických reakcí. Anodizace elektrod už v minulosti byla použita k zamezení faradaických procesů při aplikaci elektrických polí na buňky [6]. Zkoumáním různých elektrodových materiálů a kvantifikací elektrochemických procesů, které na nich probíhají se tato práce snaží objasnit, jak může anodizace elektrod ve srovnání s klasickými elektrodami ovlivnit faradaické procesy a následně i účinnost elektroporace.

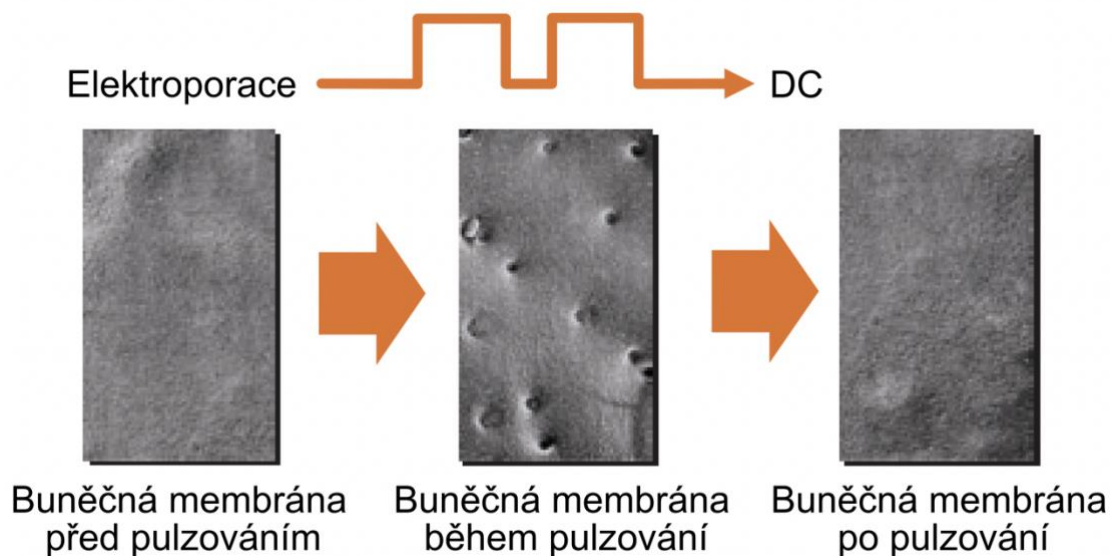
Odhalením role faradaických procesů při elektroporaci přispívá tato práce k neustálému zdokonalování elektroporačních technik a rozšiřuje naše chápání jejich mechanismů a aplikací v biotechnologii a medicíně.

2 Teoretická část

2.1 Elektroporace

2.1.1 Princip a historie elektroporace

Elektroporace je jev, využívaný v molekulární biologii a genovém inženýrství [4, 7–9], či pod zkratkou PEF (pulzní elektrické pole) v potravinářském průmyslu [10–13]. Aplikací krátkých napěťových pulzů dochází ke zvýšení permeability buněčné membrány pro extracelulární molekuly [14]. Při elektroporaci vznikají v membráně hydrofilní póry [5], kterými je možné do intracelulárního prostředí dopravit například genetický materiál (plazmidy, ...), nebo polární/nabitě molekuly, tedy látky, které by se do buňky za normálních podmínek dostávaly pouze omezeně, nebo vůbec.



Obrázek 1 – Schéma permeabilizace buněčné membrány během elektroporace. Přeloženo z [15].

První záznamy o elektroporaci pocházejí z poloviny 18. století, kdy byly pozorovány červené skvrny (Lichtenbergovy obrazce) na zvířecí a lidské kůži po jejím vystavení elektrickým výbojům. Takový jev se dá vysvětlit jako ireverzibilní elektroporace kapilár způsobená Joulovým teplem. Na konci 19. století byly provedeny první experimenty s ireverzibilní elektroporací (baktericidní úprava vody). Na začátku 20. století bylo konstatováno, že za poškození tkání elektrickým polem o vysokých frekvencích nemohou tepelné jevy, ale že existuje alternativní mechanismus zodpovědný za cílenou ablací. V roce 1956 se elektroporace začala spojovat se změnami konduktivity u nervů, které byly poškozeny elektrickým polem. O rok později pak byla popsána reverzibilní i ireverzibilní elektroporace nervů žáby [3]. V 70. letech 20. století bylo zjištěno, že aplikace elektrického pole na buněčnou membránu vede ke strukturálním změnám v buněčné membráně, které jsou příčinou zvýšení permeability membrány [16, 17]. V roce 1982 byla provedena první genová transfekce a elektrofúze pomocí elektroporace. V následujících letech začala elektroporace nalézat své uplatnění i v medicíně [1].

Za zmínění stojí i zajímavá studie z roku 2014, která navrhuje, že elektroporace a elektrofúze přispívaly k horizontálnímu genovému přenosu (HGT) [18]. HGT je proces, při němž organismus přijímá genetický materiál (DNA) jiného organismu (co není potomkem), čímž může získat nové vlastnosti. Fylogenetické studie uvádějí, že právě HGT stojí za genetickou variabilitou prokaryot. Kotnik [18] přišel s teorií, že atmosférické elektrostatické výboje (blesky) mohly v ranných začátcích evoluce způsobit elektroporaci a elektrofúzi prokaryot, která umožnila HGT.

2.1.2 Reverzibilní elektroporace (RE)

Reverzibilní/vratná elektroporace probíhá, když aplikované elektrické pole nepřekročí reverzibilní práh cílových buněk. Buňky mají schopnost zacelit póry v membráně a stabilizovat tak homeostázu. Své využití nalézá při vpravování cizích molekul nebo genů do buněk, viabilita buněk je tak důležitým faktorem RE [19].

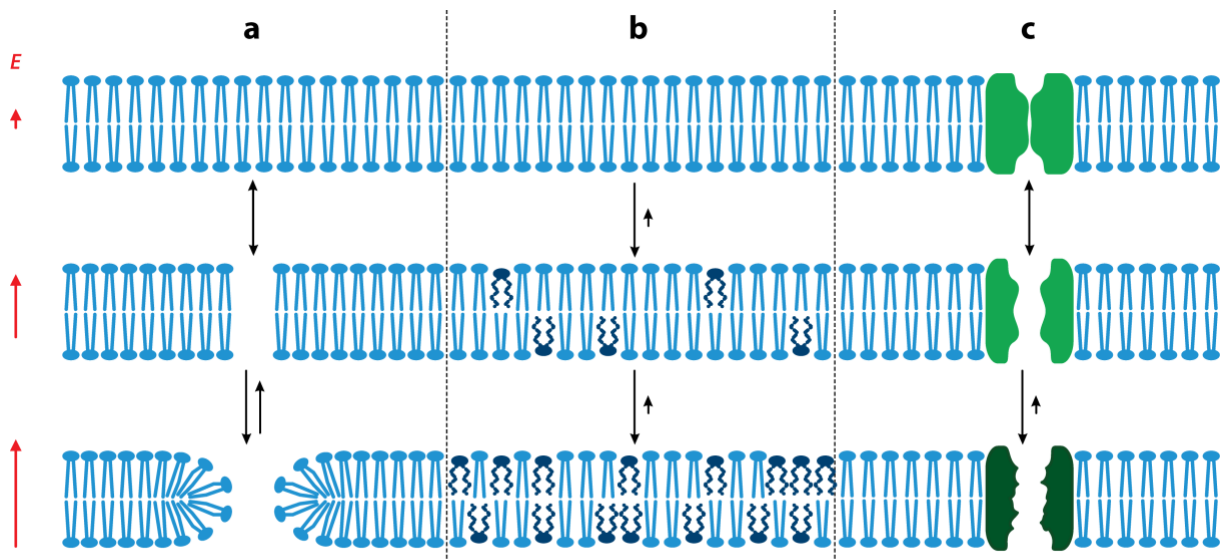
2.1.3 Ireverzibilní elektroporace (IRE)

Ireverzibilní/nevratná elektroporace naopak od reverzibilní elektroporace probíhá, když aplikované elektrické pole překročí reverzibilní práh cílové buňky. Dochází tak k nevratnému poškození buněčné membrány a ztrátě homeostázy – buněčné smrti. V praxi nalézá své využití k cílené ablaci převážně nádorových tkání (N-TIRE a H-FIRE) [19].

2.1.4 Mechanismus elektroporace

Ačkoli je elektroporace hojně využívanou metodou, její mechanismus je stále nejasný. Existuje velké množství studií věnujících se potenciálním mechanismům, které stojí za vznikem pórů v buněčné membráně. Velká část výzkumu elektroporace je věnována zejména molekulárně-dynamickému (MD) mechanismu tvorby pórů. Je například popsána role systému vodíkových vazeb v lipidové dvojvrstvě při aplikaci elektrických pulzů [20], nebo defektů v lipidové dvojvrstvě způsobených pohybem molekul v gradientu elektrického pole [21]. Některé MD studie popisují vliv peroxidace lipidů na úroveň permeabilizace při elektroporaci [22]. Peroxidace lipidů je jedním z důsledků působení reaktivních kyslíkových forem (ROS), jejichž vliv na elektroporaci je hlavním tématem této práce. Zmíněné studie se zabývají molekulární dynamikou těchto procesů *in silico*. V praxi byl však tento fenomén potvrzen hned v několika případech [23–28]. Jakmile dojde k aplikaci elektrického pole, lipidové membrány jsou ihned pod útokem ROS a dochází k peroxidaci lipidů, produkty takových reakcí mohou způsobit chemické a strukturní změny v lipidové dvojvrstvě, což může ovlivnit vlastnosti membrány. Na planární lipidové dvojvrstvě bylo demonstrováno, že oxidace lipidů vede ke zvýšení její konduktivity a plošné kapacity, je tedy možné, že za vyšší permeabilitu membrány může právě peroxidace lipidů [26]. Dalším důsledkem aplikace elektrického pole je denaturace proteinů v lipidových membránách, která je také popisována jako jedním z možných doprovodných mechanismů [14, 29].

Ať už se jedná o simulaci nebo experimentální práci, nelze přímo určit, který z mechanismů má největší podíl na permeabilizaci buněčné membrány při elektroporaci. Je pravděpodobné, že celý proces je jistou souhrou mezi elektrickým polem a sekundárními procesy, které zahrnují právě působení produktů elektrochemických reakcí na složky buněčné membrány.



Kotnik T, et al. 2019.
Annu. Rev. Biophys. 48:63–91

Obrázek 2 – Schéma molekulárních mechanismů, které hrají roli při elektropermeabilizaci. (a) Elektroporace: tvorba hydrofilního póru v lipidové dvojvrstvě, zobrazena ve dvou krocích. Prvním krokem je tvorba nestabilního hydrofobního póru (uprostřed) a druhým krokem je reorientace polárních hlaviček fosfolipidů, která stojí za stabilizací hydrofilního póru (dole). (b) Chemické změny membránových lipidů, způsobené jejich oxidací (vlivem ROS), vedoucí ke zvýšení permeability lipidové dvojvrstvy pro vodu, ionty a menší molekuly. (c) Změny ve funkci membránových proteinů vlivem silného elektrického pole (napětově řízené kanály). Červené šipky odpovídají intenzitě elektrického pole (E); čím delší šipka, tím intenzivnější elektrické pole a jím vyvolané efekty. Černé šipky odpovídají rychlosti reakce, přičemž krátké šipky značí pomalejší reakci [5].

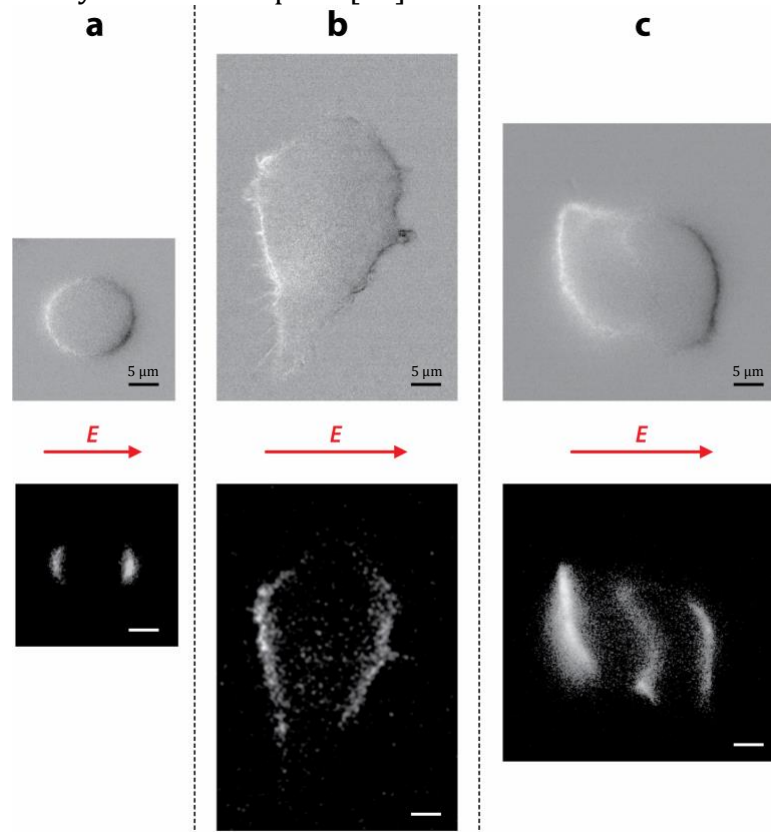
2.1.4.1 Vliv externího elektrického pole na membránový potenciál

Nabité molekuly nejsou schopny samovolně difundovat skrze lipidovou dvojvrstvu, jejich přenos je tedy zprostředkován iontovými pumpami a kanály. Membránový potenciál je důsledkem transportu iontů skrze buněčnou membránu. Stěžejní vliv na membránový potenciál mají zejména Na^+ a K^+ ionty. Jejich gradienty jsou řízeny transmembránovým proteinem – sodno-draselnou pumpou, která čerpá Na^+ ionty do extracelulárního prostředí a K^+ ionty do intracelulárního prostředí, a to v poměru 3:2. Tento přenos probíhá proti koncentračnímu gradientu na úkor spotřeby ATP. Otevíráním a zavíráním této pumpy dochází ke změnám gradientů Na^+ a K^+ iontů, což způsobuje změnu membránového potenciálu [30]. Díky poměru mezi Na^+ a K^+ ionty přenášenými transmembránovým proteinem je vždy více kladného náboje přeneseno do vnějšího prostředí, než do vnitřního, důsledkem je celkový záporný náboj uvnitř buňky [31]. Za fyziologických podmínek a bez vnější stimulace udržuje buňka tzv. klidový membránový potenciál (RP), který se pro kvasinky pohybuje zhruba od -120 do -50 mV [32].

Stimulace excitabilní (polarizovatelné) buňky chemickým, nebo například elektrickým stimulem způsobí depolarizaci membrány. Pokud depolarizace překročí určitý práh, dojde ke vzniku akčního potenciálu (AP). Akční potenciál se projevuje rapidní depolarizací vlivem externího stimulu, následovanou lehkou hyperpolarizací a poté pomalým návratem na klidový membránový potenciál. Akční potenciály jsou většinou diskutovány v kontextu neuronových buněk, avšak mnoho excitabilních buněk, jako jsou například buňky srdeční svaloviny, je rovněž schopno tvořit akční potenciály [33].

Velmi intenzivní elektrické pole při elektroporaci zapříčiní tvorbu indukovaného membránového potenciálu (IMP), který je udržován po dobu aplikace pulzů a je úměrný síle elektrického pole. Jeho hodnota se může pohybovat od 250 mV až k 1 V, což závisí na podmínkách a typu buňky. Takto vysoký membránový potenciál může způsobit řadu

změn, jako je například strukturální přeuspořádání lipidů ve dvojvrstvě, což může být jednou z příčin tvorby a stabilizace pórů [34].

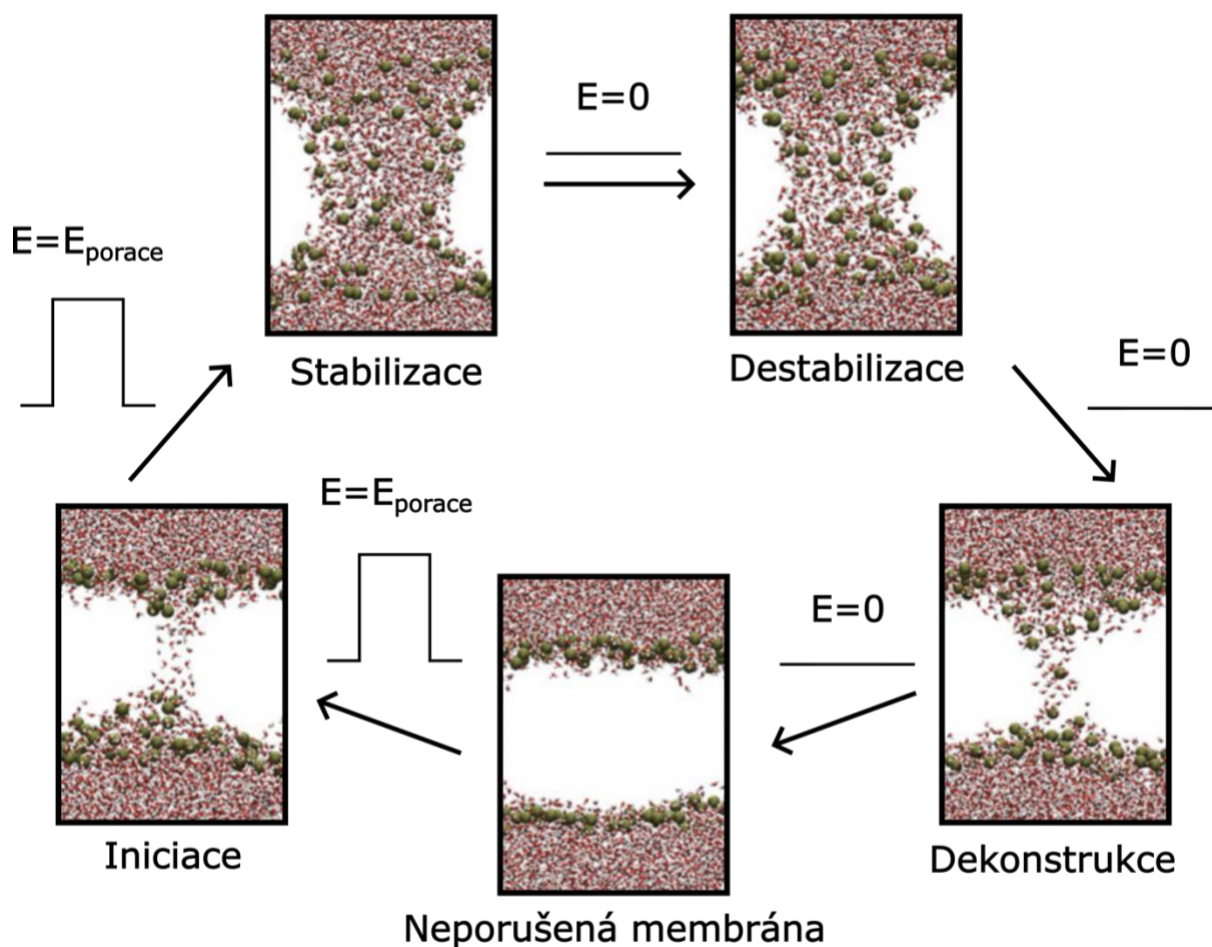


 Kotnik T, et al. 2019. *Annu. Rev. Biophys.* 48:63–91

Obrázek 3 – Transmembránové napětí (TMV – nahoře) a elektropermeabilizace (dole) CHO buněk ve fyziologickém médiu. TMV bylo monitorováno pomocí di-8-ANEPPS (potenciometrické barvivo) a elektropermeabilizace pomocí PI (propidium jodid – nepermeabilní fluorescenční barvivo). Tři morfologicky odlišné buňky (a; b; c) byly elektroporovány, přičemž byly pozorovány změny v permeabilitě membrány a hodnotě TMV. (a) Sferoidní buňka byla vystavena jednomu pulzu o délce 1,5 ms a intenzitě 650 V/cm. (b; c) Tvarově nepravidelné buňky byly vystaveny jednomu pulzu o délce 200 μ s a intenzitě 1000 V/cm. Na obrázcích TMV (nahoře) odpovídají světlá místa nejvyššímu pozitivnímu TMV a tmavá místa nejvyššímu negativnímu TMV. Na obrázcích elektropermeabilizace odpovídají světlá místa oblastem s nejvyšší koncentrací PI a tmavá místa oblastem s nejnižší koncentrací PI [5].

2.1.4.2 Tvorba a zánik pórů

Při aplikaci elektrického pulzu dochází nejprve k tvorbě nestabilních hydrofobních pórů vznikem tzv. „water fingers“ na obou stranách membrány. Následuje stabilizace pórů reorientací polárních hlaviček fosfolipidů do středu póru, čímž vznikají stabilní hydrofilní póry [35].



Obrázek 4 – Životní cyklus elektroporačního póru se skládá z několika částí: prvním krokem je iniciace, kdy vlivem vnějšího elektrického pole ($E = E_{porace}$) dochází k tvorbě již zmíněných „water fingers“ na obou stranách membrány (nestabilní hydrofobní pór). Následuje konstrukce hydrofilního póru, která je doprovázena spojením polárních hlaviček fosfolipidů (stabilní hydrofilní pór). Dokud je aplikováno vnější elektrické pole ($E = E_{porace}$), pór se zvětšuje. Jakmile je vnější elektrické pole přerušeno ($E = 0$), nastane fáze zániku póru. V podstatě se jedná o reverzní proces, který zahrnuje destabilizaci, dekonstrukci póru a jeho navrácení do původního stavu. Schéma pochází z MD simulace, kde jsou zeleně označené polární hlavičky fosfolipidů a červeno-bílé molekuly představují vodu. Pro lepší viditelnost jsou nepolární řetězce fosfolipidů skryté, odpovídají však bílé oblasti, která rozděluje vnější a vnitřní oblast membrány. Převzato a upraveno z [35].

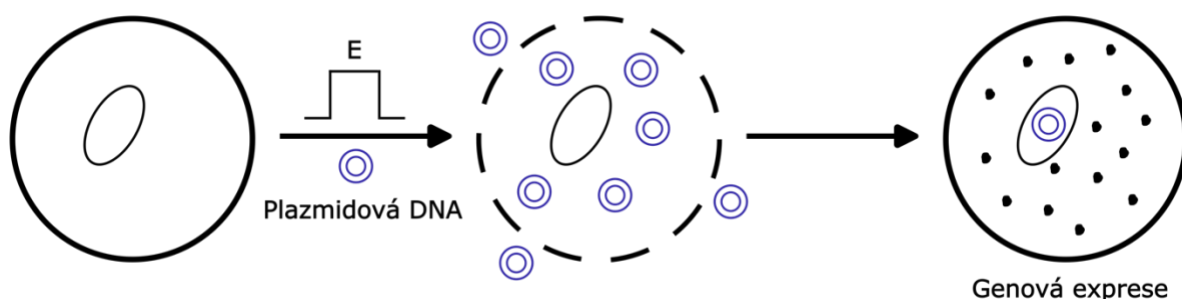
Vzniklé póry expandují a může skrze ně docházet k přenosu iontů či jiných molekul. Velikost pórů stanovená *in silico* se z převážné většiny pohybuje kolem 1 nm pro většinu pórů, přibližně 98 %. Zbytek tvoří větší póry, které dosahují velikostí kolem 20 nm, mohou však vznikat i mnohem větší póry s velikostí až 400 nm [36]. Experimentální stanovení velikosti pórů má několik přístupů. Využívá se například detekce fluorescence barviv a iontů, technika „patch-clamp“ nebo jev bobtnání buněk, ke kterému dochází po elektroporaci [37]. Bylo dokázáno, že velikost pórů závisí převážně na délce pulzu, přičemž nejmenší póry mají velikost mezi 0,2 a 0,5 nm [38]. MD simulace v minulosti prokázaly, že při dostatečně vysokém IMP dochází k tvorbě a expanzi pórů, doprovázené jejich uzavřením ve chvíli, kdy membránový potenciál klesne na hodnotu RP [39, 40]. Doba iniciace tvorby póru klesá exponenciálně se zvyšujícím se elektrickým polem

a membránovým potenciálem. Doba uzavření póru však prakticky není závislá na síle elektrického pole. V simulacích se póry uzavírají během desítek až stovek nanosekund, jsou totiž nestabilní, pokud je indukovaný membránový potenciál malý nebo nulový. Při srovnání dob uzavření pórů v simulacích a experimentálně stanovených dob uzavření pórů je však vidět značný rozdíl, kdy MD simulace uvádějí časy až o 9 řádů menší než experimentální studie [5]. Tyto výsledky naznačují přítomnost dalších mechanismů, které ovlivňují proces elektroporace, zejména permeabilitu membrány po skončení pulzování.

2.2 Využití elektroporace

2.2.1 Genová transfekce

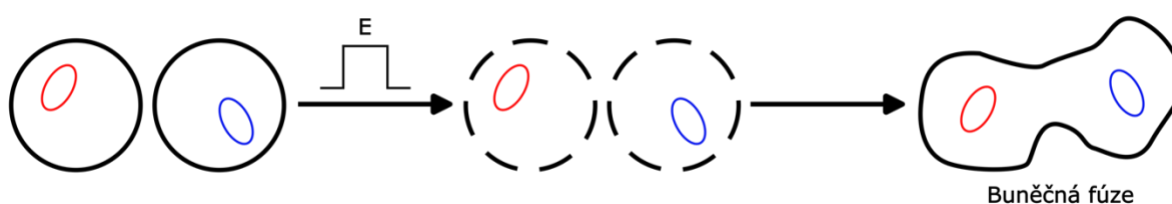
GET (gene electrotransfer) je metoda zavedení genetické informace do buňky reverzibilní elektroporací. Poprvé byla provedena v roce 1982, kdy byla dopravena plazmidová DNA do myších buněk [41]. Metoda může být provedena jak *in vitro*, tak *in vivo*. Mezi kritické parametry patří intenzita elektrického pole, délka pulzu, vodivost elektroporačního pufru, teplota, koncentrace a konformace DNA [4]. K transfekci *in vitro* se používají komerční elektroporační kyvety. Pro aplikace *in vivo* se používají alternativní elektrodové konfigurace, jako jsou například jehlové nebo pinzetové elektrody. Tvar pulzů je převážně obdélníkový, délky pulzů se pohybují mezi 100 μ s a 100 ms, intenzita elektrického pole mezi 100 a 1300 V/cm. Aby transfekce proběhla úspěšně, je nutné zajistit přítomnost DNA a elektrického pole simultánně. Většina pulzů, které vzniknou aplikací elektrického pole, není dostatečně velká pro průchod DNA. Zvýšením délky a počtu pulzů lze dosáhnout tvorby větších pórů, které mohou transport DNA realizovat. Zároveň v čase dochází ke koalescenci menších pórů do větších, schopných transportu DNA. Dále se předpokládá, že větší póry nejsou tak stabilní jako ty malé, takže po skončení elektroporace dochází k zániku všech pórů, které by mohly přenos DNA zprostředkovat [7]. Hlavní nevýhodou metody je efektivita. Při elektroporaci dochází k určitému poškození buněk, které může způsobit buněčnou smrt. Z tohoto důvodu se většinou používá vysoká koncentrace buněk. Transfekce reverzibilní elektroporací může být také využita k dopravě různých proteinů, například protilátek nebo CRISPR/Cas9 RNA-protein komplexů [9].



Obrázek 5 – Schéma GET: transfekce pomocí elektroporace umožní průchod plazmidové DNA do buňky, následuje transport DNA do jádra a genová exprese.

2.2.2 Elektrofúze buněk

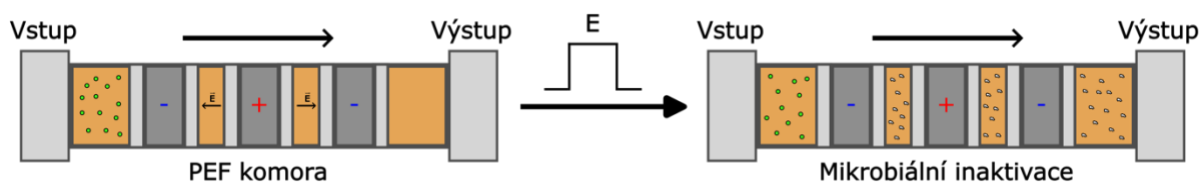
Buněčná fúze je přirozeně nebo uměle vyvolané spojení dvou buněk do jedné, která nese charakter obou buněk. Elektrofúze je efektivní metoda využívající krátkých vysokonapěťových pulzů k realizaci buněčné fúze. Byla poprvé provedena v roce 1979 fúzí rostlinných protoplastů pomocí elektrické stimulace [42]. V roce 1982 byla provedena elektrofúze β -lymfocytů s buňkami lidského myelomu za vzniku lidských hybridomových buněk, které se používají k produkci monoklonálních protilátek [43]. Výhodou elektrofúze je, že není nutné přidávat žádné chemické přísady. Výtěžek elektrofúze je ovlivněn parametry pulzů pro elektroporaci buněčné membrány, kvalitou kontaktu mezi danými buňkami, složením elektrofúzního pufru a typem buněk. Pro efektivní použití metody je žádoucí zachovat viabilitu buněk. Efektivní buněčná fúze je nezbytná pro produkci hybridomových buněk či buněčných vakcín. Právě elektrofúze představuje nadějnou metodu, která by mohla navýšit efektivitu těchto procesů [44].



Obrázek 6 – Schéma elektrofúze: elektroporace buněk může za vhodných podmínek vyvolat buněčnou fúzi.

2.2.3 Pulzní elektrické pole

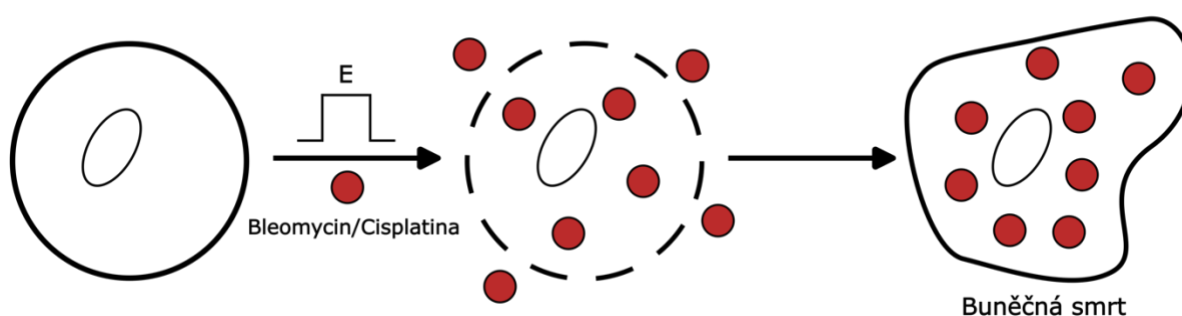
PEF (pulsed electric field) je jedním z novějších využití elektroporace v potravinářském průmyslu. PEF se z většiny používá k mikrobiální/enzymatické inaktivaci převážně kapalných potravin, jako jsou například ovocné šťávy, oleje nebo mléko. V podstatě se jedná o netermální pasterizaci, která s sebou přináší určité výhody, mezi které patří zejména zachování sensorického a nutričního profilu potraviny nebo energetické úspory. Mezi nevýhody metody patří uvolňování kovů v důsledku koroze elektrod, nehomogenní elektrické pole, změna struktury pevných potravin nebo tepelné změny. Právě strukturních a tepelných změn může být využito ke zlepšení extrakce šťáv a mikrobiální inaktivace, v některých případech však mohou být nežádoucí. Typický protokol pro PEF používá krátké elektrické pulzy dlouhé řádově v μs až ms . Aplikované elektrické pole se pohybuje v rozmezí 10 až 80 kV/cm . Jako u ostatních metod využívajících elektroporaci, parametry pulzů přímo ovlivňují výsledek procesu. PEF je i nadále předmětem výzkumu v kontextu prodloužení spotřební doby potravin, extrakce bioaktivních látek, modifikace škrobu, valorizace odpadů či potenciálního navýšení nutričních hodnot potravin [10, 13].



Obrázek 7 – Schéma PEF zpracování pomerančového džusu: znázorněné je ko-lineární uspořádání elektrod, silné elektrické pole způsobí nevratnou elektroporaci mikrobů (mikrobiální inaktivace).

2.2.4 Elektrochemoterapie

ECT (electrochemotherapy) je efektivní a cílený způsob ničení nádorů, který využívá elektroporace k transportu chemoterapeutických látek do nádorové buňky. V preklinických studiích se ukázalo, že bleomycin a cisplatina jsou nejvhodnějšími látkami pro ECT. Doprava těchto látek pomocí ECT má o více než 50 % větší účinnost, než jejich injekce do nádoru [1]. Obzvláště u bleomycinu lze pozorovat velmi výrazný nárůst cytotoxicity po aplikaci elektrických pulzů [45]. První klinické testy na lidech byly provedeny v roce 1991 [46]. Další studie z roku 2006 uvedla, že se jedná o *jednoduchou, vysoce efektivní, bezpečnou a cenově nenáročnou léčbu kožních a podkožních nádorů bez významných vedlejších účinků* [47]. V roce 2012 bylo v Evropské Unii ECT léčeno již více než 3000 pacientů. Výhodami metody jsou vysoká efektivita a potřeba velmi malých koncentrací chemoterapeutik, což snižuje toxicitu vůči organismu. Dnes se ECT používá k léčbě metastáz a primárních nádorů ve více než 130 centrech po Evropě [1].



Obrázek 8 – Schéma ECT: transfekce pomocí elektroporace umožní vstup chemoterapeutik do buňky, tyto cytotoxické látky vyvolají buněčnou smrt.

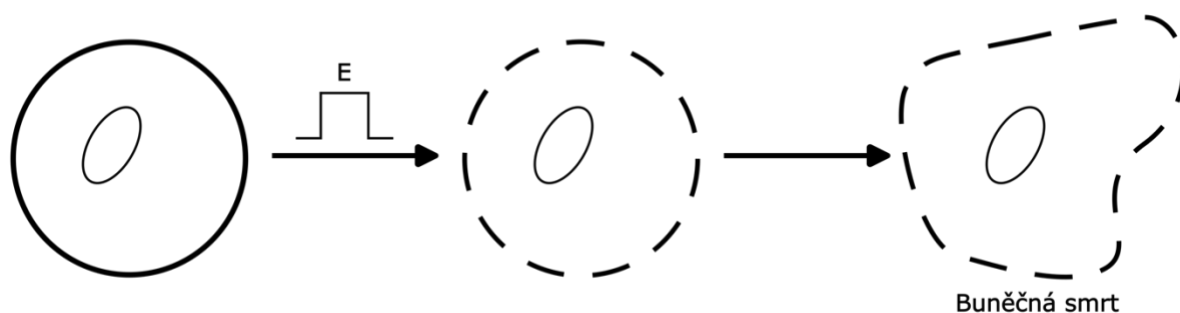
2.2.5 Ablace tkání

2.2.5.1 N-TIRE (Non-thermal irreversible electroporation)

Netermální ireverzibilní elektroporace je metoda ablace tkání. Aplikací vnějšího elektrického pole v podobě krátkých elektrických pulzů dochází k nevratnému poškození zacílených buněk a současnému zachování velkých cév a dalších tkáňových struktur. Výhodou této metody je, že nedochází k výrazným tepelným změnám během aplikace pulzů (efekt Joulova tepla) a poškození okolní tkáně. Pro její realizaci se používají pinzetové nebo jehlové elektrody, kterými se aplikují krátké unipolární pulzy nejčastěji o frekvenci 10 Hz a napětí v jednotkách kV. První zmínky o N-TIRE pocházejí z roku 2005, kdy bylo matematickým modelem předpovězeno, že metoda je schopna klinicky relevantní ablaci [48]. V roce 2007 byla úspěšně provedena první ireverzibilní elektroporace kožního nádoru implantovaného do myši [49]. V dalších letech bylo provedeno množství studií zabývajících se bezpečností N-TIRE a metoda našla využití pro ablací jak lidských, tak zvířecích nádorů. Jednou z nevýhod N-TIRE je, že vlivem silného elektrického pole dochází ke svalové kontrakci. Taktéž byl u některých pacientů pozorován vznik srdeční arytmie. Metoda je velmi úspěšná v ablaci nádorů rakoviny prostaty a slinivky, dosud však nebyla provedena úspěšná ablace plicního nádoru [1].

2.2.5.2 H-FIRE (High-frequency irreversible electroporation)

Vysokofrekvenční ireverzibilní elektroporace je v podstatě modifikací N-TIRE a rovněž se používá k ablaci tkání. H-FIRE je však perspektivnější, protože pulzování probíhá za vysokých frekvencí, takže nedochází ke svalové kontrakci (není potřeba podávat pacientovi paralytické činidlo). To vše při zachování stejné účinnosti ablace jako u N-TIRE [50]. H-FIRE rovněž vede k předvídatelnějším ablacím ve srovnání s N-TIRE [51]. Pro její realizaci se aplikují velmi krátké (0,25–5 μ s) bipolární pulzy o frekvenci až 500 kHz a napětí v jednotkách kV. Poměrně nedávno bylo zjištěno, že asymetrické vlny na rozdíl od energeticky ekvivalentních symetrických vln vykazují u H-FIRE nižší letální práh, k ablaci tak dochází již při mírnějších podmínkách [52].

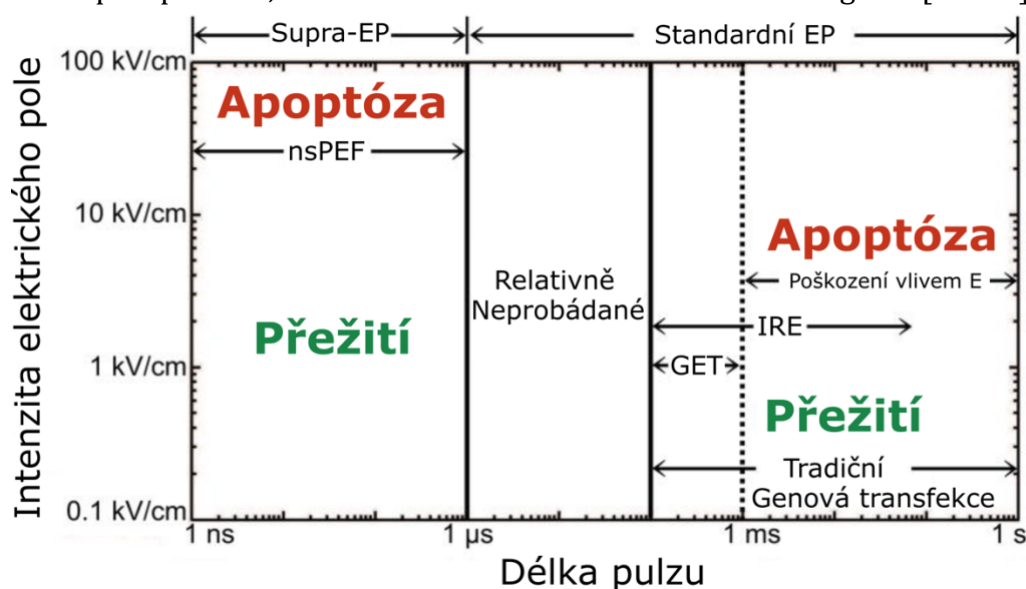


Obrázek 9 – Schéma IRE: aplikací intenzivních elektroporačních protokolů dochází k ireverzibilní elektroporaci, která je příčinou buněčné smrti.

2.3 Elektroporace v praxi

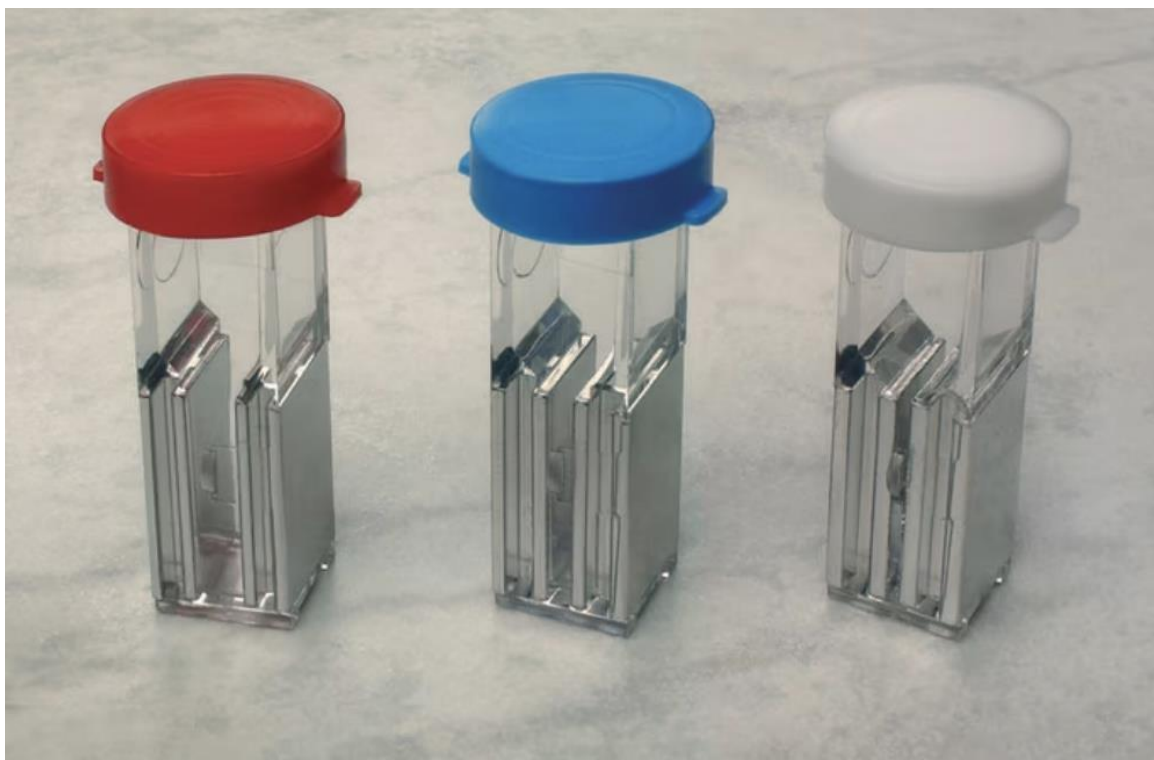
Elektroporace se provádí vysokonapěťovými generátory pulzů tzv. elektroporátory. Nejmodernější elektroporátory jsou schopny vyvinout napětí až 3000 V. Dostupnější elektroporátory zpravidla dosahují napětí alespoň 1000 V. Elektroporátor umožňuje úpravu mnoha parametrů pulzů, mezi ně patří například amplituda, délka, frekvence, polarita, počet nebo tvar pulzů.

Nejčastěji se používají unipolární obdélníkové pulzy, nabízí se i použití symetrických a asymetrických bipolárních pulzů, nebo pulzů s exponenciálním spádem. Právě tvar pulzů je jedním z důležitých faktorů ovlivňujících elektroporaci [53]. Například u H-FIRE bylo pozorováno, že asymetrické vlny na rozdíl od energeticky ekvivalentních symetrických vln vykazují nižší letální práh. K ablacii tedy dochází již při mírnějších podmínkách [52]. Amplituda a délka pulzů jsou nejkritičtějšími parametry pro elektroporaci a přímo ovlivňují její výsledek, zejména pak viabilitu buněk. Amplitudy pulzů se pohybují v řádech desítek až tisíců voltů. Využívá se délek pulzů řádově v rozmezí mikrosekund až desítek milisekund. Výjimkou je tzv. supra-elektroporace tj. elektroporace nanosekundovými pulzy. U konvenční elektroporace dochází k tvorbě pórů různých velikostí a jejich expanzi, zatímco u supra-elektroporace k velkému množství malých pórů, které si uchovávají svoji velikost, zároveň se na základě MD simulací předpokládá, že dochází k narušení intracelulárních organel [54–56].



Obrázek 10 – Mapa osudu buněk po elektroporaci v závislosti na intenzitě aplikovaného elektrického pole a délce pulzů. Přeloženo z [56].

In vitro reverzibilní elektroporace je nejčastěji prováděna v komerčně dostupných elektroporačních kyvetách. Kyvety jsou standardně dostupné ve třech velikostech: 0,1, 0,2 a 0,4 cm; hodnoty udávají vzdálenost mezi elektrodami, takže spolu s napětím definují velikost elektrického pole (V/cm). Výrobci neuvádějí přesné prvkové složení elektrod v kyvetách, uvádí se však, že materiálem je hliník. Kyvety jsou využívány zejména pro hromadnou reverzibilní elektroporaci, kde je cílem dopravit do buněk v suspenzi například DNA, RNA, léčiva nebo proteiny.



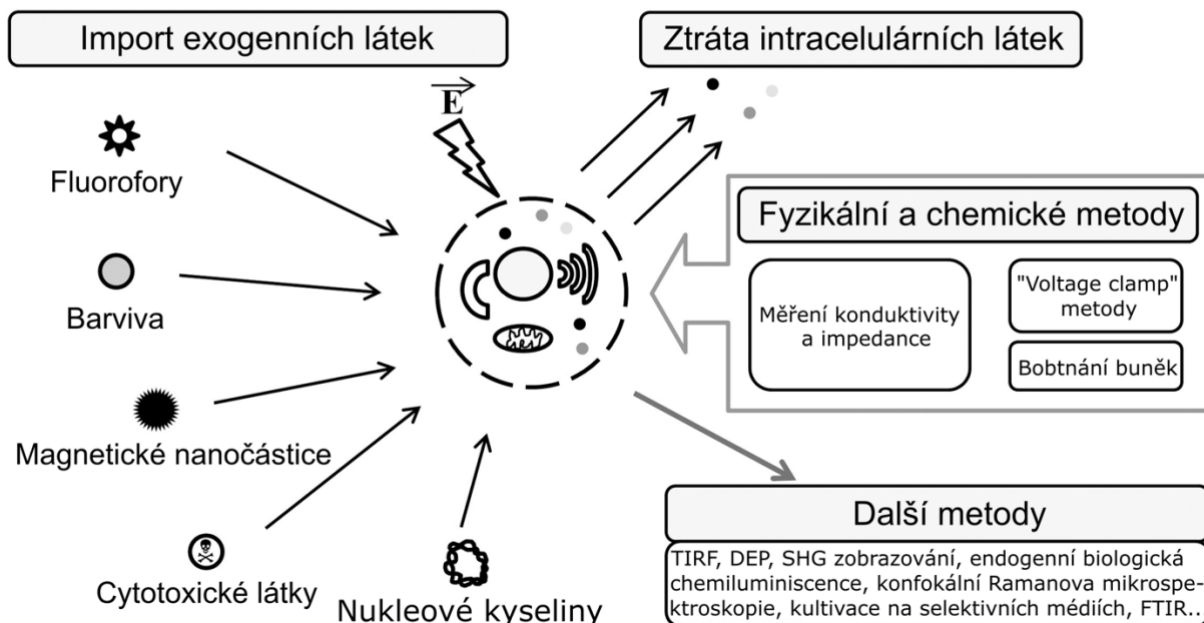
Obrázek 11 – Elektroporační kyvety (Sigma Aldrich). Zleva: 0,4 cm; 0,2 cm; 0,1 cm [57].

Alternativní přístup je potřeba k tzv. „single cell electroporation“, v překladu „elektroporace jedné buňky“. Využívá například mikrofluidní kanálky, nanosondy či mikromanipulátory, a za použití fluorescenčního mikroskopu může být elektroporace jedné buňky pozorována v čase [58, 59]. Tento typ elektroporace pro svou specifitu vyžaduje výrobu vlastního zařízení, neexistuje totiž komerčně dostupný systém pro provedení elektroporace jedné buňky.

Dalším důležitým faktorem pro elektroporaci je volba elektroporačního pufru. Obecně spadají do několika kategorií: na bázi fyziologického roztoku, fosfátu, HEPES nebo média pro buněčné kultury. Vodivost je upravena přidanými solemi a osmolalita osmotickým činidlem. Elektroporační pufry by měly mít nízkou vodivost, aby došlo k minimálnímu zahřívání vlivem Joulova tepla. Složení pufru výrazně ovlivňuje účinnost elektroporace a viabilitu buněk, je tedy třeba jej zhodnotit při optimalizaci elektroporačního protokolu [60].

Existují různé metody detekce elektroporace, které můžeme rozdělit do několika skupin. Jedná se o metody založené na importu exogenních látek nebo na úniku intracelulárních látek a jejich následné detekci, fyzikální a chemické, nebo ne tak obvyklé přístupy, mezi které spadá například měření chemiluminiscence [61]. Jednou z nejpoužívanějších metod je měření fluorescence pomocí nepermeabilního fluoroforu, který navýší svou fluorescenci až při kontaktu s intracelulární molekulou (DNA, RNA, ...). Další, velmi jednoduchou metodou je měření impedance před a po elektroporaci. Z impedančního spektra se dá zjistit vodivost elektrolytu, která během elektroporace stoupá. Příčinou je ztráta intracelulárních látek, hlavně iontů, které následně zvyšují vodivost elektroporačního pufru. Z rozdílu impedance před a po elektroporaci tak můžeme stanovit úroveň permeabilizace. Různé metody detekce elektroporace jsou uvedeny na následujícím schématu (Obrázek 12):

Různé metody detekce elektroporace buněčných membrán



Obrázek 12 – Různé metody detekce elektroporace *in vitro*. Přeloženo z [61].

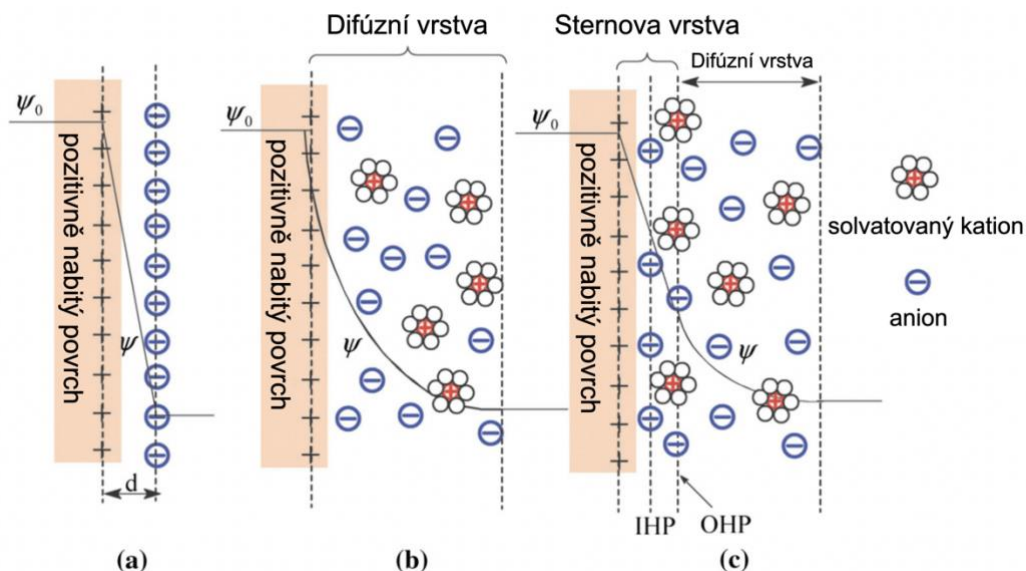
Ztráta intracelulárních molekul během elektroporace má mimo jiné efekt i na viabilitu buněk [62]. Viabilita je hlavním problémem reverzibilní elektroporace, protože obvykle dochází k vysoké úmrtnosti buněk. Efektivní elektroporace je obvykle podmíněna výrazným množstvím mrtvých buněk, proto se používají vysoké koncentrace buněk. Elektroporace může způsobit hned několik typů buněčné smrti. Hlavními typy jsou apoptóza a nekróza, za zmínění však stojí i nekropoptóza a pyroptóza, které patří mezi imunogenní typy buněčné smrti. Typ buněčné smrti závisí na parametrech pulzů, typu buněk/tkáně, způsobu provedení a celkových podmínkách při elektroporaci. Bylo prokázáno, že při elektroporaci dochází k peroxidaci lipidů a obecně oxidativnímu poškození buněčné membrány vlivem ROS, poškození membránových proteinů, ztrátě intracelulárních látek a dalším primárním i sekundárním procesům (tepelné změny, ...), které ovlivňují viabilitu buněk [63].

2.4 Faradaické a kapacitní procesy přenosu náboje

V elektrochemii existují dva typy procesů, které mohou probíhat na elektrodě. Jedná se o procesy faradaické a kapacitní (nefaradaické). Oba procesy mohou současně probíhat během elektrodových reakcí. Mezi těmito procesy však existují jasné rozdíly, které byly popsány D.C. Grahamem již v roce 1952 [64].

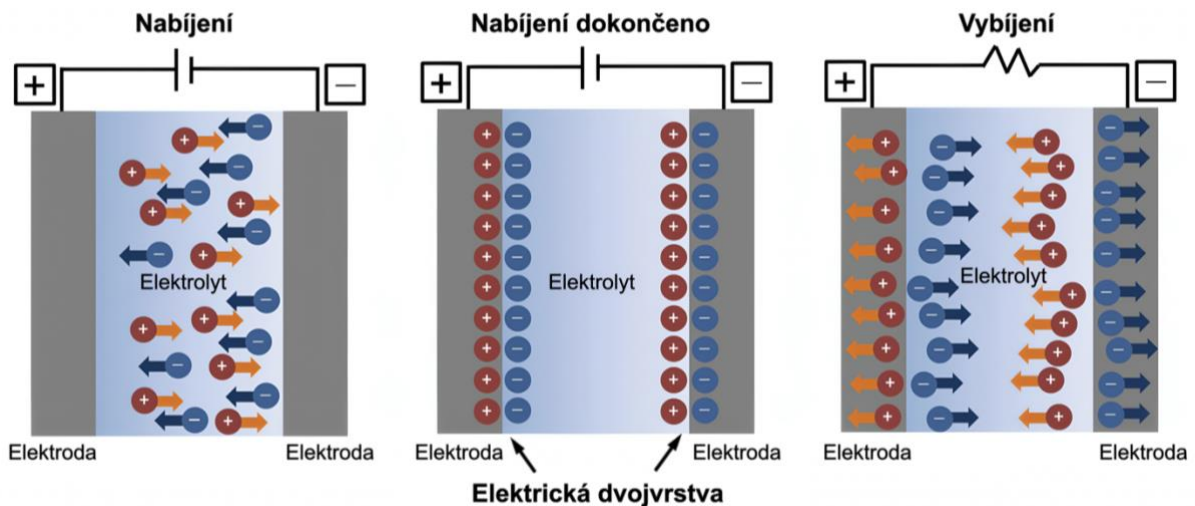
2.4.1 Kapacitní přenos náboje

Pokud dochází čistě ke kapacitnímu přenosu náboje, rozhraní elektroda-elektrolyt může být považováno za jednoduchý elektrický kondenzátor s nábojovou dvojrivrstvou (EDLC). Vznik takového kondenzátoru je podmíněn jevem elektrické dvojrivrstvy.



Obrázek 13 – Tři základní modely elektrické dvojrivrstvy: (a) Helmholtzův model, (b) Gouy-Chapmanův model, (c) Sternův model, který zobrazuje vnitřní Helmholtzovu rovinu (IHP) a vnější Helmholtzovu rovinu (OHP). IHP odpovídá vzdálenosti nejbližších specificky adsorbovaných iontů. OHP odpovídá nespecificky adsorbovaným iontům, zároveň zde začíná difúzní vrstva. d odpovídá šířce dvojrivrstvy popsané Helmholtzovým modelem. ψ_0 a ψ jsou potenciály na povrchu elektrody a na rozhraní elektroda-elektrolyt. Přeloženo z [65].

Elektrická dvojrivrstva vzniká na rozhraní jakýchkoli dvou vodivých fází, v této práci se jedná o rozhraní elektroda-elektrolyt. Obecně nese jedna z fází kladný povrchový náboj, který je vyrovnán nábojem druhé fáze o stejné velikosti a opačné polaritě. Kladně nabitá elektroda tak z elektrolytu přitahuje záporně nabitě ionty, přičemž odpuzuje ionty kladně nabitě. Obdobný, ale obrácený případ nastává u záporně nabitě elektrody. Tento proces se označuje jako „nabíjení“. Pokud dojde k odnětí vnějšího napětí, ionty se uvolní od povrchu elektrody, takový proces se nazývá „vybíjení“. Při kapacitních procesech dochází pouze k nabíjení a vybíjení elektrické dvojrivrstvy. Pokud při kapacitních procesech teče proud (pouze při nabíjení), dochází k postupnému ukládání náboje. To se děje, protože ionty a jiné molekuly nemohou opustit povrch elektrody. Na rozhraní elektroda-elektrolyt nedochází při kapacitních procesech k přenosu elektronů, nevznikají tedy produkty elektrochemických reakcí [65–67].



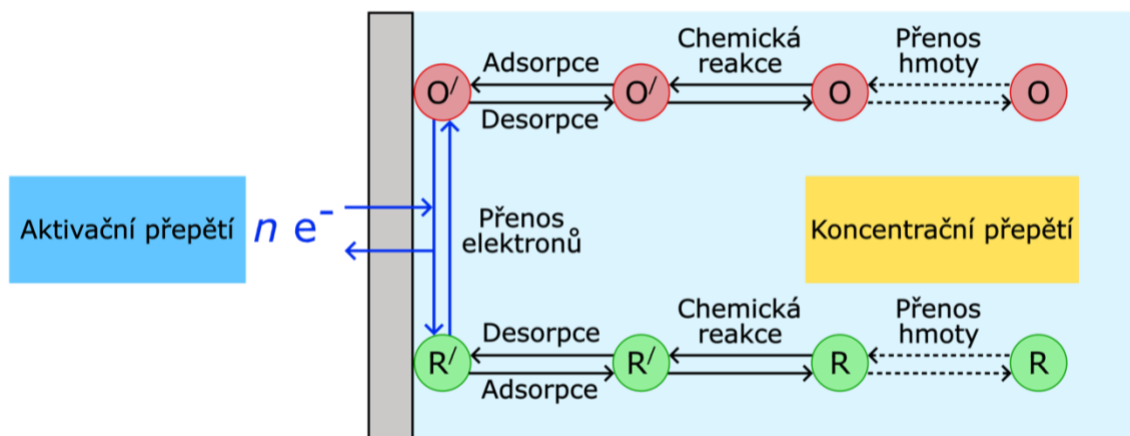
Obrázek 14 – Znárodnění procesu nabití a vybití elektrické dvojvrstvy – EDLC (elektrického kondenzátoru s dvojitou vrstvou). Přeloženo z [65].

2.4.2 Faradaický přenos náboje

Druhým způsobem přenosu náboje z elektrody do elektrolytu mohou být faradaické procesy oxidace a redukce, při kterých dochází k přenosu elektronů mezi dvěma fázemi. Redukce, která vyžaduje přidání elektronu, probíhá na záporné elektrodě, zatímco oxidace, která vyžaduje odebrání elektronu, probíhá na kladné elektrodě. Na rozdíl od kapacitních procesů jsou faradaické procesy příčinou tvorby elektrochemických produktů v elektrolytu.

Faradaické reakce mohou být reverzibilní nebo ireverzibilní, což závisí na dvou parametrech: kinetice přenosu elektronů na rozhraní a přenosu hmoty k rozhraní. Pro dané rozhraní elektroda-elektrolyt existuje rovnovážný potenciál, který odpovídá stavu, kdy rozhraním neprotéká žádný proud. Při potenciálech blízkých rovnováze je rychlost reakce řízena kinetikou přenosu elektronů (potenciálem) a není limitována difúzí reaktantů k povrchu elektrody. Při potenciálech vzdálených rovnovážnému potenciálu je rychlost reakce řízena přenosem hmoty, tedy difúzí reaktantů k povrchu elektrody.

Reverzibilita reakce závisí na poměru mezi přenosem elektronů na rozhraní a přenosem hmoty. Faradaická reakce s velmi rychlou kinetikou přenosu elektronů (oproti přenosu hmoty) bude reverzibilní. Jestliže produkt elektrochemické reakce neopouští povrch elektrody velmi rychle (oproti kinetice přenosu elektronů), může se změnou směru proudu jeho část přeměnit zpět na reaktant. Faradaická reakce s velmi pomalou kinetikou přenosu elektronů vyžaduje vysoký potenciál, aby došlo k limitaci difúzí reaktantů. V takovém případě reaktanty rychle difundují k povrchu elektrody a produkty zase od povrchu elektrody. Jelikož produkt rychle opouští povrch elektrody, nedochází k uskladňování náboje, není tak možné změnou směru proudu převést produkt na původní reaktant [66, 67].

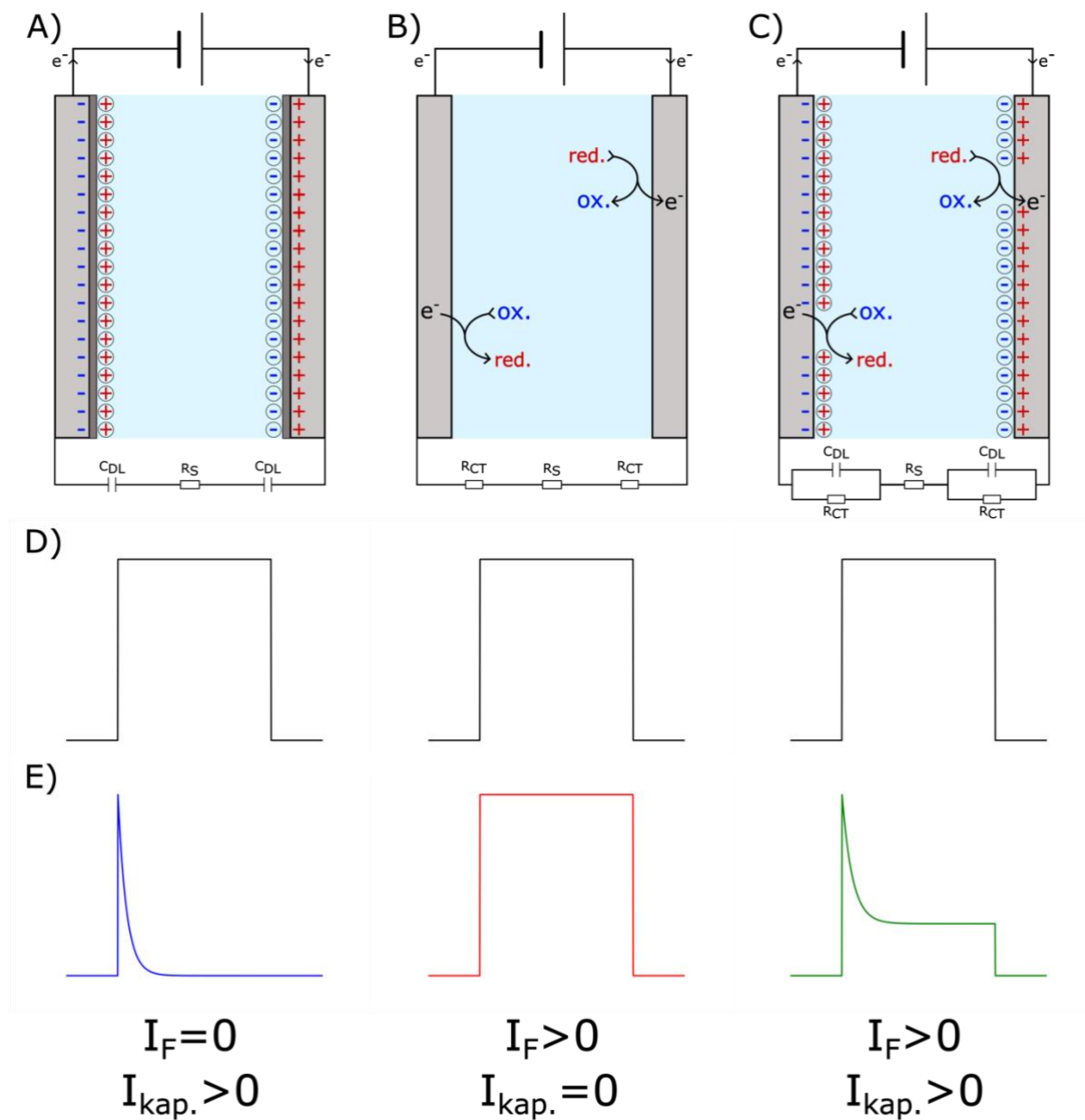


Obrázek 15 – Znázornění dějů ovlivňujících kinetiku elektrochemické reakce. R/O označuje redoxní pár. Jestliže je rychlost reakce řízena kinetikou přenosu elektronů na rozhraní elektroda-elektrolyt, mluvíme o tzv. aktivačním přepětí/polarizaci (modrá). Pokud je rychlost reakce řízena difúzí reaktantů k povrchu elektrody, mluvíme o tzv. koncentračním přepětí/polarizaci (žlutá).

2.4.3 Ekvivalentní obvod pro znázornění kapacitních a faradaických procesů

Faradaické a kapacitní procesy mohou být modelovány pomocí standardních elektrických komponentů, vzniklý obvod pak nazýváme ekvivalentním. Rozhraní elektroda-elektrolyt může být popsáno pomocí kondenzátoru s kapacitancí C_{DL} . Paralelně je pak zapojen rezistor, který odpovídá odporu přenosu náboje R_{CT} . Odpor elektrolytu odpovídá rezistoru R_s .

- Při ideálně kapacitních procesech dochází vlivem vnějšího zdroje napětí k přenosu iontů k povrchu elektrod a k ustanovení elektrické dvojvrstvy, kterou je možné modelovat jako kondenzátor. Povrch elektrod je pokrytý vrstvou dielektrika, například Al_2O_3 , obdobně jako desky kondenzátoru. Ekvivalentní obvod pro kapacitní procesy se tak skládá ze dvou kondenzátorů odpovídajících elektrické dvojvrstvě na obou elektrodách a sériově zapojeného rezistoru, který odpovídá odporu elektrolytu. Jakmile aplikujeme napěťový pulz, obvodem proud protéká pouze do nabití kondenzátoru, po jeho nabití proud exponenciálně klesá k nule. Při kapacitních procesech nedochází k elektrochemickým reakcím, tedy přenosu elektronů na rozhraní elektroda-elektrolyt.
- Při ideálně faradaických procesech nedochází (nebo jen velmi málo) vlivem vnějšího zdroje napětí k ustanovení elektrické dvojvrstvy. Ekvivalentní obvod pro faradaické procesy tak můžeme vyjádřit jako tři sériově zapojené rezistory, z nichž dva představují odpor přenosu náboje na elektrodách a poslední odpor elektrolytu. Proud, který obvodem protéká skrze odpor přenosu náboje je konstantní. Důsledkem jsou redoxní reakce na povrchu elektrod, doprovázené vznikem produktů elektrochemických reakcí.
- Při reálných podmínkách probíhají kapacitní i faradaické procesy souběžně. Ekvivalentní obvod tak můžeme vyjádřit jako kondenzátor, který představuje elektrickou dvojvrstvu, paralelně zapojený s rezistorem, který představuje odpor přenosu náboje, pro elektrody. V sérii je pak rezistor, který představuje odpor elektrolytu. Po aplikaci napěťového pulzu proud protéká nejdříve skrze kondenzátor, jakmile dojde k jeho nabití, proud poteče skrze odpor přenosu náboje, důsledkem jsou elektrochemické reakce. Celkový proud se tak skládá z kapacitní a faradaické složky.



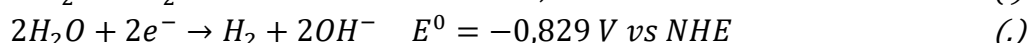
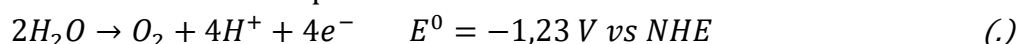
Obrázek 16 – Ekvivalentní obvod: A) ideálně kapacitních, B) ideálně faradaických a C) reálných procesů. D) představuje napěťový pulz a E) odpovídající čistě kapacitní (modrá), čistě faradaický (červená) a reálný (zelená) proud s kapacitní a faradaickou složkou. I_F představuje faradaický proud a $I_{kap.}$ kapacitní proud.

2.4.4 Možné faradaické reakce během elektroporace

Konvenční elektrochemie se obvykle zabývá potenciály řádově v jednotkách voltů. Při elektroporaci se však dostáváme k mnohem vyšším hodnotám, stovkám až tisícům voltů. Při takto vysokých potenciálech může dojít k překonání termodynamických bariér u reakcí, které by za podmínek konvenční elektrochemie probíhat nemohly, nebo jen velmi omezeně.

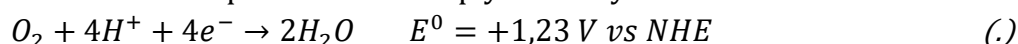
2.4.4.1 Elektrolýza vody

Elektrolýzou vody může docházet ke vzniku plynného kyslíku a okyselení elektrolytu, nebo ke vzniku plynného vodíku a alkalizaci elektrolytu, obě reakce jsou tak příčinami změn pH. Reakcí dvou hydroxylových radikálů může zároveň vznikat peroxid vodíku, který je jedním z hlavních témat této práce.

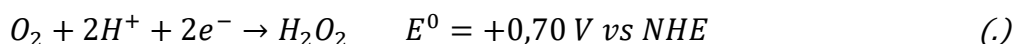


2.4.4.2 Redukční reakce kyslíku (ORR)

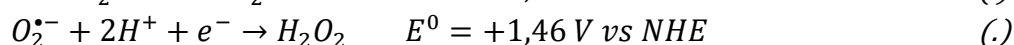
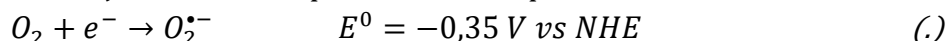
Princip ORR je v přenosu jednoho či více elektronů na kyslík, který může vést ke vzniku ROS. Čtyř-elektronová reakce spočívá v redukci plynného kyslíku na vodu:



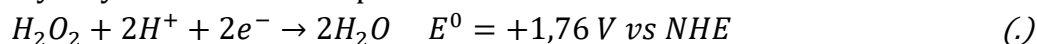
Kromě čtyř-elektronové cesty je také možnost redukovat kyslík na peroxid vodíku dvou-elektronovou reakcí:



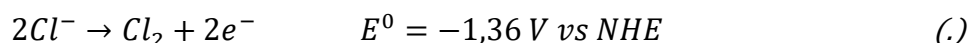
Obě reakce lze termodynamicky popsat pomocí standardního elektrodového potenciálu E^0 . Čím vyšší je E^0 , tím termodynamicky výhodnější je daná reakce. Aby reakce proběhla, elektrodový potenciál musí být menší než E^0 . Termodynamicky výhodnější reakcí je tedy čtyř-elektronová redukce kyslíku, protože její standardní elektrodový potenciál je vyšší než u dvou-elektronové. Je však důležité zmínit, že tyto hodnoty E^0 platí pouze pro standardní podmínky, kdy předpokládáme, že všechny složky mají koncentraci 1 M. Při fyziologických podmínkách je produkce peroxidu vodíku dvou-elektronovou cestou termodynamicky srovnatelná se čtyř-elektronovou [68]. U dvou-elektronové se však jedná o kineticky výhodnější reakci, protože jsou potřeba jen dva páry proton-elektron [69]. Peroxid vodíku mimo jiné vzniká i nepřímou dvoustupňovou cestou:



Může zároveň docházet ke ztrátě peroxidu vodíku. Jedná se o jeho dvou-elektronovou redukci na vodu. Reakce je termodynamicky velmi výhodná, takže abychom ztrátě peroxidu vodíku předešli, používáme materiály selektivní pro jeho tvorbu. K této reakci dochází až při vysokých koncentracích peroxidu vodíku.



2.4.4.3 Oxidace chloridů



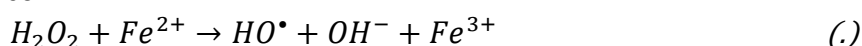
Oxidací chloridů vzniká plynný chlór, který reakcí s vodou tvoří chlornany, které jsou mimo jiné pro své antimikrobiální účinky hlavní součástí komerčního čistícího prostředku SAVO. Reakce rovněž způsobuje změnu pH.

2.4.4.4 Rozpouštění elektrod

Elektrody se během elektroporace mohou rozpouštět do elektrolytu a negativně tak ovlivnit její výsledek. Některé ionty kovů jsou totiž pro buňky toxické, například Cu^{2+} ionty mohou zapříčinit zvýšenou tvorbu intracelulárních ROS a negativně tak ovlivnit viabilitu buněk [70]. Třeba u ocelových elektrod může docházet k jejich rozpouštění a uvolnění různých kovových iontů M^{m+} , mezi které patří i Fe^{3+} ionty. Železité ionty mohou dále figurovat v reakcích vedoucích ke vzniku ROS, prvním krokem je pak Haber-Weissova reakce:



kdy jsou redukovány železité ionty na železnaté ionty superoxidovým anionem, druhým krokem je Fentonova reakce:



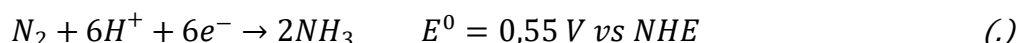
při které dochází k reakci peroxidu vodíku s železnatými ionty, které fungují jako katalyzátor. Produktem jsou velmi reaktivní hydroxylové radikály. Katalyzátorem však nemusí být Fe^{2+} , mezi Fentonovy kovy se například řadí i měď, kobalt či titan [71].

2.4.4.5 Redukční reakce dusíku (NRR)

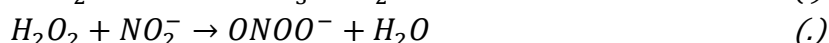
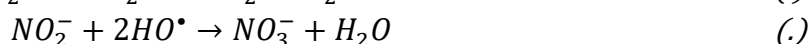
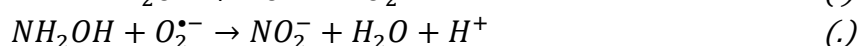
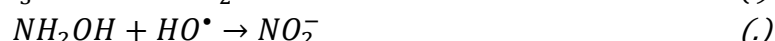
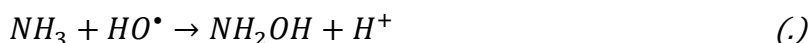
Dusík je tzv. inertní plyn, který za normálních podmínek velmi obtížně reaguje. Amoniak se průmyslově vyrábí Haber-Boschovou syntézou:



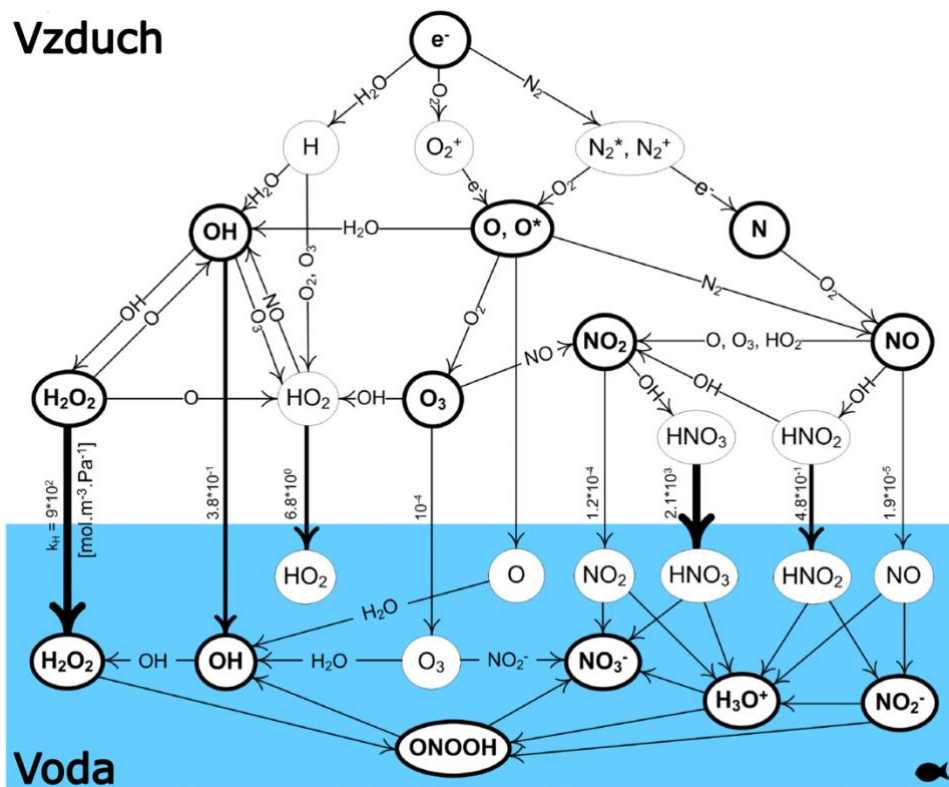
Tento proces je však finančně a energeticky náročný. Alternativou je elektrochemická redukce dusíku na amoniak:



reakce má však pomalou kinetiku a nízkou faradaickou účinnost kvůli konkurenci s tvorbou vodíku. K navýšení účinnosti procesu je proto nutné do reakce zakomponovat katalyzátor. Najít optimální katalyzátor je momentálně hlavním cílem výzkumu NRR, proto zatím není elektrochemická výroba NH_3 provozována na průmyslovém měřítku [72, 73]. Je možné, že při elektroporaci dochází k redukci dusíku na amoniak, který může reagovat s biomolekulami nebo se účastnit rekombinačních reakcí s ROS:



může tak docházet k současné tvorbě reaktivních forem dusíku a okyselení elektrolytu. Všechny uvedené ionty a molekuly patří mezi tzv. reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS), které jsou předmětem zájmu například ve výzkumu interakcí nízkoteplotního plazmatu a kapalin [74]. V případě, že by docházelo k jejich produkci během elektroporace, mohly by pro své oxidativní účinky ovlivnit její výsledek.



Obrázek 17 – Schéma interakcí různých reaktivních forem generovaných vzdušným plazmatem na rozhraní plyn-kapalina. Přenos jednotlivých reaktivních forem na rozhraní je definován specifickým koeficientem rozpustnosti dle Henryho zákona. Nejdůležitější reaktivní formy jsou zvýrazněny tučně. Přeloženo z [74]. Vzájemné interakce v kapalném prostředí (modrá) představují potenciální reakce, které se mohou odehrávat v elektrolytu při elektroporaci.

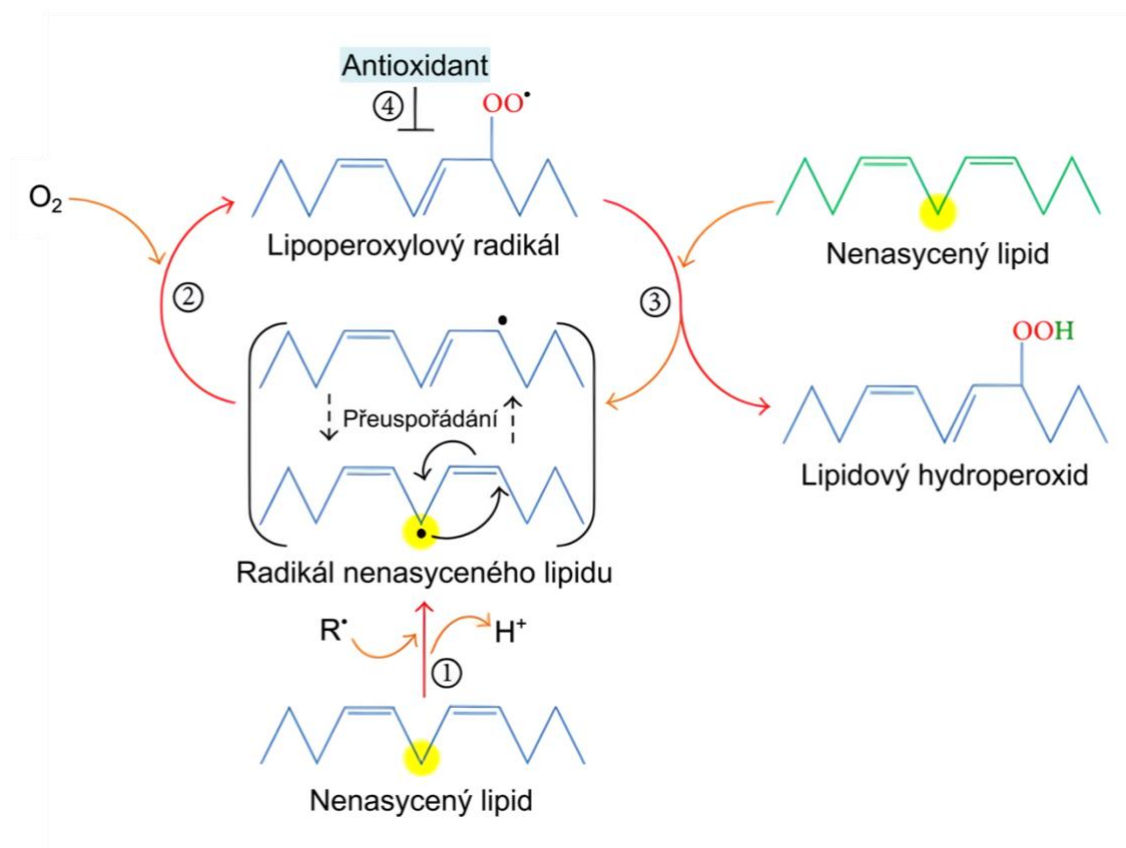
2.4.5 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

ROS jsou vysoce reaktivní sloučeniny odvozené od kyslíku, vody nebo peroxidu vodíku, přičemž se zmíněný H_2O_2 řadí mezi neradikálové ROS. Řadí se zde například superoxidový anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydroxylový radikál (OH^{\bullet}) nebo peroxid vodíku (H_2O_2) [75]. Jsou přirozenými produkty oxidativního metabolismu mitochondrií nebo buněčné odpovědi na přítomnost xenobiotik, cytokinů nebo invazivních bakterií [76–78]. V živých systémech mají hlavní účel jako signální molekuly, což se týká hlavně peroxidu vodíku (H_2O_2) a superoxidového anionu ($\text{O}_2^{\bullet-}$) [79]. Zároveň stimulují buněčné dělení a apoptózu, svým způsobem tak přispívají k přirozenému procesu stárnutí. Jejich nadměrná koncentrace je spojována s oxidativním stresem a to zejména na molekulární a buněčné úrovni, kde mohou poškozovat různé biomolekuly, jako jsou například proteiny, lipidy, sacharidy či nukleotidy [75]. Obranným systémem proti ROS mohou být enzymatické i neenzymatické antioxidanty. Mezi neenzymatické patří například vitamin C, vitamin E, β -karoten nebo různé flavonoidy či karotenoidy s antioxidačními schopnostmi. Mezi enzymatické se řadí superoxid dismutáza, kataláza nebo peroxidáza [80]. V kontextu elektroporace a ROS bylo zjištěno, že elektrodový materiál má vliv na účinnost elektroporace. Právě Fentonovy kovy, jako měď a ocel, byly producenty vysokých množství ROS, které pozitivně ovlivňovaly účinnost elektroporace [81].

2.4.6 Peroxidace lipidů

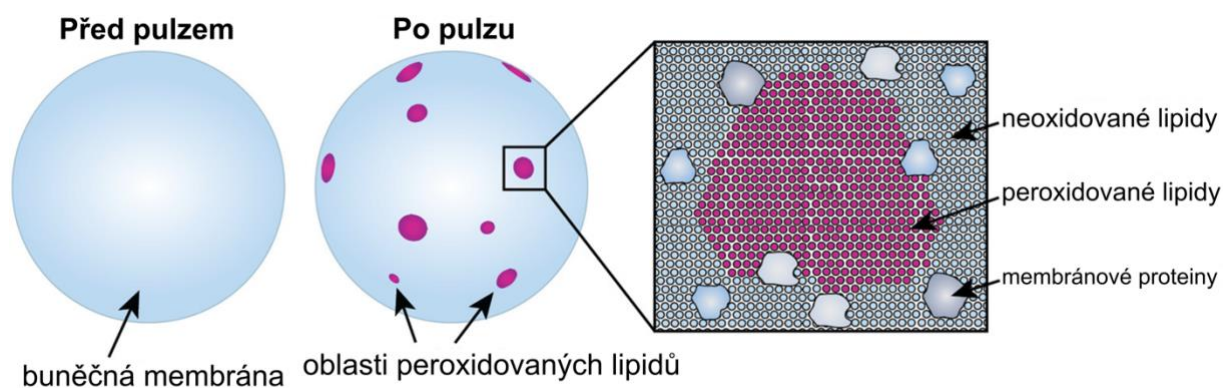
Jedná se o oxidativní degradaci lipidů volnými radikály, která nejvíce postihuje nenasycené mastné kyseliny, jež jsou součástí fosfolipidů buněčných membrán. Může být příčinou poškození buněčné membrány, buněčného stárnutí nebo buněčné smrti [82]. Peroxidace lipidů je radikálovou řetězovou reakcí, kde prvním krokem je iniciace, při které volný radikál, například OH^{\bullet} , atakuje řetězec nenasycené mastné kyseliny. Vzniká

lipidový radikál a následuje krok propagace, kdy radikál mastné kyseliny rychle reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku lipoperoxylového radikálu (LOO^\bullet). Ten může reagovat s dalším lipidem za vzniku nového lipidového radikálu (L^\bullet), jeden volný radikál tedy může poškodit vícero lipidů. Propagace pokračuje, dokud nedojde k terminaci spotřebou substrátu nebo reakcí dvou radikálů [83, 84]. Hlavním produktem peroxidace lipidů jsou lipidové hydroperoxydy (LOOH), které jsou rovněž substrátem pro řadu enzymů a mohou podstoupit různé sekundární reakce [85]. Mezi další produkty patří například radikály alkoxylové (LO^\bullet), epoxy-peroxylové (OLOO^\bullet) a další [86, 87].



Obrázek 18 – Mechanismus peroxidace nenasyceného lipidů iniciované hydroxylovým radikálem. Přeloženo z [87].

Jak již bylo zmíněno, předpokládá se, že peroxidace lipidů přispívá k permeabilizaci buněčné membrány během elektroporace a bývá rovněž spojována s přetrvávající permeabilizací po skončení elektroporace [22–28, 88, 89]. Existuje však jedna studie, která spojení oxidace lipidů s přetrvávající permeabilizací po elektroporaci vyvrací [90]. Předpokládá se však stále, že působením ROS během elektroporace dochází ke vzniku nestabilních peroxidovaných oblastí na povrchu buněčné membrány, které přispívají ke vzniku pórů [22].



Obrázek 19 – Znárodnění nestabilních peroxidovaných lipidů na povrchu buněčné membrány. Přeloženo z [22].

V MD simulacích bylo rovněž pozorováno, že pouhá oxidace lipidů v buněčné membráně vede ke zvýšení permeability [91, 92]. Jedna ze zmíněných studií porovnávala efekt oxidace lipidů na permeabilitu buněčné membrány mezi normálními a nádorovými buňkami. Bylo zjištěno, že efekt oxidace lipidů je výraznější v systémech bez cholesterolu, přičemž právě membrány nádorových buněk obsahují menší množství cholesterolu [91]. Perspektivní pro metody ablace nádorů (N-TIRE a H-FIRE) by tedy mohly být materiály, které při pulzování produkují vysoká množství ROS. Takové materiály by teoreticky mohly navýšit účinnost ablace.

3 Experimentální část

3.1 Cíl práce

Cílem práce je zjistit, jaký vliv mají faradaické procesy na účinnost elektroporace, přičemž pozornost je věnována zejména redukčním reakcím kyslíku – tvorbě ROS a jejich efektu na elektroporaci. Kvantifikací peroxidu vodíku po aplikaci standardního elektroporačního protokolu na standardní elektroporační pufr je nutné vybrat vhodné materiály pro experimenty s buňkami. Hypotéza je, že anodizací elektrod, tedy vytvořením tenké vrstvy dielektrika na povrchu elektrody, je možné snížit produkci ROS během pulzování. Porovnáním elektroporace mezi tradičními faradaickými a anodizovanými kapacitními elektrodami lze vyvodit efekt ROS na účinnost elektroporace.

3.2 Seznam použitých chemikálií

Chemikálie	CAS	Dodavatel
3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin	54827-17-7	Sigma Aldrich
Aceton	67-64-1	Microchemicals
Chlorid hořečnatý hexahydrát	7791-18-6	Penta chemicals
Chlorid vápenatý dihydrát	10035-04-8	Penta chemicals
Citronan sodný dihydrát	6132-04-3	Penta chemicals
DBSA	121-65-3	Sigma Aldrich
Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát	10049-21-5	Sigma Aldrich
DMSO	67-68-5	Sigma Aldrich
Ethanol 96%	64-17-5	Severochema
Gibco™ YPD tekuté médium		Thermo Scientific
GOPS	2530-83-8	Sigma Aldrich
HEPES	7365-45-9	Sigma Aldrich
Hydrogenfosforečnan sodný heptahydrát	7782-85-6	Sigma Aldrich
Hydroxid sodný	1310-73-2	Penta chemicals
Isopropanol	67-63-0	Microchemicals
Křenová peroxidáza, typ I	9003-99-0	Sigma Aldrich
Kyselina citrónová	5949-29-1	BS vinařské potřeby
Peroxid vodíku	7722-B4-1	Sigma Aldrich
ROTI®Fair PBS 7.4, tablety		Carl Roth
PEDOT:PSS	126213-51-2	Heraeus
Propidium jodid min. 95%, p.a.	25535-16-4	Carl Roth
Sacharóza, ultrapure, 99%	57-50-1	Thermo Scientific

3.3 Seznam použitých přístrojů

CNC frézka CauCau KOMPAS F1000

3D tiskárna Raise3D E2

3D tiskárna Prusa i3 MK3S+

Spektrofotometr BioTek Synergy H1

Inkubátor s třepáním Yihder LM-420D

Centrifuga PHOENIX Instrument CD-0506

Centrifuga Biofuge Stratos

Počítadlo buněk Beckman Coulter Cell Counter-Z2

pH metr Thermo Scientific Orion Star A111

pH metr Hanna Instruments Multimetr EDGE

Konduktometr Mettler Toledo SevenCompact S230

Elektroporátor Leroy-Biotech ELECTROcell B12

Elektroporátor Leroy-Biotech ELECTROcell B15

Osciloskop PicoScope 4262

Osciloskop GW Instek GDS-2202E

Proudová sonda Instrance ICP5150

Napěťová sonda P5100

Potenciostat IVIUM Technologies VERTEX ONE

Měřič LCR B&K PRECISION BK891

Napájecí zdroj VOLTcraft LSP-1165

Zdroj Keithley 238 HIGH CURRENT SOURCE MEASURE UNIT

Zdroj KEYSIGHT E36313A

Mikroskop Kern OKO 178

Fluorescenční mikroskop Nanolive 3D Cell Explorer-fluo

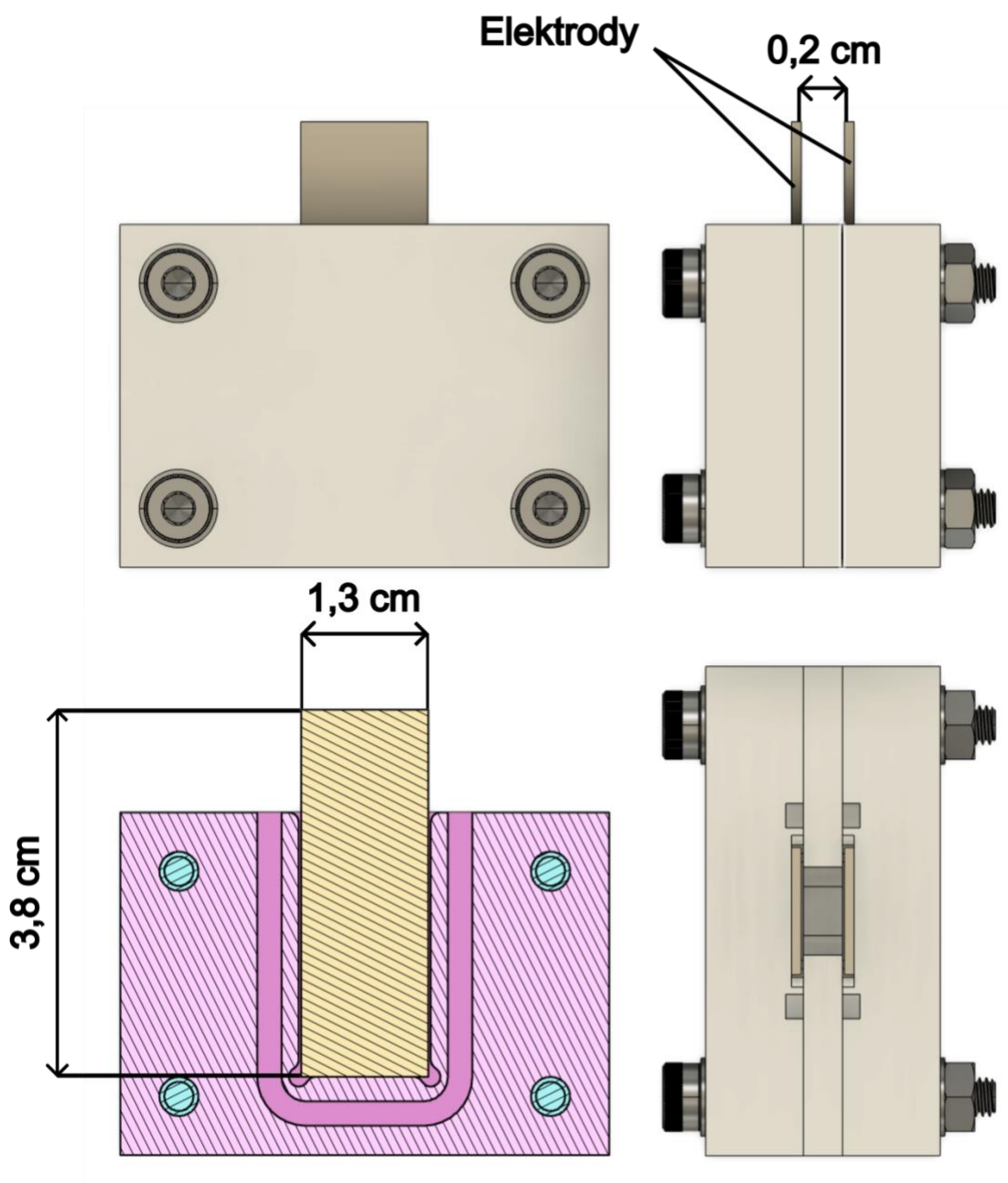
Skenovací elektronový mikroskop FEI Verios 460L

XRF analyzátor Olympus Vanta VCR

3.4 Návrh a výroba elektroporační cely

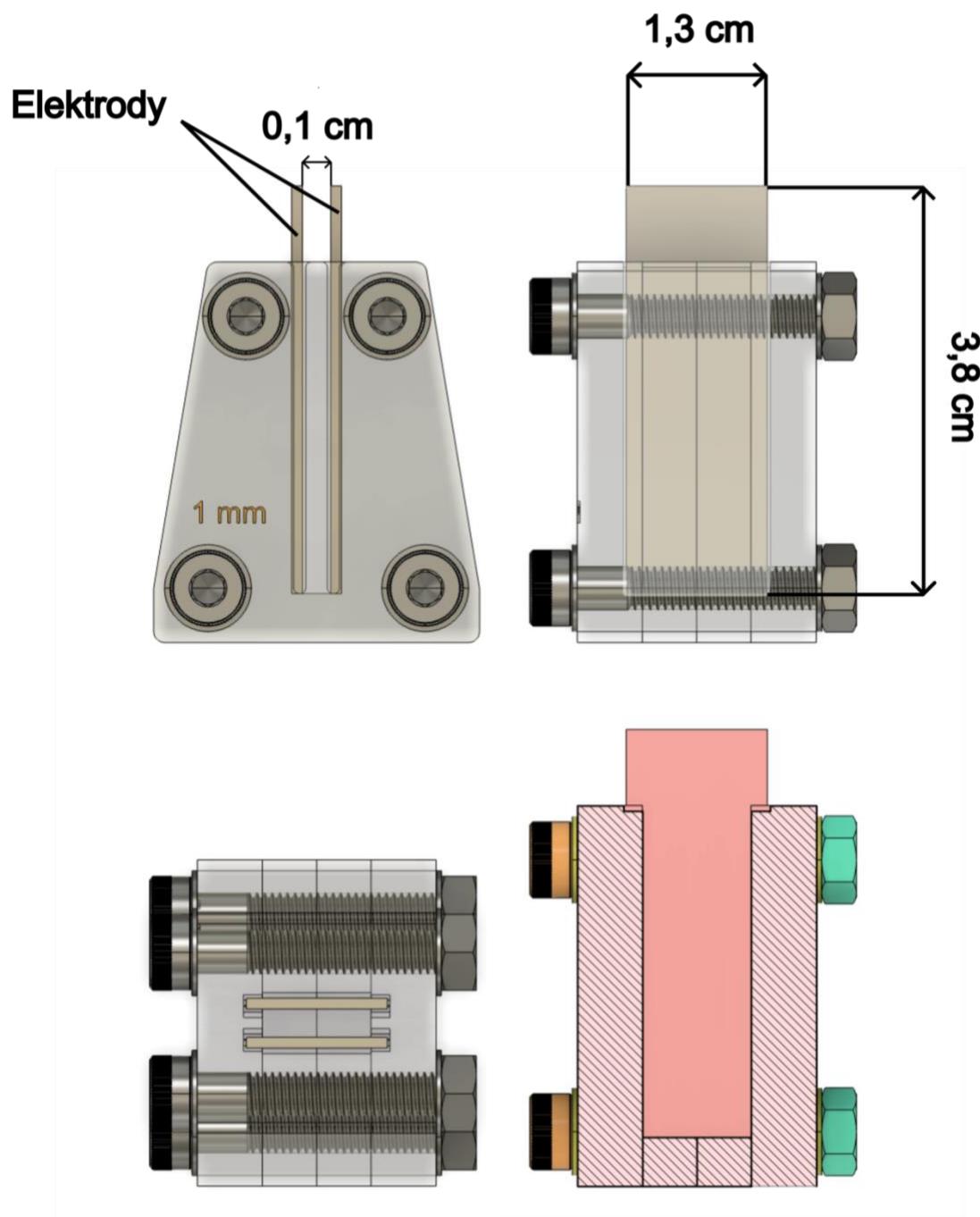
Elektroporační cely byly nejprve navrženy v programu Fusion 360 a následně obrobena na CNC frézce. Cela byla navržena tak, aby rozměrově odpovídala komerčně dostupným kyvetám a aby bylo možné výměnou prostředního dílu libovolně měnit vzdálenost mezi elektrodami pro budoucí experimenty. Zmenšením této vzdálenosti je totiž možné dosáhnout vyšších intenzit elektrického pole.

Cela A) byla vyřezána z Delrinu, jednotlivé díly byly následně spojeny pomocí šroubů. Mezera mezi elektrodami je variabilní dle vyměnitelného prostředního dílu: 0,2 cm nebo 0,4 cm, pro většinu experimentů je však používán 0,2 cm prostřední díl. Vnější díly jsou opatřeny drážkou na gumové těsnění, které zajišťuje, aby nedošlo k prosakování elektroporačního pufu.



Obrázek 20 – Schéma cely A) z Delrinu s 0,2 cm vzdáleností mezi elektrodami.

Cela B) byla vyřezána z polykarbonátu, jednotlivé díly byly utěsněny pomocí PDMS a následně spojeny pomocí šroubů. Mezera mezi elektrodami je 0,1 cm, v této cele je tedy možné dosáhnout vyšších intenzit elektrického pole než u cely A). Cela byla vyrobena z průhledného materiálu, aby bylo možné permeabilizaci detekovat pomocí fotonásobiče (měření luminiscence), což je jedním z řešených témat v rámci společného projektu s ÚFE. Jeho podstata a korelace s dalšími metodami detekce elektroporace je popsána v nedávném článku, na kterém se podílel tým z ÚFE [93].



Obrázek 21 – Schéma cely B) z polykarbonátu s 0,1 cm mezerou mezi elektrodami.

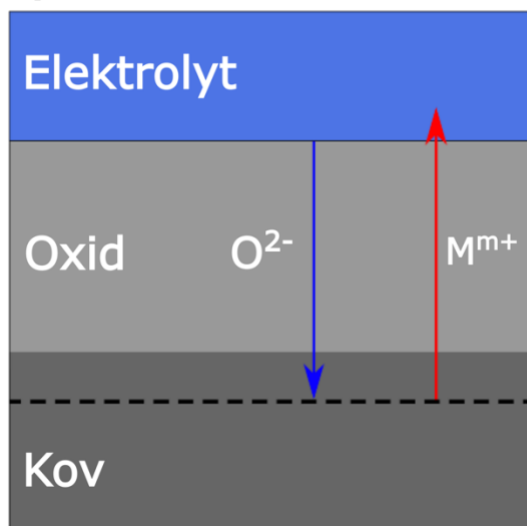
3.5 Příprava faradaických a kapacitních elektrod

Elektrody byly nejprve nastříhány z komerčně dostupných 0,5–0,8 mm silných plátů mědi, hliníku, oceli 304, 316L a titanu na rozměr 13 x 38 mm. Všechny elektrody používané v této práci byly rovněž podrobeny prvkové analýze rentgenovou fluorescenční spektroskopií (XRF). V minulosti bylo zjištěno, že elektrodový materiál výrazně ovlivňuje účinnost elektroporace [81]. Výrobci často neuvádějí přesné složení kovů a různé příměsi či nečistoty by mohly negativně ovlivnit účinnost elektroporace. Analýze byla podrobena i komerčně dostupná 0,4 cm hliníková elektroporační kyveta (Sigma Aldrich). Bylo zjištěno, že zastoupení hliníku v kyvetě činí $(98,559 \pm 0,036) \%$, zbytek tvoří hořčík, křemík a další kovy. Zastoupení hliníku v komerčně dostupném hliníkovém plátu činí $(99,284 \pm 0,011) \%$ s menším množstvím železa, křemíku a dalších kovů. Množství nečistot v elektroporační kyvetě může ovlivnit jak elektrochemické procesy během elektroporace, tak potenciální úpravu povrchu kyvety její anodizací. Veškeré výsledky XRF analýzy jsou uvedeny v Tabulka 1 v přílohách.

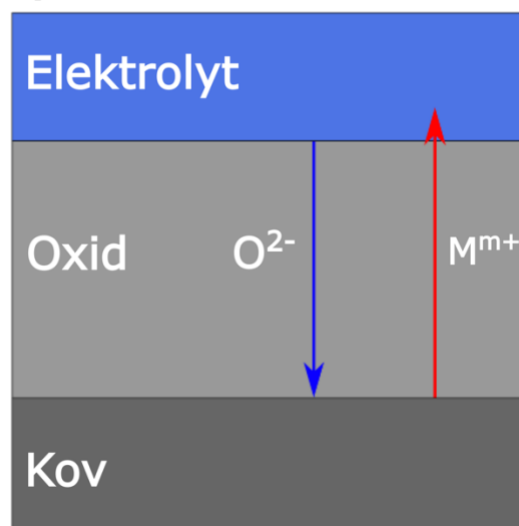
Elektrody jsou sonikovány v acetonové lázni po dobu 10 minut. Dalším krokem je katodické čištění, při kterém dochází k elektrolýze vody a tvorbě vodíku na čištěné elektrodě. Pro titan je aplikováno 10 V po dobu 5 minut v 1 M NaOH a pro hliník 15 V po dobu 5 minut v PBS. Čištění hliníku se provádí v PBS, protože by v NaOH docházelo k jeho leptání. Protielektrodou je ocelová mřížka, která je v jiné nádobě, aby nedocházelo ke kontaminaci čištěných elektrod jejím rozpouštěním. Nádoby jsou spojeny solným můstkem.

Anodizace je proces, při kterém kladně nabitý povrch elektrody ponořený do elektrolytu reaguje s kyslíkem za vzniku oxidu daného kovu. Tloušťka rostoucího oxidu je definována přiloženým napětím a charakter oxidu zase teplotou, složením pufru či předúpravou povrchu elektrody. Během anodizace dochází k rapidnímu poklesu proudu k velmi nízkým hodnotám, což je důsledkem růstu vrstvy oxidu na povrchu elektrod.

A)



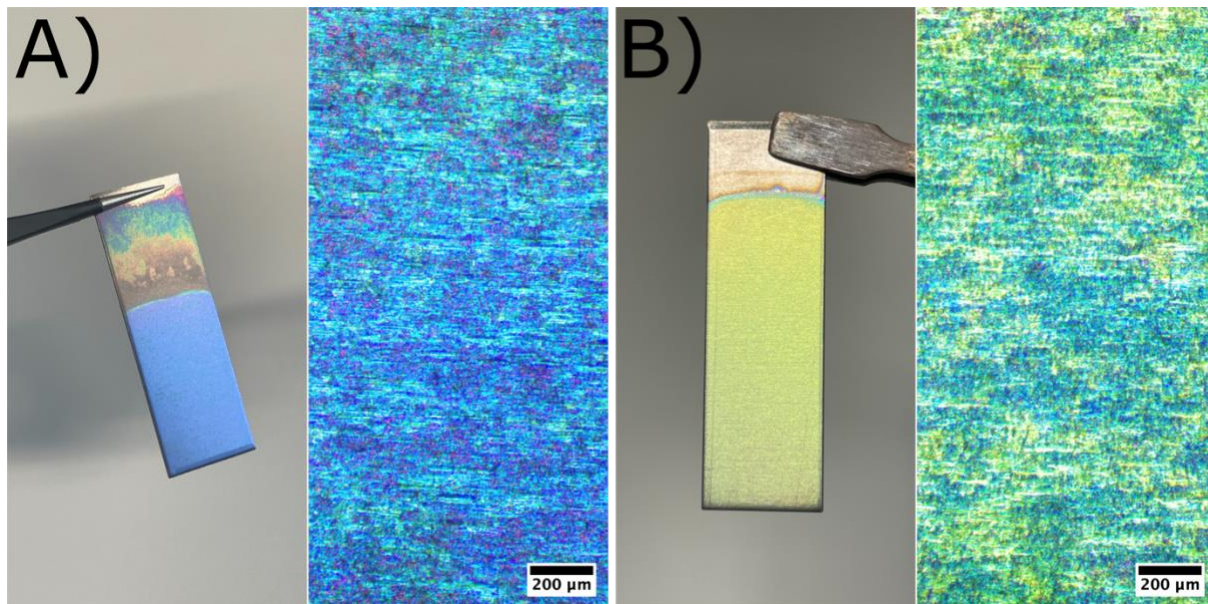
B)



Obrázek 22 – Schéma procesu anodizace: A) tloušťka oxidu kovu je při daném napětí víceméně konstantní, B) jakmile však dojde k aplikaci vyššího napětí, oxid roste hlouběji směrem do kovu dle anodizačního koeficientu (nm/V).

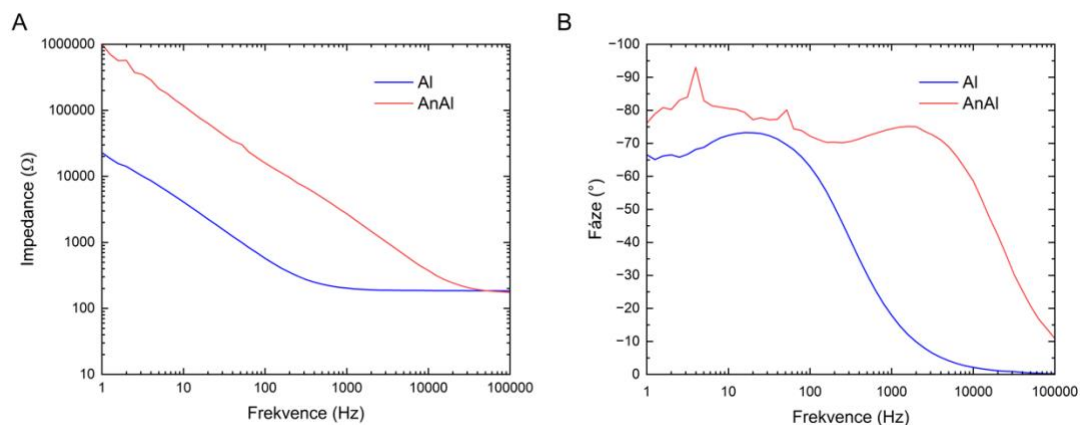
Anodizace je prováděna pro hliníkové a titanové elektrody ve slabě kyselém pufru o složení: 25,7 g/l citronanu sodného a 2,65 g/l kyseliny citrónové. Aplikováno je 110 V po dobu 15 minut za neustálého míchání magnetickým míchadlem. Protielektrodou je opět ocelová mřížka. Po anodizaci jsou elektrody opláchnuty DI vodou a osušeny stlačeným vzduchem. Anodizační koeficient pro hliník se pohybuje kolem 1,6 nm/V a pro

titanu kolem 2,7 nm/V; tato hodnota se může lišit a obecně závisí na podmínkách anodizace, jako je například pH elektrolytu či teplota. Aplikací 110 V tak získáme zhruba 176 nm Al_2O_3 na povrchu anodizovaného hliníku a 297 nm TiO_2 na povrchu anodizovaného titanu. Úspěšnou anodizaci lze poznat pomocí metody EIS, kdy impedance anodizovaných elektrod dosahuje v porovnání s klasickými elektrodami vyšších hodnot. Zároveň dochází u anodizovaného titanu k difrakci světla, kdy tloušťka oxidu definuje výslednou barvu, při 50 V se tak povrch jeví jako modrý, při 110 V zase jako světle zelený.



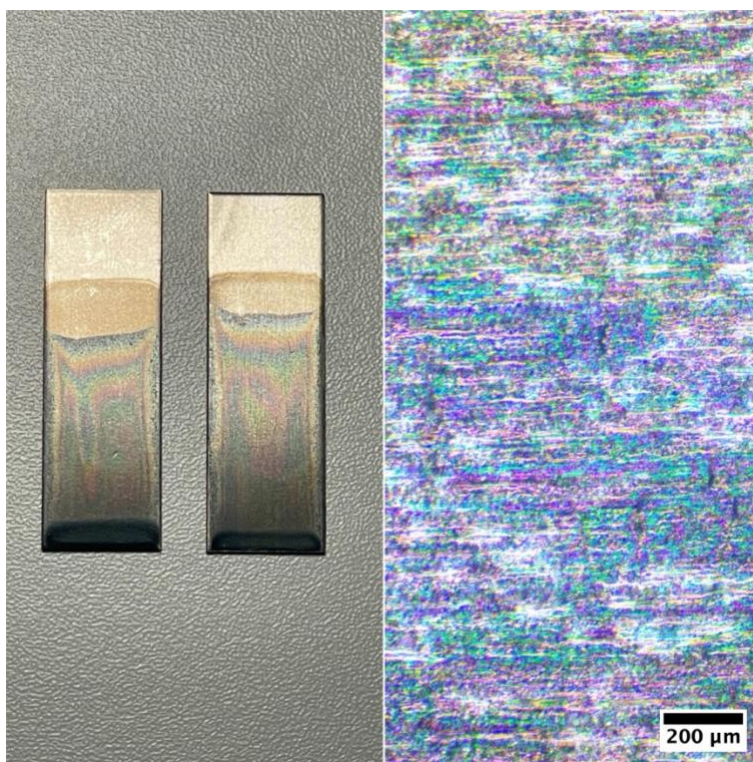
Obrázek 23 – Elektrody z anodizovaného titanu: A) 50 V (~ 135 nm), B) 110 V (~ 297 nm).

Anodizované elektrody lze identifikovat na impedančním spektru, kdy je jejich impedance vyšší v porovnání s klasickými elektrodami:



Graf 1 – Impedanční spektrum pro klasický a anodizovaný hliník v suspenzi kvasinek v pufru S2: A) impedance, B) fáze.

Kromě klasických a anodizovaných elektrod byly rovněž připraveny titanové elektrody pokryté vrstvou polymeru PEDOT:PSS. Titanové elektrody byly nejdříve vyčištěny stejným způsobem, jak již bylo uvedeno výše. Následně byly leptány po dobu 4 minut ve směsi HF, H₂O₂ a H₂O (2:2:75) nebo ve směsi NH₃, H₂O₂ a H₂O (2:1:1). Poté byly naleptané elektrody ponořeny do 1 M NaOH na 30 s, aby se na povrchu vytvořila kontrolovaná vrstva oxidu, elektrody byly dále důkladně opláchnuty DI vodou. Komerčně dostupná směs PEDOT:PSS (Heraeus) byla přefiltrována přes 0,45 μm PVDF filtr. Po filtraci byl PEDOT:PSS společně s DMSO (5 hm. %) a DBSA (0,1 hm. %) sonikován po dobu 30 minut; na poslední 2 minuty byl přidán GOPS (2 hm. %). PEDOT:PSS byl na elektrody nanesen metodou „dip coating“, která spočívá v ponoření elektrody do jeho tekuté směsi. Elektrody byly poté 1 hodinu sušeny v sušárně na 130 °C a po vysušení ponořeny do DI vody minimálně na 24 hodin.



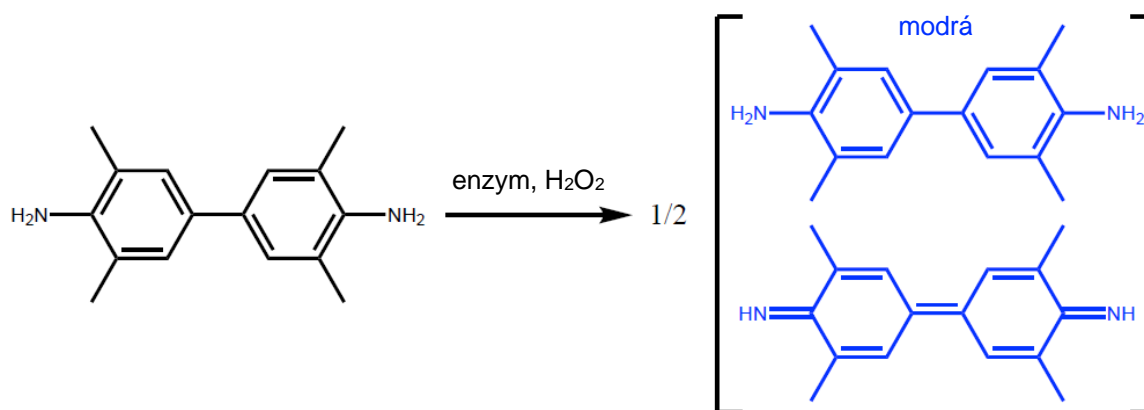
Obrázek 24 – Titanové elektrody s vrstvou PEDOT:PSS.

3.6 Spektrofotometrické stanovení H₂O₂

Peroxid vodíku je stanovován spektrofotometricky, přičemž je využíváno jeho oxidačních schopností. Jeho reakcí se zbarvujícím se oxidovatelným substrátem je možné kvantifikovat jeho koncentraci podle Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon_{dl}lc \quad (.)$$

kde A je naměřená absorpce, ε_{dl} molární absorpční koeficient, l délka optického prostředí a c koncentrace analytu. Reakcí H₂O₂ s 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinem (TMB) dochází k oxidaci TMB za vzniku stabilního modrého komplexu, jehož absorpce je měřena při vlnové délce 653 nm. Celá reakce je katalyzovaná enzymem křenová peroxidáza (HRP) a odehrává se v pufovaném prostředí.



Obrázek 25 – Oxidace TMB peroxidem vodíku katalyzovaná enzymem HRP: vzniká modrý komplex s absorpčním maximem při vlnové délce 653 nm [94].

Prvním krokem je příprava pufru, ve kterém probíhá stanovení H₂O₂. Je připraven 0,2 M roztok Na₂HPO₄ a 0,1 M roztok kyseliny citrónové, každý po 500 ml. Následně je smícháno 435 ml 0,2 M Na₂HPO₄ a 315 ml 0,1 M kyseliny citrónové. Přidáním roztoku Na₂HPO₄ nebo kyseliny citrónové je pH upraveno na hodnotu 5,6.

Dalším krokem je příprava enzymu HRP a substrátu TMB. HRP je rozpuštěn v DI vodě tak, aby byla výsledná koncentrace 1 mg/ml (platí pro aktivitu 145,3 U/mg). Následně je roztok enzymu rozdělen do Eppendorfových zkumavek, přičemž se ke stanovení vždy používá pouze jedna, zbytek je uchováván v mrazu. TMB je rozpuštěn v DMSO na výslednou koncentraci 10 mg/ml, roztok je obdobně jako u HRP rozdělen do zkumavek a uchováván v mrazu.

Směs ke stanovení peroxidu vodíku je připravena smícháním pufru, HRP a TMB v poměru 993:2:5, což pro objem 10 ml odpovídá 9930 μl pufru, 20 μl HRP a 50 μl TMB. Stanovení probíhá napipetováním 160 μl směsi do 96-jamkové mikrotitrační destičky a přidáním 40 μl vzorku, finální objem je tedy 200 μl. Koncentrace peroxidu vodíku je vypočítána dle vztahu:

$$c(H_2O_2) = \frac{A_{653}V_t}{aV_s} \quad (.)$$

kde A_{653} odpovídá absorpenci vzorku při vlnové délce 653 nm, a koeficientu z lineární regrese kalibrační křivky, V_t objemu vzorku (40 μl) a V_s celkovému objemu (200 μl).

3.7 Měření proudu během elektroporace

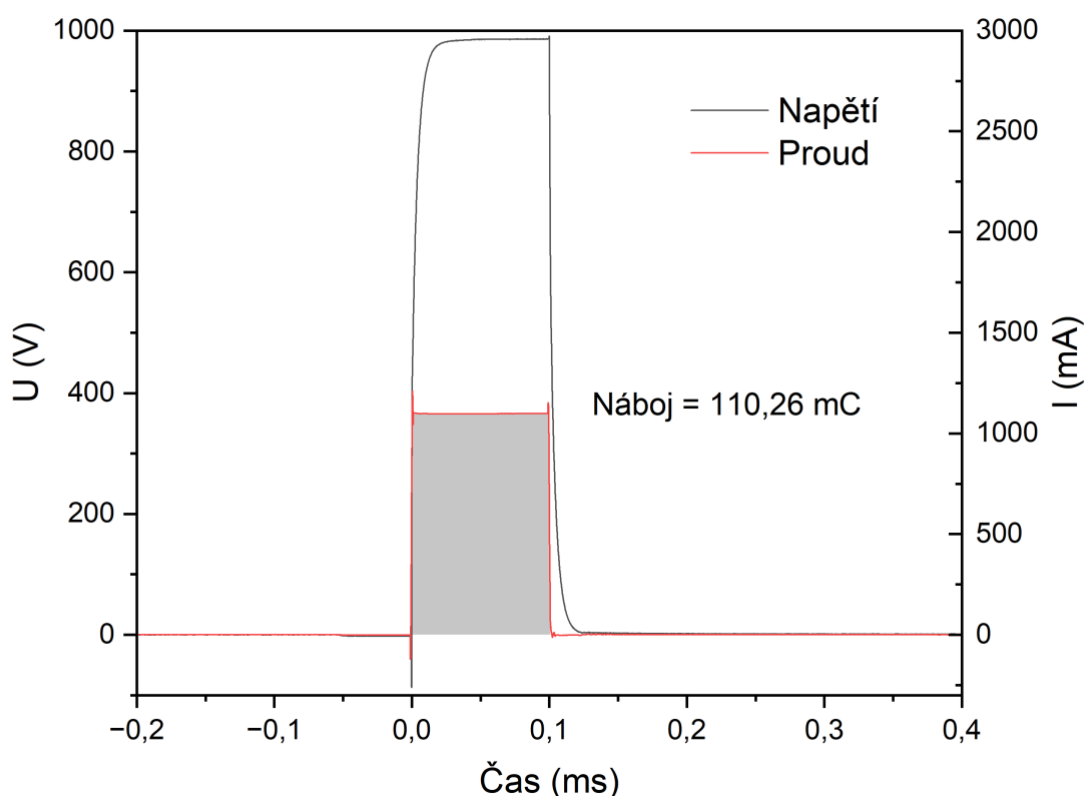
Proud je měřen pomocí tzv. „shunt“ rezistoru o definovaném odporu 1 Ohm. Během elektroporace měříme pomocí osciloskopu výstupní napětí a také pokles v napětí skrze rezistor. Výsledný proud můžeme vypočítat z Ohmova zákona:

$$I = \frac{U}{R} \quad (.)$$

kde I je proud, U je výstupní napětí z elektroporátoru a R je odpor shunt rezistoru. Po získání proudové křivky je provedena její integrace, kterou získáme celkový náboj dodaný elektroporačním pulzem:

$$Q = \int_{t_0}^t I dx \quad (.)$$

kde Q je celkový náboj dodaný elektroporačním pulzem, t_0 a t označují začátek a konec elektroporačního pulzu, a I naměřený proud. Celkový náboj následně můžeme vztáhnout k naměřeným koncentracím peroxidu vodíku.



Graf 2 – Integrovaná proudová křivka s výsledným dodaným nábojem pro elektrody z titanu v 0,2 cm elektroporační cíle. Protokol: 200x 5 kV/cm, 100 μ s, 1 Hz, A2202, 400 μ l.

3.8 Kultivace kvasinek a příprava jejich suspenze

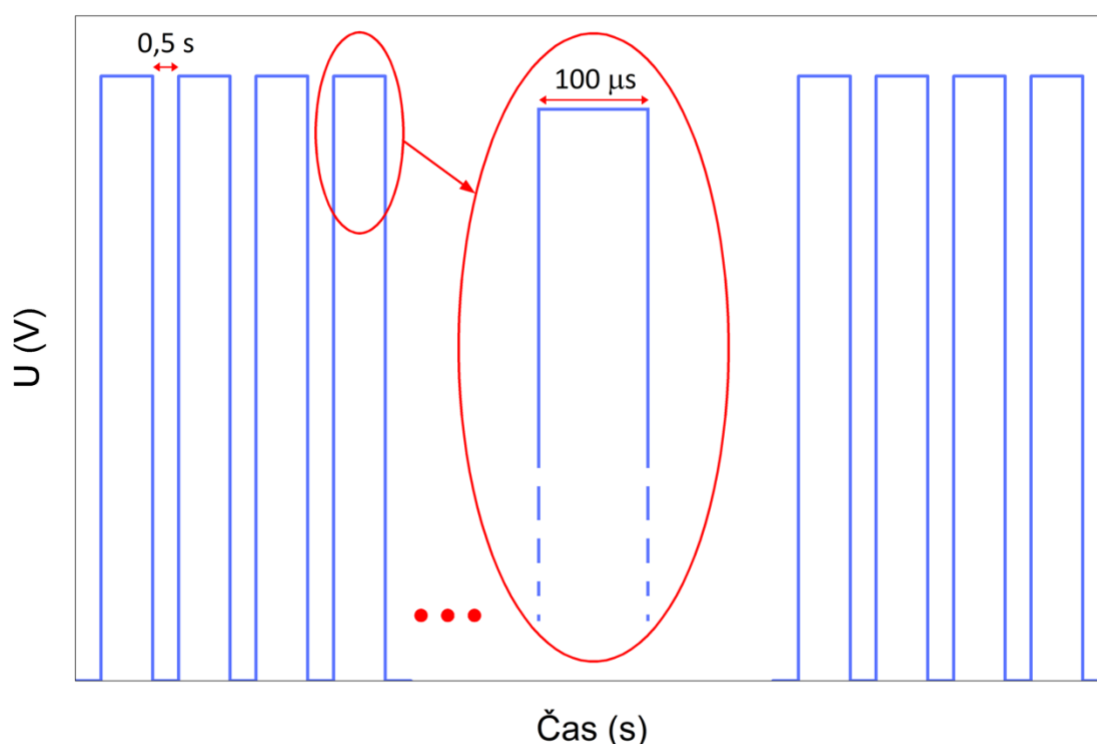
Kvasinková kultura *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741, MATa), poskytnutá Mikrobiologickým ústavem AV ČR, která je používána pro elektroporaci, je uchovávána na agarové misce (1 hm. % kvasničný extrakt, 2 hm. % pepton, 2 hm. % agar a 2 hm. % D-glukóza v purifikované vodě) v lednici při teplotě 4 °C.

Na ÚFE je inokulum připraveno do dvou Erlenmeyerových baněk (250 ml) s 25 ml sterilního YPD média (1 hm. % kvasničný extrakt, 2 hm. % pepton a 2 hm. % D-glukóza v purifikované vodě). Následuje kultivace po dobu 24 hodin v inkubátoru s třepáním při 30 °C a 180 ot./min.

Po dokončení kultivace je suspenze centrifugována 5 minut při 3000 ot./min., poté jsou buňky resuspendovány v elektroporačním pufru S2 (1,403 mM Na₂HPO₄; 0,594 mM NaH₂PO₄; 250 mM sacharóza), který byl přefiltrován přes 0,25 μm PVDF filtr. Tento proces je opakován, přičemž jsou buňky opět resuspendovány, tentokrát v 10 ml přefiltrovaného pufru S2. Koncentrace buněk je zjišťována počítadlem buněk (Beckman Coulter Cell Counter-Z2), buňky jsou pak naředěny na finální koncentraci 1·10⁹ buněk/ml. Na CEITEC je inokulum připraveno do jedné Erlenmeyerovy baňky (250 ml) s 50 ml sterilního YPD média o stejném složení jako na ÚFE. Následuje kultivace na DIY třepače při laboratorní teplotě a 180 ot./min. Po 15 hodinách kultivace je provedena kontrola růstu spektrofotometricky. Byla naměřena hodnota OD₆₀₀ = 0,1, která pro kvasinky odpovídá koncentraci zhruba 1·10⁶ buněk/ml [95]. Kvasinky jsou kultivovány ještě dalších 24 h, celkový čas kultivace je tedy 39 h. Po skončení kultivace jsou buňky centrifugovány a resuspendovány stejně, jak již bylo uvedeno výše. Koncentrace buněk je zjišťována počítáním na Bürkerově komůrce, buňky jsou pak naředěny na finální koncentraci 5,3·10⁸ buněk/ml.

3.9 Protokol pro elektroporaci kvasinek

Elektroporační cela (0,1 cm) je vypláchnuta ethanolem, vodou a následně vysušena stlačeným vzduchem. Do cely s elektrodami je napipetováno 400 μl suspenze buněk a je aplikováno 8 pulzů o intenzitě 3–9 kV/cm, délce 100 μs a frekvenci 2 Hz. Po elektroporaci jsou elektrody i cela opláchnuty ethanolem a vodou. Po vysušení stlačeným vzduchem je možné vyměnit elektrody a provést další elektroporaci.



Graf 3 – Schéma protokolu pro elektroporaci kvasinek. Je aplikováno 8 pulzů o délce 100 μs, frekvenci 2 Hz a variabilní intenzitě elektrického pole, která je definována amplitudou pulzů U (V) a vzdáleností mezi elektrodami d (cm).

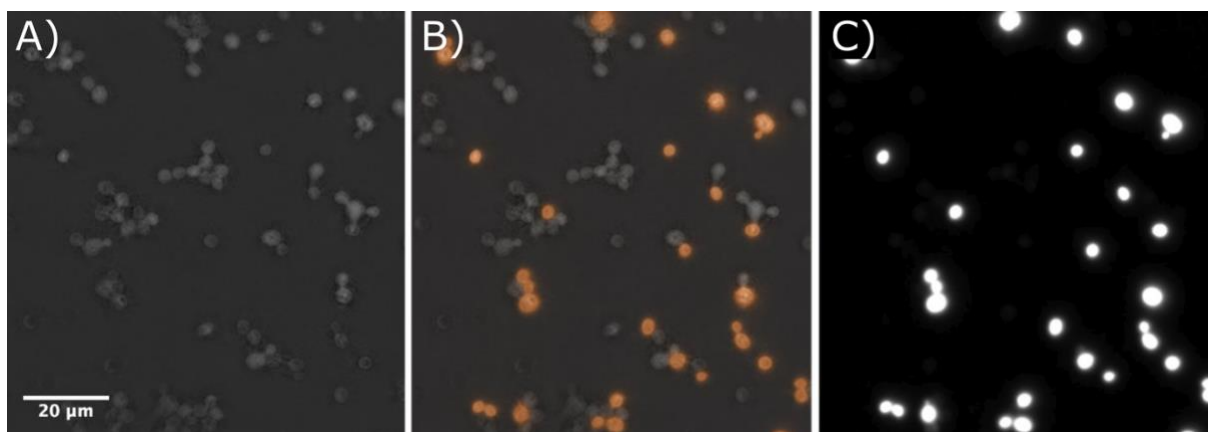
3.10 Měření fluorescence propidium jodidu (PI)

3.10.1 Celková fluorescence

Po elektroporaci je z cely odebráno 200 μl suspenze buněk, poté je přidáno 10 μl zásobního roztoku PI (1 mg/ml v PBS). Buňky jsou inkubovány po dobu 20 minut a následně jsou centrifugovány při 2000 ot./min. po dobu 2 minut. Supernatant je odebrán a buňky jsou resuspendovány ve 130 μl PBS. Do tmavé 96-jamkové mikrotitrační destičky je napipetováno 100 μl suspenze buněk a je měřena fluorescence s excitací při 535 nm, emisí při 617 nm a lineárním mícháním po dobu 5 s před měřením fluorescence. Provedena je i pozitivní kontrola (neelektroporované buňky s PI).

3.10.2 Fluorescenční mikroskop

Zbylých 30 μl permeabilizovaných buněk v PBS je použito k zobrazování mikroskopem Nanolive 3D Cell Explorer-fluo. Krycí sklíčka jsou očištěna stlačeným dusíkem a 8 μl důkladně promíchané suspenze je napipetováno na kulaté podložní sklíčko, které je přikryto krycím sklíčkem (kulaté, o průměru 35 mm). Zobrazování je provedeno s dvojitou excitací filtry TRITC a FITC, s dobou expozice 50 ms. Zobrazování bylo provedeno pro elektroporaci s titanem a anodizovaným titanem, a to pro intenzity 5 a 9 kV/cm. Dále bylo provedeno zobrazování pozitivní kontroly (neelektroporované buňky s PI) a tzv. „sham“ kontroly (neelektroporované buňky s PI, které byly odebrány z elektroporační cely s elektrodami). U každého vzorku bylo pořízeno 10 snímků, jež byly následně analyzovány softwarem ImageJ, který slouží pro počítání buněk. Množství permeabilizovaných buněk potom bylo vyjádřeno v procentech.

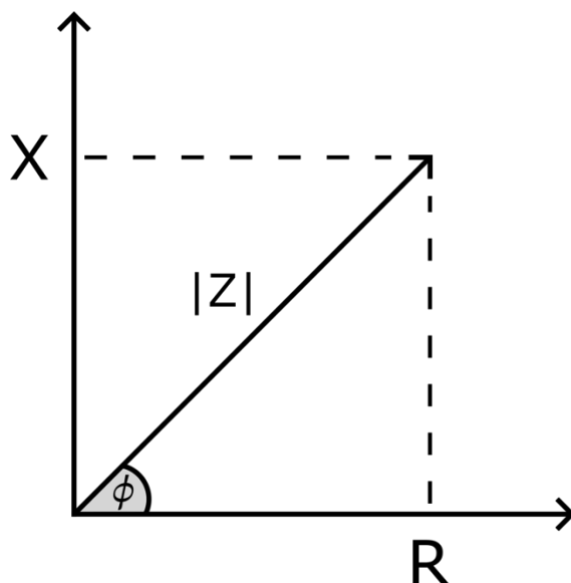


Obrázek 26 – Elektroporované kvasinky zobrazené fluorescenčním mikroskopem pro elektrody z titanu, 5 kV/cm. A) RI mapa (index lomu), B) překryv RI mapy s excitačními filtry: 40 % TRITC a 40 % FITC, C) excitační filtr TRITC.

3.11 Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)

EIS je metoda hojně využívaná v elektrochemii. Spočívá v aplikaci AC potenciálu/proudu na elektrochemický systém a v zaznamenávání výstupního AC proudu/potenciálu. Pokud aplikujeme potenciál a měříme proud, jedná se o potenciostatickou EIS, u galvanostatické EIS je to naopak.

Vraťme se ke konceptu ekvivalentních obvodů pro faradaické, kapacitní a reálné procesy. Obvod C) (Obrázek 16) popisuje reálný systém, kde kondenzátor C_{DL} představuje elektrickou dvojvrstvu, paralelně zapojený rezistor R_{CT} zase odpor přenosu náboje a v sérii je zapojený rezistor R_s představující odpor elektrolytu. Pokud je aplikován vstupní AC proud, systémem poteče výstupní AC potenciál, který může být posunutý o úhel ϕ . Tento úhel představuje hodnotu tzv. fázového posunu a udává sklon vektoru, jehož velikost je definována příspěvkem imaginární (reaktance) a reálné složky (rezistance) a odpovídá hodnotě impedance $|Z|$.



Graf 4 – Vektorové schéma imaginární (reaktance X) a reálné (rezistance R) složky impedance. Impedance je definována hodnotou velikosti vektoru $|Z|$ a fázový posun úhlem ϕ .

Kdyby byl na elektrochemický systém aplikován DC proud, odpor tomuto signálu by způsobil pouze rezistor. Jeho efekt se dá popsat elektrickým odporem (rezistancí) R , jehož velikost je definována již zmíněným Ohmovým zákonem. DC proud nepoteče skrze kondenzátor, ale bude docházet k ukládání náboje podle vztahu:

$$q = CV \quad (.)$$

kde q odpovídá uloženému náboji, C kapacitanci a V napětí mezi deskami kondenzátoru. Kdyby byl však aplikován AC proud, odpor tomuto signálu by způsobil kondenzátor či induktor. Ve zmíněném ekvivalentním obvodu žádný induktor není, pozornost tedy bude věnována kondenzátoru. Jeho efekt na vstupní signál se dá popsat reaktancí X , neboli imaginární složkou impedance.

Aplikací AC proudu na ideální rezistor nedojde k fázovému posunu, impedance je tak nezávislá na frekvenci a skládá se pouze z reálné složky R (příspěvek imaginární složky X je nulový):

$$Z_R = R \quad (.)$$

kde Z_R je impedance a R elektrický odpor.

Aplikací AC proudu na ideální kondenzátor dojde k fázovému posunu, který odpovídá hodnotě $\phi = 90^\circ$, impedance je tak závislá na frekvenci a skládá se pouze z imaginární složky X (příspěvek reálné složky R je nulový):

$$Z_C = X = \frac{1}{\omega C} \quad (.)$$

kde Z_C je impedance kondenzátoru, X reaktance, ω úhlová frekvence a C kapacitance. Impedance rezistoru odpovídá pouze reálné složce R a není závislá na frekvenci, zatímco impedance kondenzátoru odpovídá pouze imaginární složce X , jejíž příspěvek je nižší s rostoucí frekvencí. Díky těmto vlastnostem je tak možné měřením impedance při různých frekvencích vyloučit efekt individuálních komponent v ekvivalentním obvodu [51].

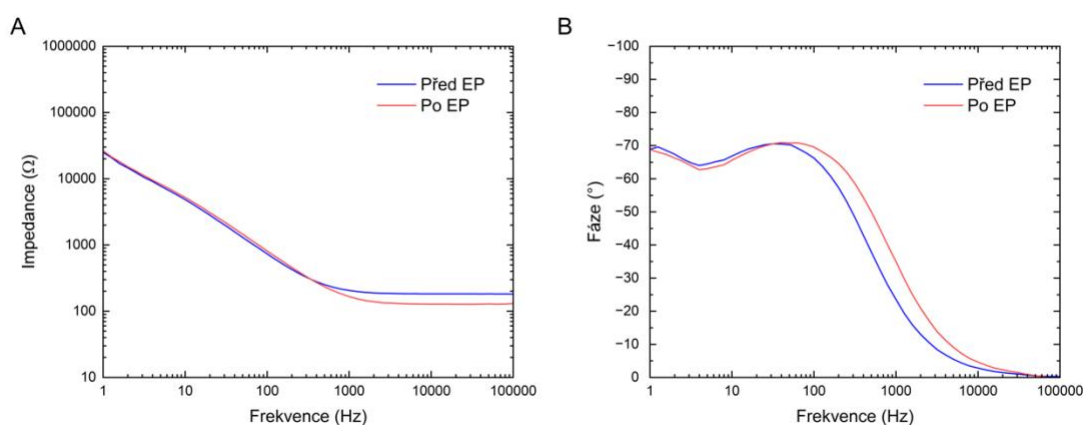
Při vysokých frekvencích vstupního signálu (0,5–1 MHz) bude příspěvek reaktance kondenzátoru nulový, přičemž může být zanedbán i odpor přenosu náboje R_{CT} (aplikací slabého proudu nedochází k přenosu náboje). Výsledná impedance tak bude rovna odporu elektrolytu R_s . Vodivost elektrolytu z hodnoty impedance pak můžeme vypočítat podle tohoto vztahu:

$$\sigma = \frac{d}{RA} \quad (.)$$

kde σ odpovídá vodivosti elektrolytu, d vzdálenosti mezi elektrodami, R odporu elektrolytu (impedanci při fázovém posunu $\phi = 0$) a A povrchu elektrody v kontaktu s elektrolytem.

Při elektroporaci dochází ke zvýšení permeabilizace buněčné membrány a následné výměně látek mezi vnitřním prostředím buňky a okolním elektrolytem. Dochází ke ztrátě intracelulárních molekul, jako jsou například ATP nebo ionty. Právě ztráta iontů způsobuje nárůst vodivosti elektroporačního pufru, který má sám o sobě velmi nízkou vodivost. Rozdílu vodivostí elektrolytu před a po elektroporaci je tak možné kvantifikovat účinnost elektroporace.

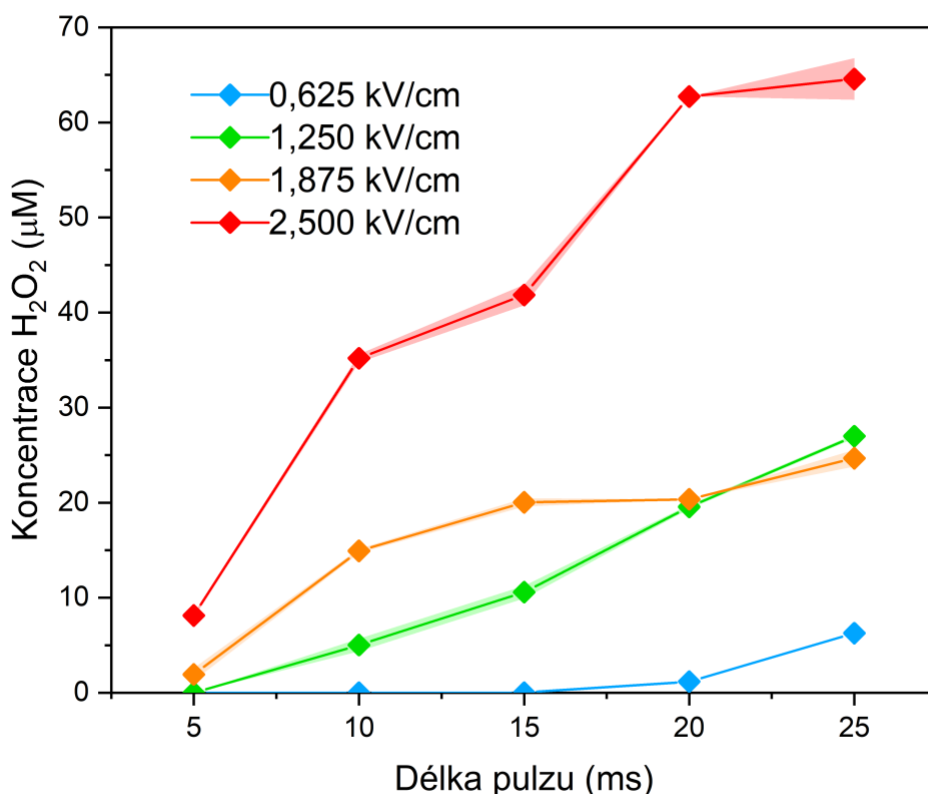
Pro měření je používána potenciostatická EIS se skenováním frekvencí od 1 MHz po 1 Hz. Je aplikován velmi malý AC potenciál (10 mV) a jsou snímány proudové hodnoty v rozmezí zadaných frekvencí. Při vysokých frekvencích (300–500 KHz) je odečtena hodnota impedance, která odpovídá odporu elektroporačního pufru. Ze zjištěné impedance, vzdálenosti mezi elektrodami a povrchu elektrody ve styku s elektrolytem je dále vypočtena vodivost elektroporačního pufru dle Rovnice 28. Měření je prováděno před a po elektroporaci a rozdíl dvou získaných hodnot vodivostí reflektuje její účinnost.



Graf 5 – Impedanční spektrum pro hliník před a po elektroporaci: A) impedance, B) fáze. Protokol: $8 \times 5 \text{ kV/cm}$ $100 \mu\text{s}$, 2 Hz, suspenze kvasinek v pufru S2, $400 \mu\text{l}$.

3.12 Výsledky a diskuze

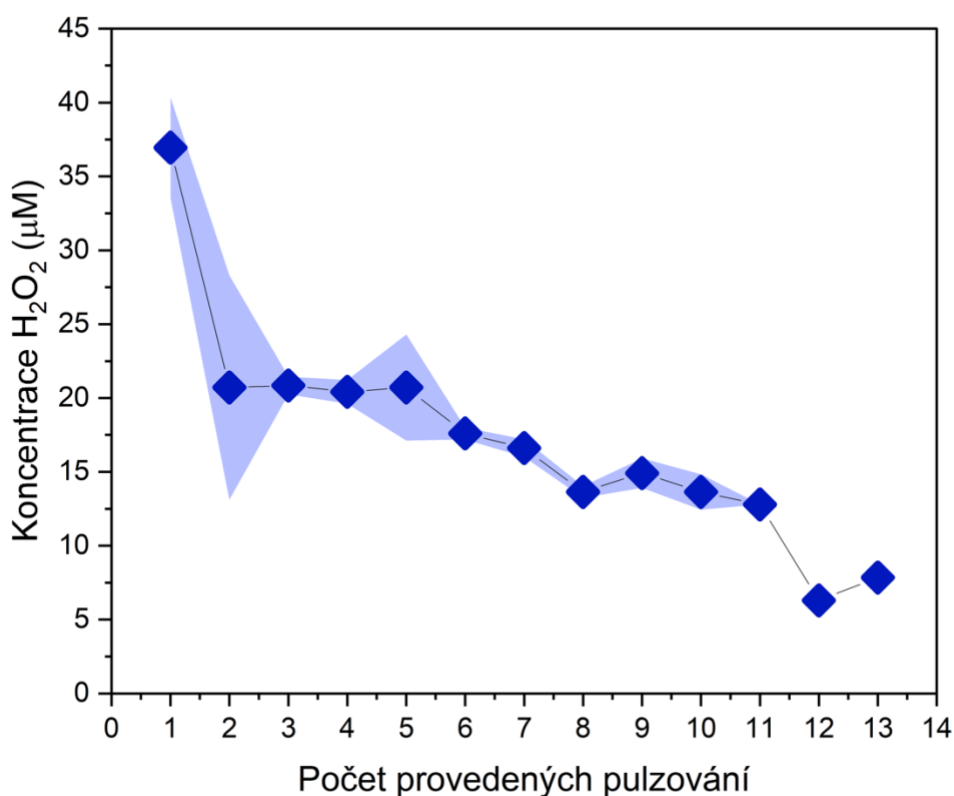
Prvotní experimenty byly provedeny za účelem zjištění přítomnosti ROS během elektroporace. Byly zvoleny délky pulzů, které standardně nejsou používány k elektroporaci, zároveň byly experimenty prováděny v DI vodě, která není standardním elektroporačním elektrolytem. Do elektroporační kyvety bylo napipetováno 800 μl DI vody a poté bylo aplikováno 1000 pulzů o délce 5–25 ms, intenzitě 0,625–2,5 kV/cm a frekvenci 10 Hz. Po skončení pulzování byla spektrofotometricky stanovena koncentrace vyprodukovaného H_2O_2 .



Graf 6 – Závislost koncentrace H_2O_2 na délce pulzu pro různé intenzity elektrického pole v 0,4 cm komerčně dostupné elektroporační kyvetě (Sigma Aldrich). Protokol: 1000x 0,625–2,5 kV/cm, 5–25 ms, 10 Hz, dH_2O , 800 μl . Uvedené výsledky odpovídají jednomu měření se směrodatnou odchylkou ze stanovení H_2O_2 (byly odebrány 2 vzorky).

Byla potvrzena přítomnost H_2O_2 během pulzování, jeho koncentrace rostla se zvyšující se intenzitou a délkou pulzů. Rozdíly byly u menších intenzit elektrického pole nižší, u intenzity 2,5 kV/cm však došlo k výraznému nárůstu koncentrace H_2O_2 , a to zejména u délek pulzů 20 a 25 ms.

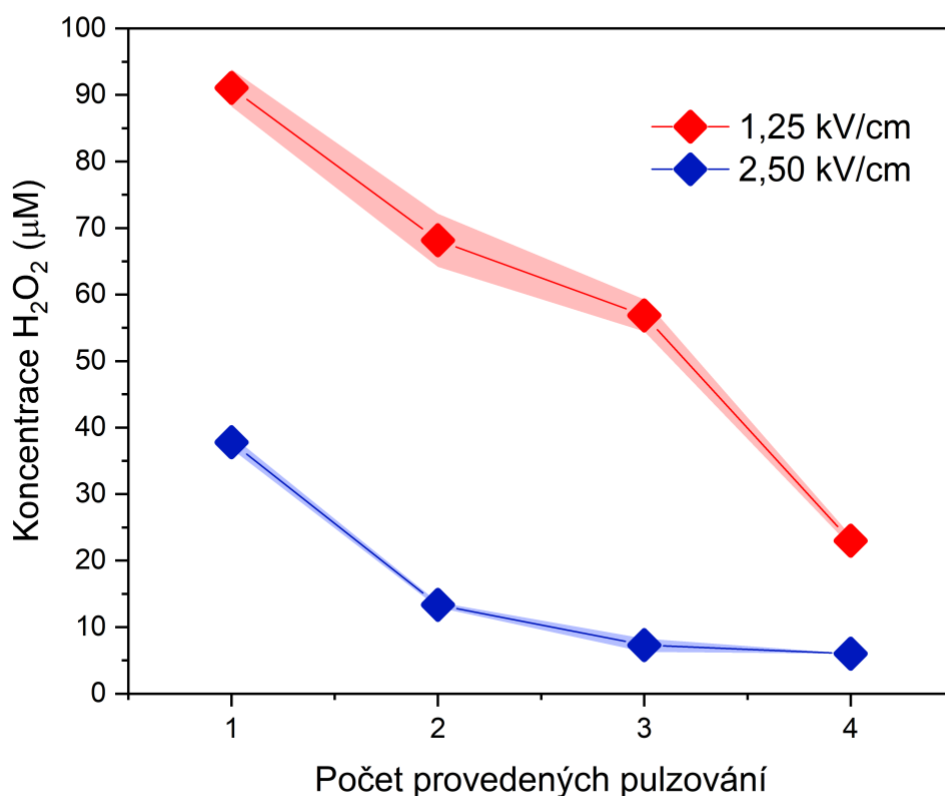
Při opakovaných měřeních bylo pozorováno, že je poměrně složité výsledky reprodukovat. Komerčně dostupné elektroporační kyvety jsou drahé, proto byly opakovaně používány. Byl tedy proveden test reprodukovatelnosti výsledků. Elektroporační kyveta s 800 μl DI vody byla podrobena opakovanému pulzování, kdy bylo aplikováno 1000 pulzů o délce 5–25 ms, intenzitě 2,5 kV/cm a frekvenci 10 Hz. Po každém použití byla stanovena koncentrace peroxidu vodíku, kyveta byla vypláchnuta vodou a experiment byl opakován.



Graf 7 – Závislost koncentrace H₂O₂ na počtu provedených pulzování v 0,4 cm komerčně dostupné elektroporační kyvetě (Sigma Aldrich). Protokol: 1000x 2,5 kV/cm, 25 ms, 10 Hz, diH₂O, 800 µl. Uvedené výsledky odpovídají jednomu měření se směrodatnou odchylkou ze stanovení H₂O₂ (byly odebrány 2 vzorky).

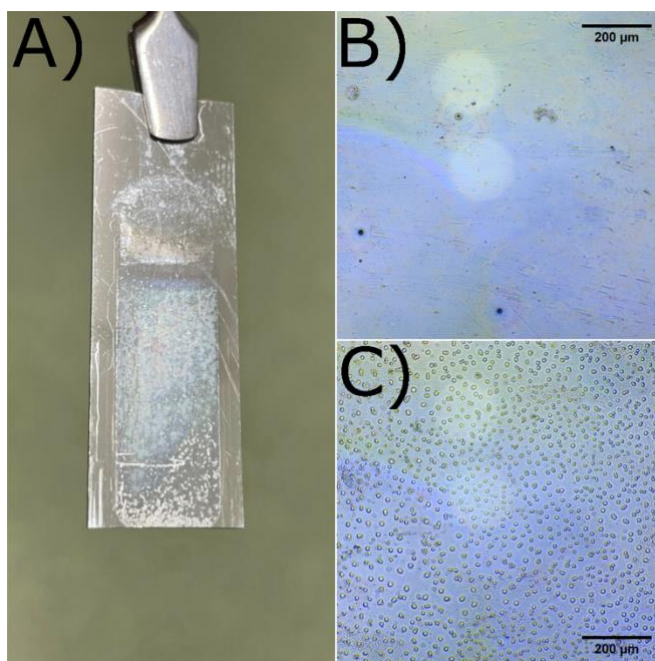
Bylo pozorováno, že koncentrace peroxidu vodíku s každým použitím kyvety klesá. Elektrodový materiál kyvety během pulzování koroduje a dochází tak ke snížení produkce H₂O₂. Snaha o obnovení povrchu elektrod leptáním 1 M NaOH nepřinesla žádnou změnu. Proveden byl i pokus o anodizaci povrchu elektrod v kyvetě, ale proud během tvorby vrstvy oxidu klesal velmi pomalu a nedosáhl nízkých hodnot, jako je u čistého hliníku obvyklé. Problémy s anodizací kyvet mohou být způsobeny přítomností nečistot v materiálu elektrod, což bylo potvrzeno metodou XRF.

Protože jsou elektroporační kyvety poměrně drahé, reprodukovatelnost měření je v důsledku koroze elektrod během pulzování špatná a jejich vzdálenost mezi elektrodami limituje maximální intenzitu elektrického pole, bylo nutné si vytvořit vlastní elektroporační elektrody. Na podložní sklíčka byly metodou PVD napařeny jednotlivé kovy (tloušťka 300 nm), ze sklíček byly dále vyřezány elektrody o rozměrech 13 x 38 mm. Elektrody byly následně používány pro pulzování v elektroporační cele A) (Obrázek 20). Výhodou napařených elektrod je zejména čistota daného kovu a jejich finančně nenáročná výroba. Do elektroporační cely s napařenými hliníkovými elektrodami bylo napipetováno 800 µl DI vody a bylo aplikováno 1000 pulzů o intenzitě 2,5 nebo 5 kV/cm, délce 25 ms a frekvenci 10 Hz.



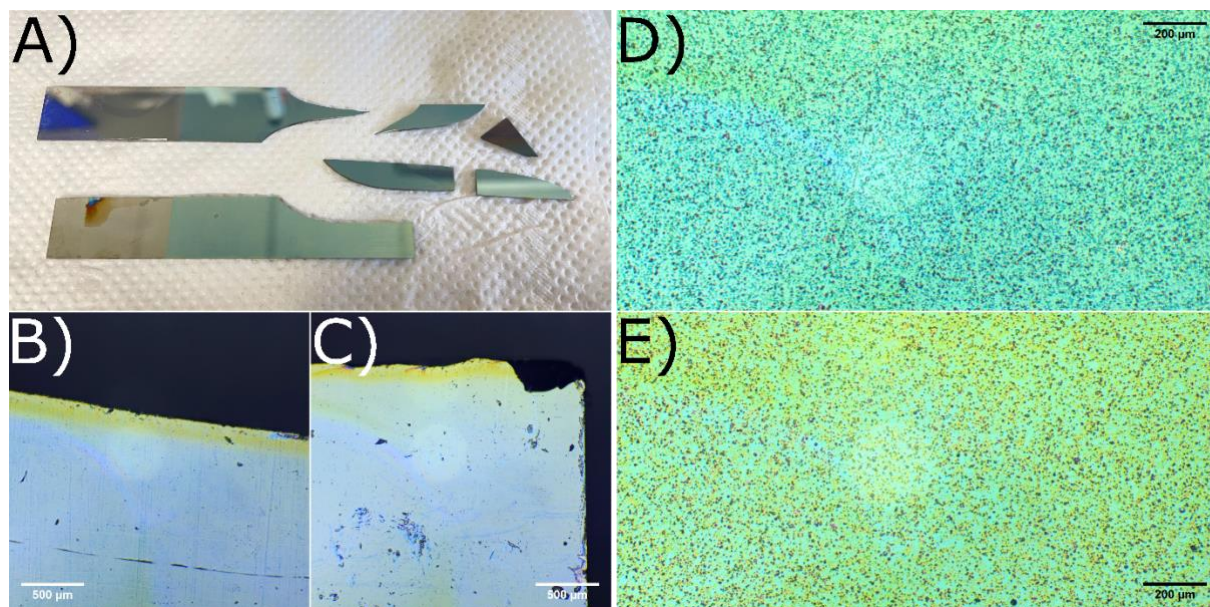
Graf 8 – Závislost koncentrace H₂O₂ na počtu provedených pulzování v 0,4 cm elektroporační cele s napařenými hliníkovými elektrodami. Protokol: 1000x 1,25 nebo 2,5 kV/cm, 25 ms, 10 Hz, diH₂O, 800 µl. Uvedené výsledky odpovídají jednomu měření se směrodatnou odchylkou ze stanovení H₂O₂ (byly odebrány 2 vzorky).

Během pulzování docházelo stejně jako u kyvet ke korozi:



Obrázek 27 – Koroze elektrody ze sklíčka pokrytého 300 nm hliníku metodou PVD. A) Zkorodovaná napařená hliníková elektroda po protokolu: 200x 5 kV/cm, 100 µs, 1 Hz, diH₂O, 400 µl. B) Část elektrody, která nebyla v kontaktu s elektrolytem. C) Zkorodovaná část elektrody, která byla ve styku s elektrolytem.

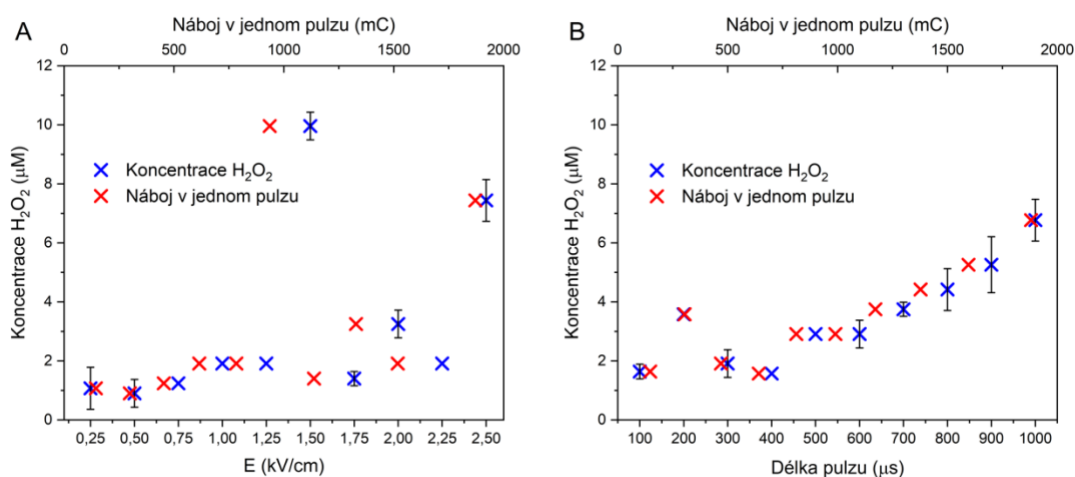
Problém napařených elektrod je, že koroze dochází k rozpouštění tenké vrstvy, důsledkem je pak menší povrch v kontaktu s elektrolytem a menší koncentrace H_2O_2 . Překvapivé bylo, že při intenzitě elektrického pole 2,5 kV/cm byla koncentrace H_2O_2 vyšší, než u 5 kV/cm, což nesouhlasí s výsledky u elektroporačních kyvet. Příčinou takového rozdílu může být již zmíněná intenzivnější koroze při vyšším elektrickém poli nebo redukce peroxidu vodíku zpět na vodu. Byla také provedena anodizace napařených elektrod, během ní však tenké vrstvy také korodovaly, a to jak během anodizace při 110 V, tak při pulzování. V několika případech dokonce došlo k prasknutí elektrod během pulzování.



Obrázek 28 – A) Prasklá elektroda z napařeného a anodizovaného titanu, B) a C) detail hrany elektrody na obrázku A), D) napařená a anodizovaná titanová elektroda, E) napařená a anodizovaná titanová elektroda po protokolu: 200x 5 kV/cm, 100 μ s, 1 Hz, di H_2O , 400 μ l.

Jelikož je příprava napařených elektrod časově náročná, vyžaduje přístup do čistých prostor a koroze tenkých vrstev během měření ovlivňuje jejich výsledky, bylo potřeba najít novou alternativu. Finální elektroporační systém tak využíval elektrod nastříhaných z komerčně dostupných kovových plátů, jejichž příprava je uvedena v metodické sekci 3.5 Příprava faradaických a kapacitních elektrod. Výhodou těchto elektrod byla jejich odolnost, cena, a jednoduchá příprava.

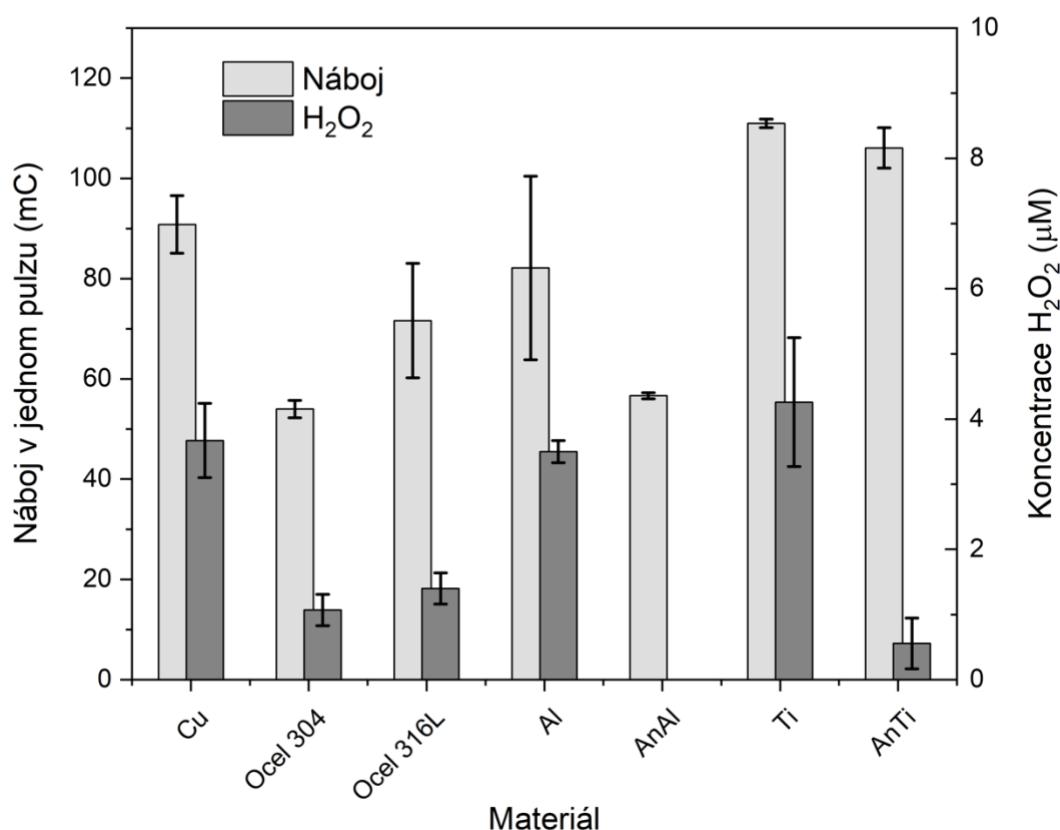
Jak již bylo zmíněno, intenzivní protokoly používané v těchto experimentech nejsou standardně používány pro elektroporaci buněk. Dalším krokem tedy byly experimenty se standardními protokoly, což se týká i elektroporačního pufru. Komerčně dostupné elektroporační pufrы jsou velmi drahé a jejich přesné složení není uvedeno. Nicméně se vždy jedná o pufr s nízkou měrnou vodivostí a osmotickým činidlem. Díky spolupráci s ÚFE, kde mají s elektroporací více zkušeností, nám byly poskytnuty složení různých elektroporačních pufrů, které se v praxi používají. Jedná se o pufrы A2202: 0,594 NaH₂PO₄; 1,403 Na₂HPO₄ a LCB: 10 mM HEPES; 250 mM sacharóza; 1,5 mM MgCl₂; 0,6 mM CaCl₂. Detailní charakteristiky všech použitých pufrů jsou uvedeny v příloze. Pufr LCB byl na ÚFE přímo používán pro elektroporaci kvasinek, zatímco pufr A2202 pro experimenty bez buněk. Standardní elektroporační protokol, který je používán na ÚFE, spočívá v aplikaci 200 pulzů o intenzitě 5 kV/cm, délce 100 μs a frekvenci 1 Hz. Různé variace protokolu od ÚFE byly nejdříve otestovány na 0,4 cm elektroporačních kyvetách, kdy bylo aplikováno 200 pulzů o intenzitě 0,25–2,5 kV/cm, délce 100–1000 μs a frekvenci 1 Hz. Během elektroporace byl zároveň snímán proud a integrací jeho křivky byl vypočítán celkový náboj dodaný jedním pulzem.



Graf 9 – Závislost koncentrace H₂O₂ na intenzitě elektrického pole, náboji v jednom pulzu při konstantní délce pulzu 1000 μs (A), na délce pulzu a náboji v jednom pulzu při konstantní intenzitě elektrického pole 2,5 kV/cm (B). Provedeno v 0,4 cm komerčně dostupné elektroporační kyvetě (Sigma Aldrich). Protokol: 200x 0,25–2,5 kV/cm, 100–1000 μs, 1 Hz, A2202, 800 μl. Uvedené výsledky odpovídají jednomu měření se směrodatnou odchylkou ze stanovení H₂O₂ (byly odebrány 2 vzorky).

Experiment byl proveden pokaždé s novou kyvetou, aby bylo zabráněno chybě způsobené její korozi během pulzování. Z výsledků je evidentní, že koncentrace H₂O₂ roste s dodaným nábojem, a to jak s intenzitou elektrického pole, tak s délkou pulzu. Nárůst je intenzivnější s rostoucí délkou pulzu, u rostoucí intenzity elektrického pole je nárůst méně výrazný, což může být způsobeno i zpětnou redukcí H₂O₂ na vodu.

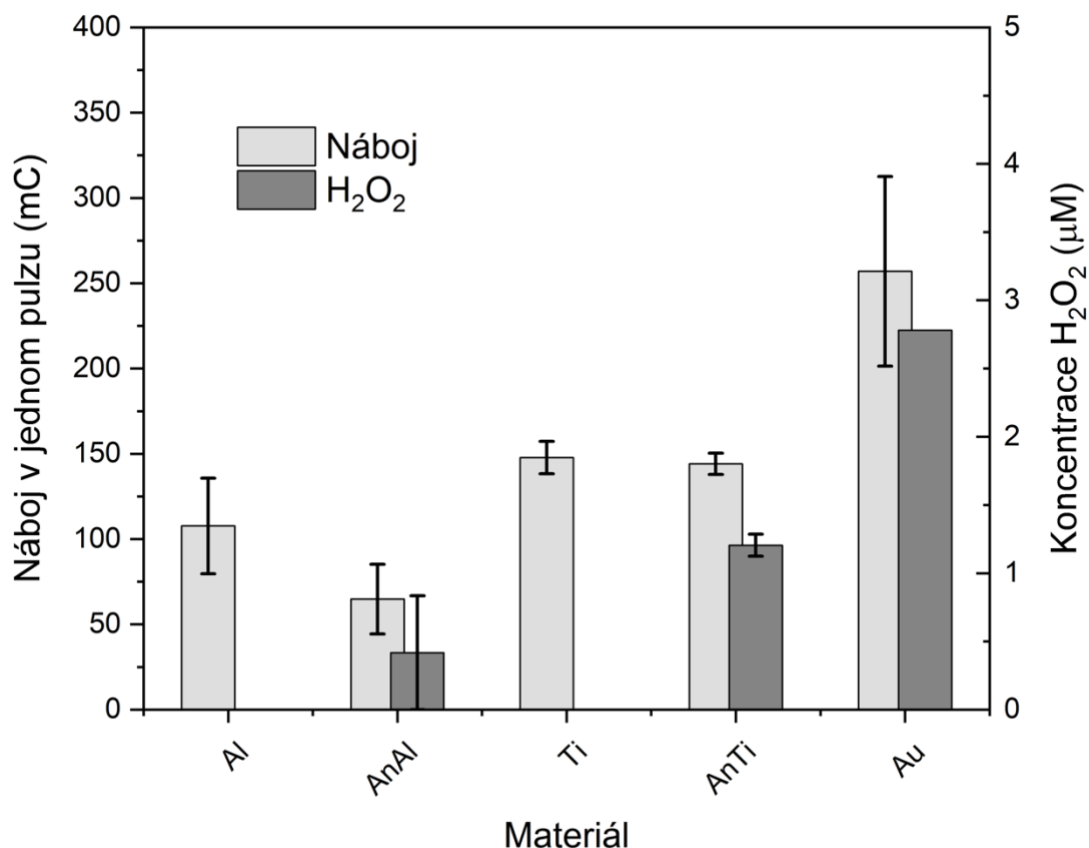
Jak již bylo zmíněno, kyvety nejsou praktickým elektroporačním systémem pro účely této práce. Všechny následující experimenty bez buněk již byly provedeny s elektrodami vystříženými z různých komerčně dostupných kovových plátů (měď, ocel 304 a 316L, hliník, anodizovaný hliník, titan, anodizovaný titan) v 0,2 cm elektroporační cele. Na 400 μ l pufru A2202 bylo aplikováno 200 pulzů o intenzitě 5 kV/cm, délce 100 μ s a frekvenci 1 Hz. Během pulzování byl rovněž snímán proud a jeho integrací byl stanoven celkový náboj v jednom pulzu.



Graf 10 – Závislost náboje v jednom pulzu a koncentrace H₂O₂ na materiálu elektrod v 0,2 cm elektroporační cele. Protokol: 200x 5 kV/cm, 100 μ s, 1 Hz, A2202, 400 μ l. Uvedené výsledky jsou průměrem tří měření se směrodatnou odchylkou.

Z grafu lze vidět, že koncentrace H₂O₂ roste s nábojem v podstatě u všech materiálů až na dvě výjimky – anodizované elektrody z hliníku a titanu. U anodizovaného hliníku nebyla naměřena koncentrace H₂O₂, u anodizovaného titanu však malé množství H₂O₂ vzniklo. To může být způsobeno hlavně rozdílem v dodaném náboji mezi titanovými a hliníkovými elektrodami. Titan sám o sobě dosahuje vysokých hodnot náboje a díky vysoké dielektrické konstantě TiO₂ není mezi klasickým a anodizovanými titanem v náboji velký rozdíl. Při takto vysokém náboji zkrátka nemusí vrstva TiO₂ k úplnému zamezení faradaických reakcí stačit. Zároveň může docházet k tvorbě defektů ve vrstvě oxidu, které mohou dále ovlivnit tvorbu H₂O₂.

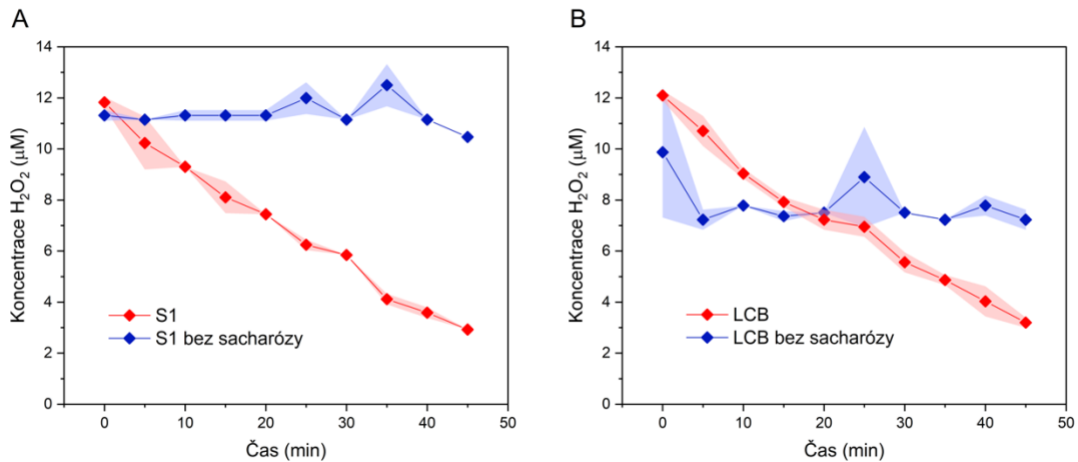
Stejný experiment byl proveden i pro pufr LCB, ale místo mědi, oceli 304 a 316L byla zvolena elektroda, která byla vyrobena napařením tenké vrstvy zlata na podložní sklíčko.



Graf 11 – Závislost náboje v jednom pulzu a koncentrace H₂O₂ na materiálu elektrod v 0,2 cm elektroporační cele s elektrodami vystříženými z kovových plátů. Protokol: 200x 5 kV/cm, 100 µs, 1 Hz, LCB, 400 µl. Uvedené výsledky jsou průměrem tří měření se směrodatnou odchylkou.

Výsledky se značně liší od hodnot naměřených v pufru A2202. Dodané náboje jsou o něco vyšší než v předchozím měření. Zlato dosahuje zdaleka nejvyššího náboje, což se také projevilo na koncentraci H₂O₂. Nicméně jsou naměřené koncentrace nižší než u A2202 i přes vyšší dodaný náboj. Zajímavé je, že anodizované elektrody v LCB produkují větší množství H₂O₂ než elektrody klasické, u kterých dokonce byla koncentrace nulová.

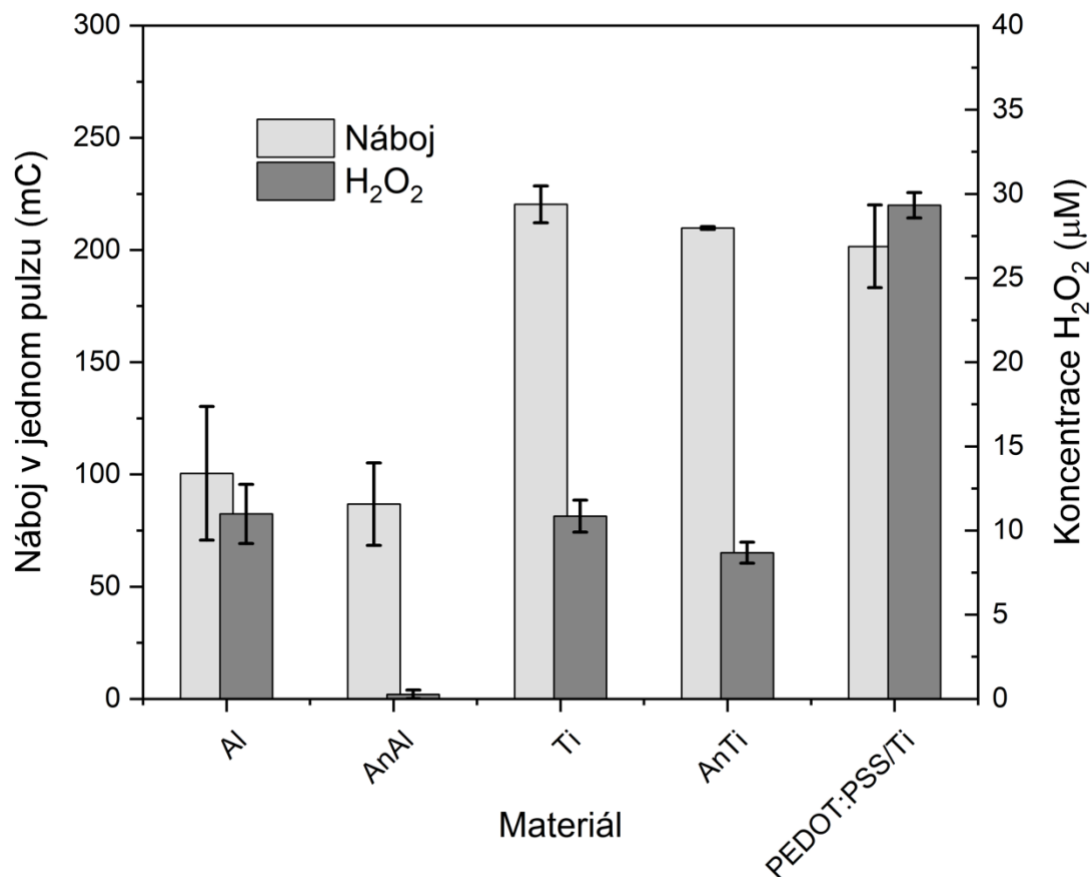
Hypotézou bylo, že pravděpodobně dochází k vymizení H_2O_2 reakcí s HEPES, který je ovšem znám i produkcí H_2O_2 na ambientním světle a cytotoxickými účinky. Proto byl připraven nový pufr S1: 0,594 mM NaH_2PO_4 ; 1,403 mM Na_2HPO_4 ; 250 mM sacharóza; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,6 mM $CaCl_2$. Následně byl proveden test stability H_2O_2 v pufrch S1 a LCB, kdy byl do 9 ml daného pufru napipetován 1 ml 100 μ M roztoku H_2O_2 v DI vodě. Každých 5 minut po dobu 45 minut byla kontrolována jeho koncentrace.



Graf 12 – Test stability H_2O_2 v čase v pufrch S1 (A) a LCB (B). Uvedené výsledky odpovídají jednomu měření se směrodatnou odchylkou ze stanovení H_2O_2 (byly odebrány 2 vzorky).

Jak v pufru LCB, tak v pufru S1 byl H_2O_2 nestabilní, jeho koncentrace v čase klesala. Experiment byl tedy pro oba pufrы proveden ještě jednou, tentokrát však bez přítomnosti sacharózy. Bylo zjištěno, že sacharóza je zodpovědná za vymizení H_2O_2 , to však stále nevysvětluje výsledky z Graf 11. Je možné, že HEPES ovlivňuje tvorbu H_2O_2 během pulzování, od jeho použití bylo tedy upuštěno.

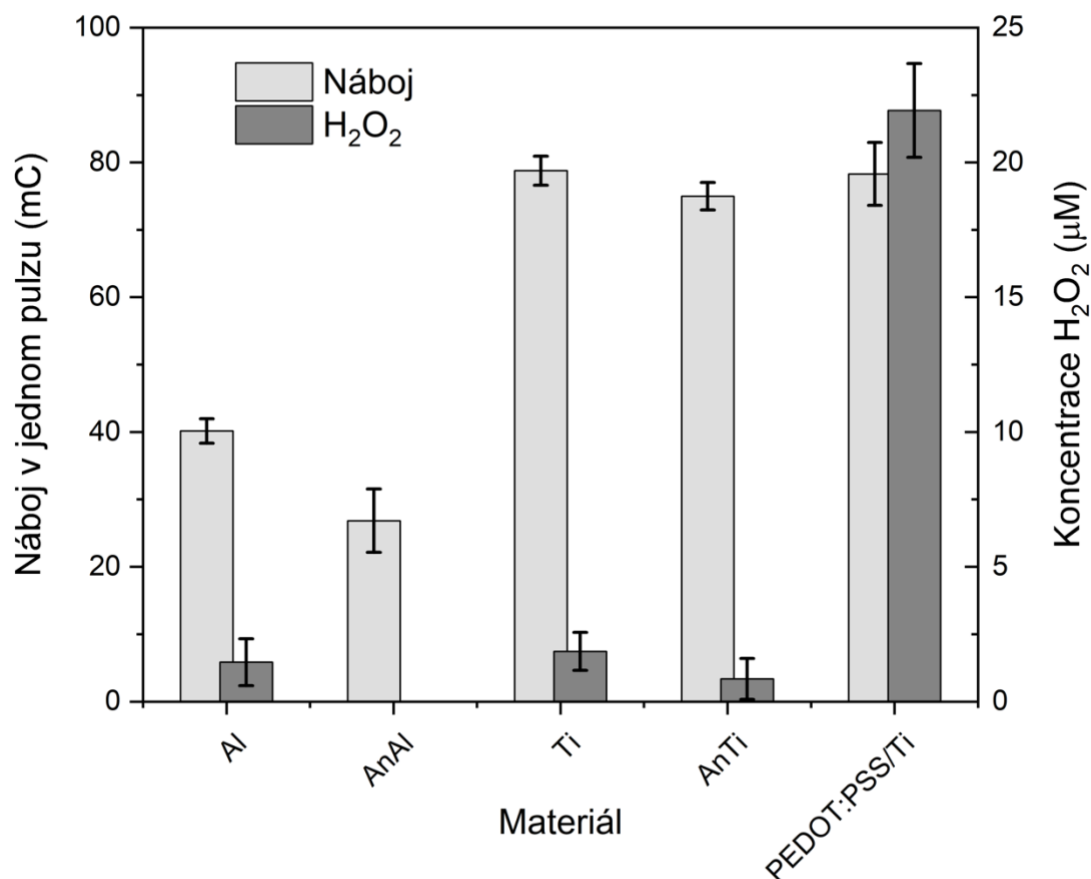
Pro elektroporaci kvasinek byl tedy místo pufru LCB zvolen pufr S1. Na 400 μl pufru S1 bylo v 0,2 cm elektroporační cele aplikováno 200 pulzů o intenzitě 5 kV/cm, délce 100 μs a frekvenci 1 Hz. Mimo jiné byly místo zlatých elektrod zvoleny titanové elektrody s vrstvou polymeru PEDOT:PSS. Elektroda byla polymerem pokryta za účelem navýšení produkce H_2O_2 .



Graf 13 – Závislost náboje v jednom pulzu a koncentrace H_2O_2 na materiálu elektrod v 0,2 cm elektroporační cele. Protokol: 200x 5 kV/cm, 100 μs , 1 Hz, S1, 400 μl . Uvedené výsledky jsou průměrem tří měření se směrodatnou odchylkou.

Z výsledků jde vidět, že došlo k navýšení nábojů i koncentrací H_2O_2 , což je způsobeno zejména vyšší konduktivitou pufru oproti předchozím pufrům. U anodizovaného hliníku se opět podařilo koncentraci H_2O_2 snížit až k nule, anodizovaný titan se však oproti klasickému titanu lišil pouze minimálně. Titan s vrstvou PEDOT:PSS vyprodukoval zdaleka nejvyšší koncentraci H_2O_2 .

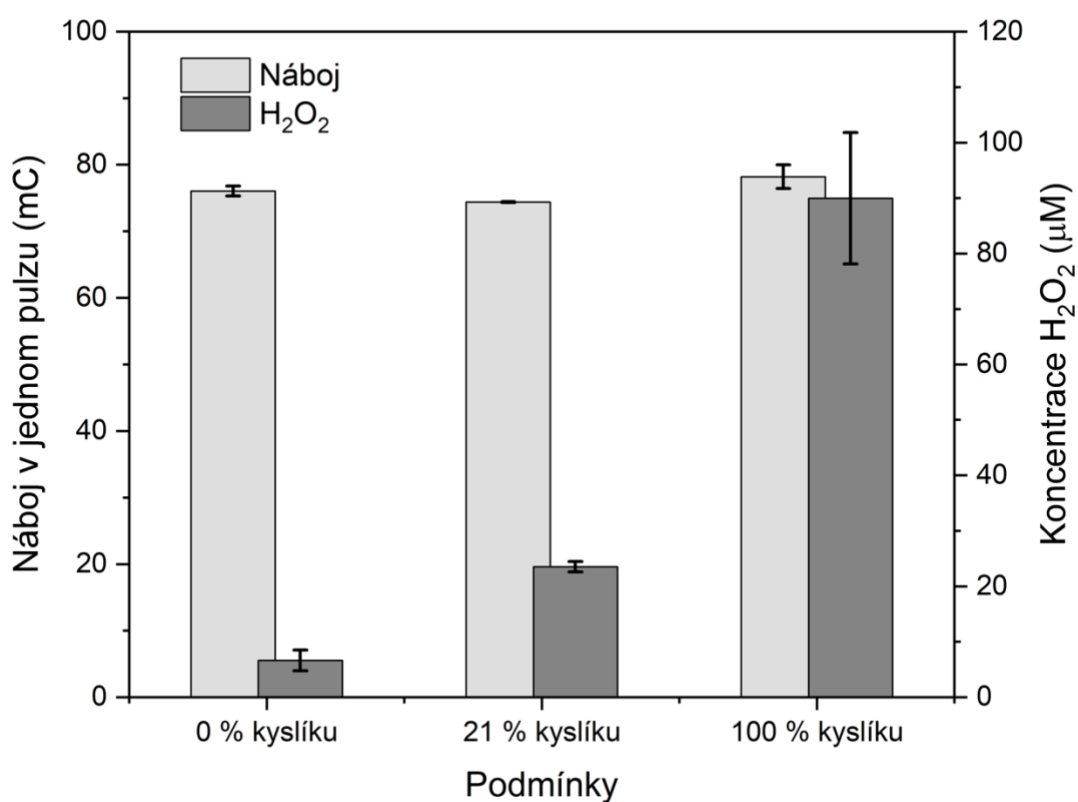
Ve spolupráci s ÚFE byly naplánovány první experimenty elektroporace kvasinek, přičemž bylo jedním z hlavních cílů prověřit metodu detekce elektroporace měřením luminiscence. Díky jejich předchozím zkušenostem bylo nutné upravit složení pufru S1 tak, aby neobsahoval ionty Cl⁻, které v minulosti interferovaly s měřením luminiscence. Byl tedy připraven nový pufr S2: 0,594 mM NaH₂PO₄; 1,403 mM Na₂HPO₄; 250 mM sacharóza. Protokol byl také pozměněn co se týče frekvence aplikovaných pulzů. V dřívějších měřeních byla používána frekvence pulzování 1 Hz, zatímco pro experimenty s kvasinkami bude použita frekvence 2 Hz. Na 400 μl pufru S2 bylo aplikováno 200 pulzů o intenzitě 5 kV/cm, délce 100 μs a frekvenci 2 Hz.



Graf 14 – Závislost náboje v jednom pulzu a koncentrace H₂O₂ na materiálu elektrod v 0,2 cm elektroporační cele. Protokol: 200x 5 kV/cm, 100 μs, 2 Hz, S2, 400 μl. Uvedené výsledky jsou průměrem tří měření se směrodatnou odchylkou.

Jelikož má pufr S2 nižší konduktivitu než pufr S1, došlo k výraznému snížení koncentrací H₂O₂ a dodaných nábojů. U anodizovaného hliníku se podařilo zamezit produkci H₂O₂, v případě klasického a anodizovaného titanu existuje opět určitý rozdíl, došlo však pouze k lehkému snížení koncentrace H₂O₂. PEDOT:PSS na titanu produkuje opět zdaleka nejvíce H₂O₂.

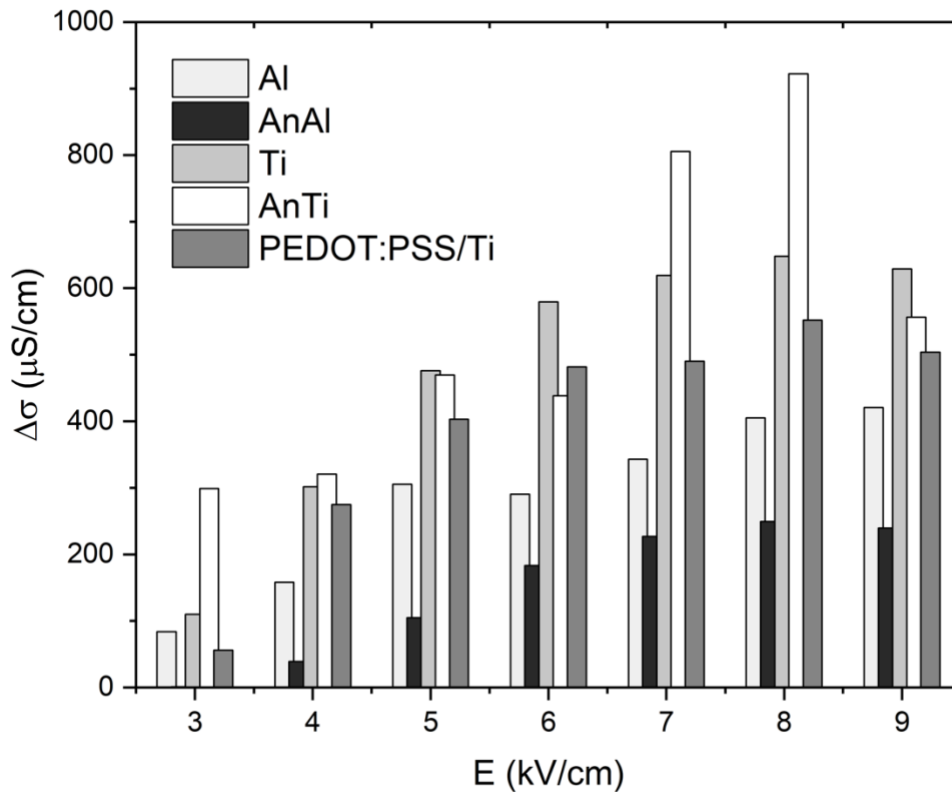
Pro titan s vrstvou PEDOT:PSS byl rovněž proveden experiment pro odhalení hlavního mechanismu tvorby H_2O_2 , jímž může být jak elektrolýza vody, tak redukce kyslíku. Podmínky experimentů byly nastaveny tak, aby byla provedena elektroporace v pufru S2 bez kyslíku, se standardním obsahem kyslíku (21 %) a s úplným nasycením kyslíkem. Pro experiment bez kyslíku byl započat probubláváním pufru S2 dusíkem po dobu 20 minut. Následně byl odkysličený pufr napipetován do elektroporační cely a umístěn do exsikátoru s přetlakem dusíku. V exsikátoru byla cela umístěna po dobu 5 minut, poté byl v exsikátoru spuštěn protokol pulzování a po jeho dokončení byla naměřena koncentrace H_2O_2 . Pro experiment se standardním obsahem byl pufr S2 probubláván vzduchem po dobu 5 minut a následně bylo provedeno pulzování. Pro experiment s úplným nasycením kyslíkem byl pufr S2 probubláván kyslíkem po dobu 20 minut, následně bylo provedeno pulzování (bez exsikátoru).



Graf 15 – Produkce H_2O_2 během pulzování pro titanové elektrody pokryté vrstvou PEDOT:PSS za různých podmínek v 0,2 cm elektroporační cely. Účelem bylo odhalení mechanismu tvorby H_2O_2 . Protokol: 200×5 kV/cm, 100 μs , 2 Hz, S2, 400 μl . Měření bylo provedeno jednou.

Z výsledků jde jasně vidět, že hlavním mechanismem tvorby H_2O_2 jsou ORR. S nejvyšší pravděpodobností však bude docházet k tvorbě H_2O_2 také elektrolýzou vody, což indikují výsledky s pufrům bez kyslíku. V pufru nasyceném kyslíkem byl dle očekávání pozorován výrazný nárůst H_2O_2 .

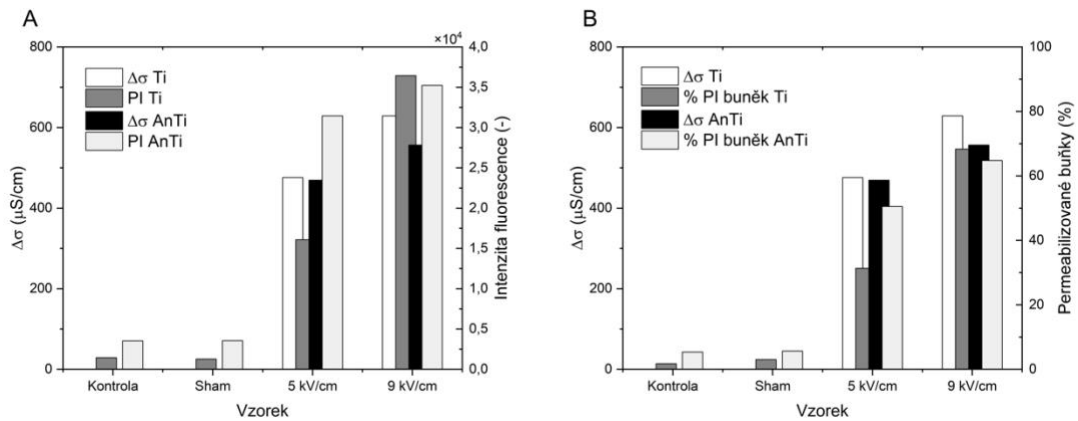
Pro elektroporaci kvasinek byl tedy zvolen pufr S2 a byly provedeny prvotní experimenty s jejich elektroporací, přičemž bylo aplikováno 8 pulzů o intenzitě 3–9 kV/cm, délce 100 μ s, frekvenci 2 Hz v 0,1 cm průhledné elektroporační cele (Obrázek 21). Permeabilizace byla detekována měřením impedance před a po elektroporaci, současně byla provedena detekce měřením luminiscence během pulzování, která ale není součástí této práce, je však součástí společného projektu s ÚFE.



Graf 16 – Rozdíl konduktivity suspenze kvasinek před a po elektroporaci pro různé intenzity elektrického pole a materiály elektrod. Protokol: 8x 3–9 kV/cm, 100 μ s, 2 Hz, suspenze kvasinek v pufru S2, 400 μ l. Měření bylo provedeno jednou.

Z grafu lze vidět, že s intenzitou elektrického pole roste i rozdíl konduktivity elektroporačního pufru před a po elektroporaci, což je způsobeno zvýšenou výměnou látek mezi buňkami a vnějším prostředím. Nejmenší permeabilizace dle těchto výsledků dosahuje anodizovaný hliník, následuje klasický hliník a PEDOT:PSS na titanu. Rozdíl mezi anodizovaným titanem a titanem je neprůkazný, důvodem je chybné měření impedance u anodizovaného titanu. V průběhu měření byl anodizovaný titan několikrát nakontaktován chybně, tedy na vrstvě oxidu, což způsobilo chyby ve výsledcích. Mezi hliníkem a anodizovaným hliníkem je určitý rozdíl, který vyhovuje hypotéze, že ROS mají vliv na účinnost elektroporace. Takový závěr je však v rozporu s výsledky pro titan s vrstvou PEDOT:PSS, kde byla koncentrace H_2O_2 v předchozích měřeních zdaleka nejvyšší. I přesto je rozdíl konduktivity před a po elektroporaci menší než u klasického titanu. Elektroporační práh byl pro hliník při 5 kV/cm a pro titan již při 4 kV/cm, což může být způsobeno rozdíly v dodaném náboji.

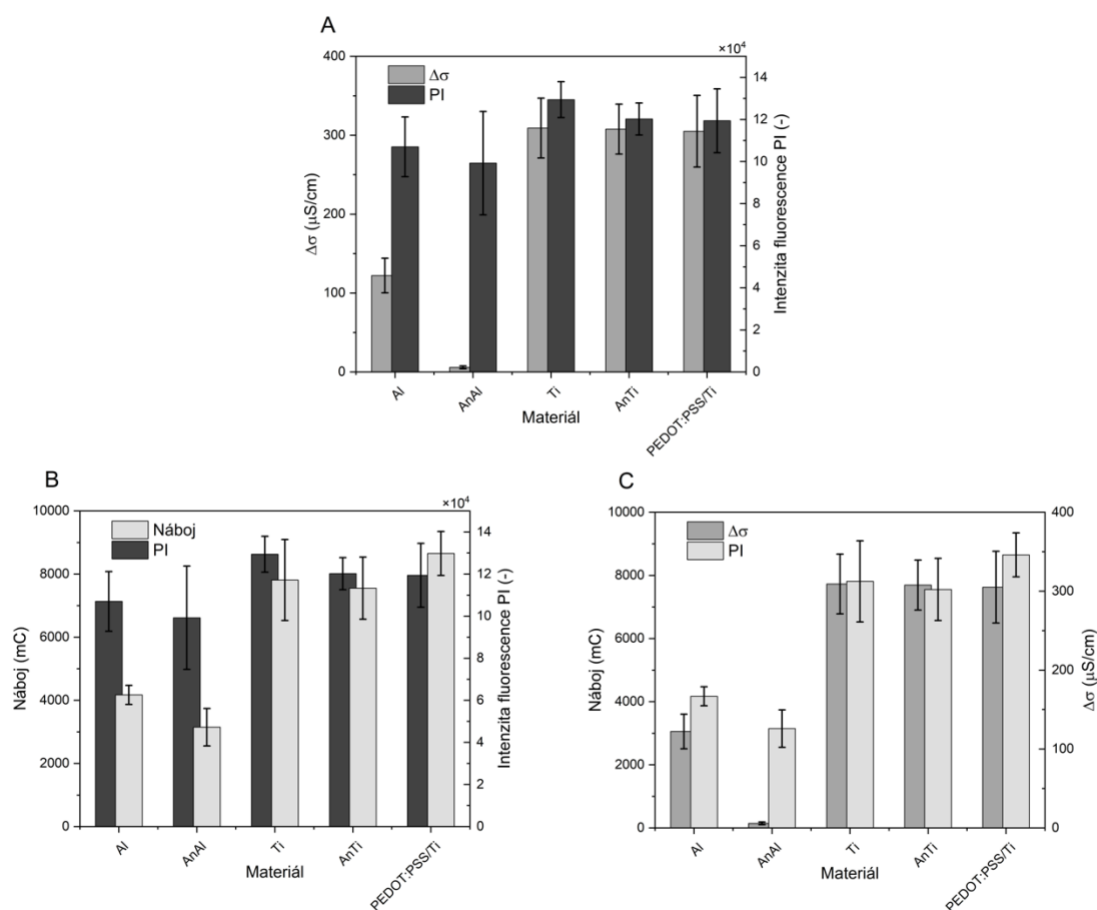
Pro titan a anodizovaný titan byla současně provedena detekce permeabilizace propidium jodidem. Byla měřena „hromadná“ fluorescence vzorků spektrofotometricky a zároveň bylo provedeno zobrazování fluorescenčním mikroskopem, kdy bylo vyjádřeno procento permeabilizovaných buněk. Tyto experimenty byly provedeny pro kontrolu (neelektroporované buňky), tzv. „sham“ (neelektroporované buňky, které byly v kontaktu s elektrodami v elektroprační cele), 5 a 9 kV/cm.



Graf 17 – Detekce permeabilizace měřením fluorescence pro elektrody z titanu a anodizovaného titanu: (A) celková intenzita fluorescence, (B) procento permeabilizovaných buněk spočítaný pod fluorescenčním mikroskopem. Protokol: 8x 5 nebo 9 kV/cm, 100 μs , 2 Hz, suspenze kvasinek v pufru S2, 400 μl . Měření bylo provedeno jednou.

Výsledky jsou zatíženy určitou chybou, která byla způsobena časovou náročností experimentu. Časový interval mezi experimenty s titanem a anodizovaným titanem byl zhruba 2 hodiny, během této doby část kvasinek ztratila svoji viabilitu. Zároveň se jednalo o měření, kdy došlo k chybnému nakontaktování anodizovaného titanu, což způsobilo odchylky ve výsledném rozdílu konduktivit suspenze buněk před a po elektroprači. Díky experimentům provedených na ÚFE bylo získáno potřebné „know-how“ pro kultivaci kvasinek a jejich následnou elektroprači. Zároveň bylo využito technických možností ÚFE, kdy bylo možné dosáhnout vyšších intenzit elektrického pole. Při těchto experimentech bylo provedeno množství chyb, které sloužily jako ponaučení do následujících „ostrých“ experimentů na CEITEC.

Z výsledků na ÚFE byl získán elektroporační práh různých elektrodových materiálů pro *Saccharomyces cerevisiae*, který odpovídá zhruba 5 kV/cm, tato intenzita tedy byla zvolena pro experimenty na CEITEC. Na suspenzi kvasinek v pufru S2 bylo aplikováno 8 pulzů o intenzitě 5 kV/cm, délce 100 μ s, frekvenci 2 Hz v 0,1 cm průhledné elektroporační cele (Obrázek 21). Permeabilizace byla detekována měřením impedance před a po elektroporaci společně s měřením fluorescence PI dopraveného do buňky.



Graf 18 – (A) Závislost rozdílu konduktivity suspenze kvasinek před a po elektroporaci a intenzity fluorescence PI na materiálu elektrod, (B) závislost náboje dodaného během elektroporace a intenzity fluorescence PI na materiálu elektrod, (C) závislost náboje dodaného během elektroporace a rozdílu konduktivity suspenze kvasinek před a po elektroporaci na materiálu elektrod. Protokol: 8x 5 kV/cm, 100 μ s, 2 Hz, suspenze kvasinek v pufru S2, 400 μ l. Uvedené výsledky jsou průměrem tří měření se směrodatnou odchylkou.

Z výsledků jsou patrné určité rozdíly mezi elektrodovými materiály, které ale nekorelují s produkcí ROS. Elektroporace pro titanové elektrody byla v podstatě srovnatelná v rámci směrodatné odchylky. U anodizovaného hliníku je rozdíl způsoben hlavně celkovým dodaným nábojem. Co je však zajímavé, je rozdíl mezi detekcí měřením impedance a fluorescence pro anodizovaný hliník. Ačkoliv byl rozdíl konduktivity před a po elektroporaci v podstatě zanedbatelný, stále došlo k výraznému nárůstu fluorescence PI, který souvisí s dopravením této molekuly do intracelulárního prostředí kvasinek. Ztráta intracelulárních molekul během elektroporace je důvodem, proč je možné detekovat elektroporaci měřením impedance, rovněž však souvisí se ztrátou viability buněk [62]. Anodizací hliníku tak bylo umožněno zachovat dostatečnou permeabilizaci k dopravení značného množství PI do buněk za současné minimální ztráty látek nezbytných k udržení viability. Elektrody z anodizovaného hliníku jsou zároveň materiálem, u kterého bylo

opakovaně zamezeno produkci H_2O_2 , obecně ROS, které souvisí s oxidativním stresem a ztrátou viability. Kombinace minimální ztráty intracelulárních molekul společně se zamezením produkce ROS během elektroporace, by mohla výrazně navýšit účinnost reverzibilní elektroporace (GET, ...). Elektrody z titanu s vrstvou PEDOT:PSS byly stabilním producentem vysokého množství H_2O_2 (ROS). Jak již bylo zmíněno, membrány nádorových buněk jsou více náchylné k peroxidaci lipidů, která je důsledkem působení ROS a příčinou ztráty viability. Titan s vrstvou PEDOT:PSS se tak stává perspektivním materiálem pro ablaci nádorů ireverzibilní elektroporací metodami N-TIRE nebo H-FIRE. Ačkoliv není působení ROS hlavním mechanismem elektroporace, stále mohou být zodpovědné za přetrvání permeabilizace po skončení elektroporace a ovlivňovat tak kinetiku uzavírání pórů. Pravděpodobně budou mít určitý vliv také na viabilitu buněk, jejíž ztráta představuje jeden z hlavních problémů reverzibilní elektroporace. Z účinku ROS na viabilitu buněk však může těžit ireverzibilní elektroporace. Fabrikací elektrod s různou produkcí ROS je tedy možné napomoci dosažení požadovaného výsledku elektroporace.

4 Závěr

Byla měřena koncentrace H_2O_2 (jakožto zástupce ROS) po elektroporaci za použití standardních elektroporačních pufrů, protokolů a různých elektrodových materiálů. Přičemž byly použity elektrody s různou produkcí H_2O_2 . Té bylo dosaženo úpravou povrchu elektrod – anodizací pro její snížení a nanesením vrstvy PEDOT:PSS pro její navýšení. Na základě těchto výsledků byl ve spolupráci s ÚFE optimalizován protokol pro *in vitro* elektroporaci kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Byla provedena série elektroporací kvasinek za použití již zmíněných materiálů a standardních protokolů. Porovnáním produkce H_2O_2 a účinnosti elektroporace kvasinek pro různé elektrodové materiály bylo zjištěno, že hlavním mechanismem elektroporace je působení elektrického pole, přesněji náboj dodaný během elektroporace. Faradaické procesy a působení ROS tak nejsou stěžejní pro účinnou permeabilizaci buněčné membrány během pulzování.

Ačkoliv není působení ROS hlavním mechanismem elektroporace, stále může být zodpovědné za přetrvání permeabilizace po skončení elektroporace a ovlivňovat tak kinetiku uzavírání pórů. Možný je i vliv na viabilitu buněk, jejíž ztráta představuje jeden z hlavních problémů reverzibilní elektroporace. Z účinku ROS na viabilitu buněk však může těžit ireverzibilní elektroporace. Výběr vhodného elektrodového materiálu pro požadovaný výsledek elektroporace by tak mohl být jedním z důležitých parametrů ovlivňujících elektroporaci.

5 Seznam použité literatury

- [1] YARMUSH, Martin L., Alexander GOLBERG, Gregor SERŠA, Tadej KOTNIK a Damijan MIKLAVČIČ. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. *Annual Review of Biomedical Engineering* [online]. 2014, **16**(1), 295–320. ISSN 1523-9829. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-bioeng-071813-104622
- [2] KOTNIK, Tadej, Wolfgang FREY, Martin SACK, Saša HABERL MEGLIČ, Matjaž PETERKA a Damijan MIKLAVČIČ. Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology* [online]. 2015, **33**(8), 480–488. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2015.06.002
- [3] ROLONG, Andrea, Rafael V. DAVALOS a Boris RUBINSKY. History of Electroporation. In: *Irreversible Electroporation in Clinical Practice* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2018, s. 13–37. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-55113-5_2
- [4] POTTER, Huntington. Transfection by Electroporation. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. 2003, **62**(1). ISSN 1934-3639. Dostupné z: doi:10.1002/0471142727.mb0903s62
- [5] KOTNIK, Tadej, Lea REMS, Mounir TAREK a Damijan MIKLAVČIČ. Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models. *Annual Review of Biophysics* [online]. 2019, **48**(1), 63–91. ISSN 1936-122X. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biophys-052118-115451
- [6] WASSERMANN, Klemens J., Sven BARTH, Franz KEPLINGER, Christa NOEHAMMER a Johannes R. PEHAM. High- k Dielectric Passivation: Novel Considerations Enabling Cell Specific Lysis Induced by Electric Fields. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2016, **8**(33), 21228–21235. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.6b06927
- [7] YOUNG, Jennifer L. a David A. DEAN. Electroporation-Mediated Gene Delivery. In: [online]. 2015, s. 49–88. Dostupné z: doi:10.1016/bs.adgen.2014.10.003
- [8] DE VRY, Jochen, Pilar MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, Mario LOSEN, Gerard H BODE, Yasin TEMEL, Thomas STECKLER, Harry W M STEINBUSCH, Marc DE BAETS a Jos PRICKAERTS. Low Current-driven Micro-electroporation Allows Efficient In Vivo Delivery of Nonviral DNA into the Adult Mouse Brain. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* [online]. 2010, **18**(6), 1183–91. ISSN 1525-0024. Dostupné z: doi:10.1038/mt.2010.62
- [9] CHAU, Chalmers, Paolo ACTIS a Eric HEWITT. Methods for protein delivery into cells: from current approaches to future perspectives. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2020, **48**(2), 357–365. ISSN 0300-5127. Dostupné z: doi:10.1042/BST20190039
- [10] MARTÍNEZ, J.M., V. ABAD, J. QUÍLEZ, J. RASO, G. CEBRIÁN a I. ÁLVAREZ-LANZAROTE. Pulsed Electric Fields (PEF) applications in the inactivation of parasites in food. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2023, **138**, 470–479. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2023.06.030
- [11] TIMMERMANS, R.A.H., H.C. MASTWIJK, L.B.J.M. BERENDSEN, A.L. NEDERHOFF, A.M. MATSER, M.A.J.S. VAN BOEKEL a M.N. NIEROP GROOT. Moderate intensity Pulsed Electric Fields (PEF) as alternative mild preservation technology for fruit juice. *International Journal of Food*

- Microbiology* [online]. 2019, **298**, 63–73. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.015
- [12] SALEHI, Fakhreddin. Physico-chemical properties of fruit and vegetable juices as affected by pulsed electric field: a review. *International Journal of Food Properties* [online]. 2020, **23**(1), 1036–1050. ISSN 1094-2912. Dostupné z: doi:10.1080/10942912.2020.1775250
- [13] NOWOSAD, Karolina, Monika SUJKA, Urszula PANKIEWICZ a Radosław KOWALSKI. The application of PEF technology in food processing and human nutrition. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2021, **58**(2), 397–411. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-020-04512-4
- [14] TSONG, T.Y. Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal* [online]. 1991, **60**(2), 297–306. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(91)82054-9
- [15] WALLACE, Mark, Barbara EVANS, Sandra WOODS, Robin MOGG, Lei ZHANG, Adam C FINNEFROCK, Dietmar RABUSSAY, Michael FONS, John MALLEE, Devan MEHROTRA, Florian SCHÖDEL a Luwy MUSEY. Tolerability of Two Sequential Electroporation Treatments Using MedPulser DNA Delivery System (DDS) in Healthy Adults. *Molecular Therapy* [online]. 2009, **17**(5), 922–928. ISSN 15250016. Dostupné z: doi:10.1038/mt.2009.27
- [16] ZIMMERMANN, U., J. SCHULZ a G. PILWAT. Transcellular Ion Flow in *Escherichia coli* B and Electrical Sizing of Bacterias. *Biophysical Journal* [online]. 1973, **13**(10), 1005–1013. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(73)86041-2
- [17] ZIMMERMANN, U., G. PILWAT a F. RIEMANN. Dielectric Breakdown of Cell Membranes. *Biophysical Journal* [online]. 1974, **14**(11), 881–899. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(74)85956-4
- [18] KOTNIK, Tadej. Lightning-triggered electroporation and electrofusion as possible contributors to natural horizontal gene transfer. *Physics of Life Reviews* [online]. 2013, **10**(3), 351–370. ISSN 15710645. Dostupné z: doi:10.1016/j.plrev.2013.05.001
- [19] KRANJC, Matej a Damijan MIKLAVČIČ. Electric Field Distribution and Electroporation Threshold. In: *Handbook of Electroporation* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 1043–1058. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-32886-7_4
- [20] JI, Ming-hui, Jia-hao XU, Sha-sha YUAN, Ya-wen LIU, Xin-yi XING, Chao JIANG, Liang XUE, Chuan-kai YANG, Feng-hong CHU a You-hua JIANG. The molecular mechanism of electroporation: Changes in the hydrogen bonds. *Computational and Theoretical Chemistry* [online]. 2022, **1207**, 113487. ISSN 2210271X. Dostupné z: doi:10.1016/j.comptc.2021.113487
- [21] TIELEMAN, D. Peter. The molecular basis of electroporation. *BMC Biochemistry* [online]. 2004, **5**, 1–12. ISSN 14712091. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2091-5-10
- [22] REMS, Lea, Marilyn VIANO, Marina A. KASIMOVA, Damijan MIKLAVČIČ a Mounir TAREK. The contribution of lipid peroxidation to membrane permeability in electropermeabilization: A molecular dynamics study. *Bioelectrochemistry* [online]. 2019, **125**, 46–57. ISSN 1878562X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2018.07.018
- [23] NOVICKIJ, Vitalij, Nina REMBIAŁKOWSKA, Paulina KASPERKIEWICZ-WASILEWSKA, Dagmara BACZYŃSKA, Adam RZETCHONEK, Piotr BŁASIAK a

- Julita KULBACKA. Pulsed electric fields with calcium ions stimulate oxidative alternations and lipid peroxidation in human non-small cell lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2022, **1864**(12), 184055. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2022.184055
- [24] BENOVA, L. C., Antonov, P.A., Ribarov, S.R. Oxidative damage of the membrane lipids after electroporation. *General physiology and biophysics*. 1994, **13**, 85–97.
- [25] MACCARRONE, M., M.R. BLADERGROEN, N. ROSATO a A.F. AGRO. Role of Lipid Peroxidation in Electroporation-Induced Cell Permeability. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1995, **209**(2), 417–425. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.1995.1519
- [26] BALANTIČ, Katja, Victor U. WEISS, Ernst PITTENAUER, Damijan MIKLAVČIČ a Peter KRAMAR. The role of lipid oxidation on electrical properties of planar lipid bilayers and its importance for understanding electroporation. *Bioelectrochemistry* [online]. 2023, **153**, 108498. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2023.108498
- [27] MACCARRONE, M., N. ROSATO a A.F. AGRO. Electroporation Enhances Cell Membrane Peroxidation and Luminescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1995, **206**(1), 238–245. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.1995.1033
- [28] BRETON, Marie a Lluís M. MIR. Investigation of the chemical mechanisms involved in the electropulsation of membranes at the molecular level. *Bioelectrochemistry* [online]. 2018, **119**, 76–83. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2017.09.005
- [29] HUANG, Feiran, Zhihui FANG, Jason MAST a Wei CHEN. Comparison of membrane electroporation and protein denature in response to pulsed electric field with different durations. *Bioelectromagnetics* [online]. 2013, **34**(4), 253–263. ISSN 0197-8462. Dostupné z: doi:10.1002/bem.21773
- [30] GOUAUX, Eric a Roderick MACKINNON. Principles of Selective Ion Transport in Channels and Pumps. *Science* [online]. 2005, **310**(5753), 1461–1465. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1113666
- [31] CHRYSAFIDES, Steven M., Stephen J. BORDES a Sandeep SHARMA. *Physiology, Resting Potential*. 2024.
- [32] VACATA, Vladimir, Arnošt KOTYK a Karel SIGLER. Membrane potential in yeast cells measured by direct and indirect methods. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 1981, **643**(1), 265–268. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2736(81)90241-8
- [33] GRIDER, Michael H., Rishita JESSU a Rian KABIR. *Physiology, Action Potential*. 2024.
- [34] KOTNIK, Tadej, Gorazd PUCIHAR a Damijan MIKLAVČIČ. Induced Transmembrane Voltage and Its Correlation with Electroporation-Mediated Molecular Transport. *The Journal of Membrane Biology* [online]. 2010, **236**(1), 3–13. ISSN 0022-2631. Dostupné z: doi:10.1007/s00232-010-9279-9
- [35] LEVINE, Zachary A. a P. Thomas VERNIER. Life cycle of an electropore: Field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation. *Journal of Membrane Biology* [online]. 2010, **236**(1), 27–36. ISSN 00222631. Dostupné z: doi:10.1007/s00232-010-9277-y

- [36] KRASSOWSKA, Wanda a Petar D. FILEV. Modeling Electroporation in a Single Cell. *Biophysical Journal* [online]. 2007, **92**(2), 404–417. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1529/biophysj.106.094235
- [37] GIANULIS, Elena C. a Andrei G. PAKHOMOV. Experimental Determination of Lipid Electropore Size. In: *Handbook of Electroporation* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 187–200. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-32886-7_114
- [38] SAULIS, Gintautas a Rita SAULE. Size of the pores created by an electric pulse: Microsecond vs millisecond pulses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2012, **1818**(12), 3032–3039 [vid. 2024-03-19]. ISSN 0005-2736. Dostupné z: doi:10.1016/j.BBAMEM.2012.06.018
- [39] DELEMOTTE, Lucie a Mounir TAREK. Molecular Dynamics Simulations of Lipid Membrane Electroporation. *The Journal of Membrane Biology* [online]. 2012, **245**(9), 531–543. ISSN 0022-2631. Dostupné z: doi:10.1007/s00232-012-9434-6
- [40] TOKMAN, Mayya, Jane Hyojin LEE, Zachary A. LEVINE, Ming-Chak HO, Michael E. COLVIN a P. Thomas VERNIER. Electric Field-Driven Water Dipoles: Nanoscale Architecture of Electroporation. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(4), e61111. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0061111
- [41] WONG, Tai-Kin a Eberhard NEUMANN. Electric field mediated gene transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1982, **107**(2), 584–587. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(82)91531-5
- [42] BATES, George W., John J. GAYNOR a Narpal S. SHEKHAWAT. Fusion of Plant Protoplasts by Electric Fields. *Plant Physiology* [online]. 1983, **72**(4), 1110–1113. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.72.4.1110
- [43] BISCHOFF, R., R.M. EISERT, I. SCHEDEL, J. VIENKEN a U. ZIMMERMAN. Human hybridoma cells produced by electro-fusion. *FEBS Letters* [online]. 1982, **147**(1), 64–68. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(82)81012-0
- [44] KANDUŠER, Maša a Marko UŠAJ. Cell electrofusion: past and future perspectives for antibody production and cancer cell vaccines. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2014, **11**(12), 1885–1898. ISSN 1742-5247. Dostupné z: doi:10.1517/17425247.2014.938632
- [45] MIR, Lluís M. Therapeutic perspectives of in vivo cell electropermeabilization. *Bioelectrochemistry* [online]. 2001, **53**(1), 1–10. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/S0302-4598(00)00112-4
- [46] MIR, L M, M BELEHRADEK, C DOMENGE, S ORLOWSKI, B PODDEVIN, J BELEHRADEK, G SCHWAAB, B LUBOINSKI a C PAOLETTI. [Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* [online]. 1991, **313**(13), 613–618. ISSN 0764-4469. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/MED/1723647>
- [47] MARTY, Michel, Gregor SERSA, Jean Rémi GARBAY, Julie GEHL, Christopher G. COLLINS, Marko SNOJ, Valérie BILLARD, Poul F. GEERTSEN, John O. LARKIN, Damijan MIKLAVCIC, Ivan PAVLOVIC, Snezna M. PAULIN-KOSIR, Maja CEMAZAR, Nassim MORSLI, Declan M. SODEN, Zvonimir RUDOLF, Caroline ROBERT, Gerald C. O'SULLIVAN a Lluís M. MIR.

- Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *European Journal of Cancer Supplements* [online]. 2006, **4**(11), 3–13. ISSN 13596349. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejcsup.2006.08.002
- [48] DAVALOS, R. V., L. M. MIR a B. RUBINSKY. Tissue Ablation with Irreversible Electroporation. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 2005, **33**(2), 223–231. ISSN 0090-6964. Dostupné z: doi:10.1007/s10439-005-8981-8
- [49] AL-SAKERE, Bassim, Franck ANDRÉ, Claire BERNAT, Elisabeth CONNAULT, Paule OPOLON, Rafael V. DAVALOS, Boris RUBINSKY a Lluís M. MIR. Tumor Ablation with Irreversible Electroporation. *PLoS ONE* [online]. 2007, **2**(11), e1135. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0001135
- [50] ARENA, Christopher B., Michael B. SANO, John H. ROSSMEISL, John L. CALDWELL, Paulo A. GARCIA, Marissa N. RYLANDER a Rafael V. DAVALOS. High-frequency irreversible electroporation (H-FIRE) for non-thermal ablation without muscle contraction. *BioMedical Engineering Online* [online]. 2011, **10**. ISSN 1475925X. Dostupné z: doi:10.1186/1475-925X-10-102
- [51] BHONSLE, Suyashree P, Christopher B ARENA, Daniel C SWEENEY a Rafael V DAVALOS. Mitigation of impedance changes due to electroporation therapy using bursts of high-frequency bipolar pulses. *BioMedical Engineering OnLine* [online]. 2015, **14**(Suppl 3), S3. ISSN 1475-925X. Dostupné z: doi:10.1186/1475-925X-14-S3-S3
- [52] SANO, Michael B., Richard E. FAN a Lei XING. Asymmetric Waveforms Decrease Lethal Thresholds in High Frequency Irreversible Electroporation Therapies. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep40747
- [53] NOVICKIJ, Vitalij, Nina REMBIAŁKOWSKA, Wojciech SZLASA a Julita KULBACKA. Does the shape of the electric pulse matter in electroporation? *Frontiers in Oncology* [online]. 2022, **12**. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2022.958128
- [54] SUNDARARAJAN, Raji. Nanosecond Electroporation: Another Look. *Molecular Biotechnology* [online]. 2009, **41**(1), 69–82. ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi:10.1007/s12033-008-9107-y
- [55] KOTNIK, Tadej a Damijan MIKLAVČIČ. Theoretical Evaluation of Voltage Inducement on Internal Membranes of Biological Cells Exposed to Electric Fields. *Biophysical Journal* [online]. 2006, **90**(2), 480–491. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1529/biophysj.105.070771
- [56] WEAVER, James C., Kyle C. SMITH, Axel T. ESSER, Reuben S. SON a T.R. GOWRISHANKAR. A brief overview of electroporation pulse strength–duration space: A region where additional intracellular effects are expected. *Bioelectrochemistry* [online]. 2012, **87**, 236–243. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2012.02.007
- [57] *Sigma-Aldrich® electroporation cuvettes* [online]. 2024 [vid. 2024-05-08]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/substance/sigmaaldrichelectroporationcuvettes1234598765>
- [58] OLOFSSON, Jessica, Kerstin NOLKRANTZ, Frida RYTTSÉN, Bradley A LAMBIE, Stephen G WEBER a Owe ORWAR. Single-cell electroporation. *Current*

- Opinion in Biotechnology* [online]. 2003, **14**(1), 29–34. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/S0958-1669(02)00003-4
- [59] KANG, Wonmo, Fazel YAVARI, Majid MINARY-JOLANDAN, Juan P. GIRALDO-VELA, Asmahan SAFI, Rebecca L. MCNAUGHTON, Victor PARPOIL a Horacio D. ESPINOSA. Nanofountain Probe Electroporation (NFP-E) of Single Cells. *Nano Letters* [online]. 2013, **13**(6), 2448–2457. ISSN 1530-6984. Dostupné z: doi:10.1021/nl400423c
- [60] SHERBA, Joseph J., Stephen HOGQUIST, Hao LIN, Jerry W. SHAN, David I. SHREIBER a Jeffrey D. ZAHN. The effects of electroporation buffer composition on cell viability and electro-transfection efficiency. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1), 3053. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-59790-x
- [61] BATISTA NAPOTNIK, Tina a Damijan MIKLAVČIČ. In vitro electroporation detection methods – An overview. *Bioelectrochemistry* [online]. 2018, **120**, 166–182. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2017.12.005
- [62] JAKSTYS, Baltramiejus, Milda JAKUTAVICIUTE, Dovile UZDAVINYTE, Ingrida SATKAUSKIENE a Saulius SATKAUSKAS. Correlation between the loss of intracellular molecules and cell viability after cell electroporation. *Bioelectrochemistry* [online]. 2020, **135**, 107550. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2020.107550
- [63] BATISTA NAPOTNIK, Tina, Tamara POLAJŽER a Damijan MIKLAVČIČ. Cell death due to electroporation – A review. *Bioelectrochemistry* [online]. 2021, **141**, 107871. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2021.107871
- [64] GRAHAME, David C. Fiftieth Anniversary: Mathematical Theory of the Faradaic Admittance. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. 1952, **99**(12), 370C. ISSN 00134651. Dostupné z: doi:10.1149/1.2779638
- [65] DU, Haiwei, Xi LIN, Zhemi XU a Dewei CHU. Electric double-layer transistors: a review of recent progress. *Journal of Materials Science* [online]. 2015, **50**(17), 5641–5673. ISSN 0022-2461. Dostupné z: doi:10.1007/s10853-015-9121-y
- [66] MERRILL, Daniel R., Marom BIKSON a John G.R. JEFFERYS. Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. 2005, **141**(2), 171–198. ISSN 01650270. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneumeth.2004.10.020
- [67] BIESHEUVEL, P. M., S. PORADA a J. E. DYKSTRA. The difference between Faradaic and non-Faradaic electrode processes [online]. 2018. Dostupné z: <http://arxiv.org/abs/1809.02930>
- [68] EHLICH, Jiří, Ludovico MIGLIACCIO, Ihor SAHALIANOV, Marta NIKIĆ, Jan BRODSKÝ, Imrich GABLECH, Xuan Thang VU, Sven INGEBRANDT a Eric Daniel GŁOWACKI. Direct measurement of oxygen reduction reactions at neurostimulation electrodes. *Journal of Neural Engineering* [online]. 2022, **19**(3), 036045. ISSN 1741-2560. Dostupné z: doi:10.1088/1741-2552/ac77c0
- [69] EXNER, Kai S. Steering Selectivity in the Four-Electron and Two-Electron Oxygen Reduction Reactions: On the Importance of the Volcano Slope. *ACS Physical Chemistry Au* [online]. 2023, **3**(2), 190–198. ISSN 2694-2445. Dostupné z: doi:10.1021/acspchemau.2c00054

- [70] NONGRUMY, Natasha A. a Mayashree B. SYIEM. Effects of Copper Ion (Cu²⁺) on the Physiological and Biochemical Activities of the Cyanobacterium *Nostoc ANTH*. *Environmental Engineering Research* [online]. 2012, 63–67. ISSN 1226-1025. Dostupné z: doi:10.4491/eer.2012.17.S1.S63
- [71] LIU, Yong a Jianlong WANG. Multivalent metal catalysts in Fenton/Fenton-like oxidation system: A critical review. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2023, **466**, 143147. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2023.143147
- [72] HONG, Yan, Qi WANG, Ziwang KAN, Yushuo ZHANG, Jing GUO, Siqi LI, Song LIU a Bin LI. Recent progress in advanced catalysts for electrochemical nitrogen reduction reaction to ammonia. *Chinese Journal of Catalysis* [online]. 2023, **52**, 50–78. ISSN 18722067. Dostupné z: doi:10.1016/S1872-2067(23)64504-8
- [73] LIU, Xinyu a Jianlong WANG. Selective oxidation of ammonium to nitrogen gas by advanced oxidation processes: Reactive species and oxidation mechanisms. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2023, **11**(3), 110263. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2023.110263
- [74] MACHALA, Z, B TARABOVÁ, D SERSENOVÁ, M JANDA a K HENSEL. Chemical and antibacterial effects of plasma activated water: correlation with gaseous and aqueous reactive oxygen and nitrogen species, plasma sources and air flow conditions. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2019, **52**(3), 034002. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6463/aae807
- [75] JAKUBCZYK, Karolina, Karolina DEC, Justyna KAŁDUŃSKA, Dorota KAWCZUGA, Joanna KOCHMAN a Katarzyna JANDA. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. 2020, **48**(284), 124–127. ISSN 1426-9686.
- [76] BARDAWEEL, Sanaa K., Mustafa GUL, Muhammad ALZWEIRI, Aman ISHAQAT, Husam A. ALSALAMAT a Rasha M. BASHATWAH. Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. *The Eurasian Journal of Medicine* [online]. 2018, **50**(3), 193–201. ISSN 13088734. Dostupné z: doi:10.5152/eurasianjmed.2018.17397
- [77] RAY, Paul D., Bo-Wen HUANG a Yoshiaki TSUJI. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* [online]. 2012, **24**(5), 981–990. ISSN 08986568. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008
- [78] IZYUMOV, D. S., L. V. DOMNINA, O. K. NEPRYAKHINA, A. V. AVETISYAN, S. A. GOLYSHEV, O. Y. IVANOVA, M. V. KOROTETSKAYA, K. G. LYAMZAEV, O. Y. PLETJUSHKINA, E. N. POPOVA a B. V. CHERNYAK. Mitochondria as source of reactive oxygen species under oxidative stress. Study with novel mitochondria-targeted antioxidants — the “Skulachev-ion” derivatives. *Biochemistry (Moscow)* [online]. 2010, **75**(2), 123–129. ISSN 0006-2979. Dostupné z: doi:10.1134/S000629791002001X
- [79] SIES, Helmut a Dean P. JONES. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2020, **21**(7), 363–383. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/s41580-020-0230-3

- [80] SCANDALIOS, John G. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2002, **27**(9), 483–486. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/S0968-0004(02)02170-9
- [81] RUZGYS, Paulius, Vitalij NOVICKIJ, Jurij NOVICKIJ a Saulius ŠATKAUSKAS. Influence of the electrode material on ROS generation and electroporation efficiency in low and high frequency nanosecond pulse range. *Bioelectrochemistry* [online]. 2019, **127**, 87–93. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2019.02.002
- [82] BOUR, Aurélien, Sergei G. KRUGLIK, Morgan CHABANON, Padmini RANGAMANI, Nicolas PUFF a Stephanie BONNEAU. Lipid Unsaturation Properties Govern the Sensitivity of Membranes to Photoinduced Oxidative Stress. *Biophysical Journal* [online]. 2019, **116**(5), 910–920. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2019.01.033
- [83] NAM, Tae-Gyu. Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. *Toxicological Research* [online]. 2011, **27**(1), 1–6. ISSN 1976-8257. Dostupné z: doi:10.5487/TR.2011.27.1.001
- [84] YIN, Huiyong, Libin XU a Ned A. PORTER. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews* [online]. 2011, **111**(10), 5944–5972. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr200084z
- [85] NIKI, Etsuo, Yasukazu YOSHIDA, Yoshiro SAITO a Noriko NOGUCHI. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2005, **338**(1), 668–676. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.072
- [86] REIS, Ana a Corinne M. SPICKETT. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2012, **1818**(10), 2374–2387. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2012.02.002
- [87] AYALA, Antonio, Mario F. MUÑOZ a Sandro ARGÜELLES. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2014, **2014**, 1–31. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2014/360438
- [88] YUSUPOV, M., J. VAN DER PAAL, E.C. NEYTS a A. BOGAERTS. Synergistic effect of electric field and lipid oxidation on the permeability of cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2017, **1861**(4), 839–847. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2017.01.030
- [89] TIVIG, Ioan, Mihaela G. MOISESCU a Tudor SAVOPOL. Changes in the packing of bilayer lipids triggered by electroporation: real-time measurements on cells in suspension. *Bioelectrochemistry* [online]. 2021, **138**, 107689. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2020.107689
- [90] MICHEL, Olga, Andrei G. PAKHOMOV, Maura CASCIOLA, Jolanta SACZKO, Julita KULBACKA a Olga N. PAKHOMOVA. Electropermeabilization does not correlate with plasma membrane lipid oxidation. *Bioelectrochemistry* [online]. 2020, **132**, 107433. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2019.107433
- [91] VAN DER PAAL, Jonas, Erik C. NEYTS, Christof C. W. VERLACKT a Annemie BOGAERTS. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress. *Chemical Science* [online].

- 2016, **7**(1), 489–498. ISSN 2041-6520. Dostupné z: doi:10.1039/C5SC02311D
- [92] WICZEW, Daniel, Natalia SZULC a Mounir TAREK. Molecular dynamics simulations of the effects of lipid oxidation on the permeability of cell membranes. *Bioelectrochemistry* [online]. 2021, **141**, 107869. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2021.107869
- [93] BERETA, Martin, Michal TEPLAN, Tomáš ZAKAR, Hoang VUVIET, Michal CIFRA a Djamel Eddine CHAFAI. Biological autoluminescence enables effective monitoring of yeast cell electroporation. *Biotechnology Journal* [online]. 2024, **19**(4). ISSN 1860-6768. Dostupné z: doi:10.1002/biot.202300475
- [94] GRYSZEL, Maciej, GLOWACKI ERIC, JAKEŠOVÁ MARIE a MIGLIACCIO LUDOVICO. The HRP-TMB optical hydrogen peroxide assay how-to. *CEITEC* [online]. 2021. Dostupné z: <https://www.ceitec.eu/bioelectronics-materials-and-devices/rg375/tab?tabId=169>
- [95] RUTA, Lavinia Liliana, Ya-Fen LIN, Ralph KISSEN, Ioana NICOLAU, Aurora Daniela NEAGOE, Simona GHENEA, Atle M. BONES a Ileana Cornelia FARCASANU. Anchoring plant metallothioneins to the inner face of the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* cells leads to heavy metal accumulation. *PLOS ONE* [online]. 2017, **12**(5), e0178393. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0178393

6 Seznam použitých zkratek

Zkratka	Definice
AC	Střídavý
AnAl	anodizovaný hliník
AnTi	anodizovaný titan
AP	akční potenciál
ATP	adenosintrifosfát
AV ČR	Akademie věd České republiky
CEITEC	Středoevropský technologický institut
CRISPR	segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitivních sekvencí
DBSA	dodecylbenzensulfonová kyselina
DC	Stejnoseměrný
DI voda/diH ₂ O	deionizovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
ECT	elektrochemoterapie
EDLC	jednoduchý elektrický kondenzátor s nábojovou dvojvrstvou
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
EP	elektroporace
FITC	fluorescein isothiokyanát
GET	genový elektrotransfer
GOPS	(3-glycidylxypropyl)-trimethoxysiloxan
H-FIRE	vysokofrekvenční ireverzibilní elektroporace
HGT	horizontální genový transfer
HRP	křenová peroxidáza

IHP	vnitřní Helmholtzova rovina
IMP	indukovaný membránový potenciál
IRE	ireverzibilní elektroporace
MD	molekulárně-dynamické
NHE	normální vodíková elektroda
N-TIRE	netermální ireverzibilní elektroporace
OD600	optická hustota při vlnové délce 600 nm
ORR	redukční reakce kyslíku
PBS	fosfátový pufr
PDMS	polydimethylsiloxan
PEF	pulzní elektrické pole
PEDOT:PSS	poly(3,4-ethylenedioxythiofen):polystyrenulfonát
PEDOT:PSS/Ti	titan s vrstvou PEDOT:PSS
PI	propidium jodid
PMMA	polymethamethakrylát
RE	reverzibilní elektroporace
RNA	ribonukleová kyselina
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RP	klidový membránový potenciál
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TMV	transmembránové napětí
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
TRITC	tetramethylrhodamin
XRF	rentgenová fluorescenční spektroskopie

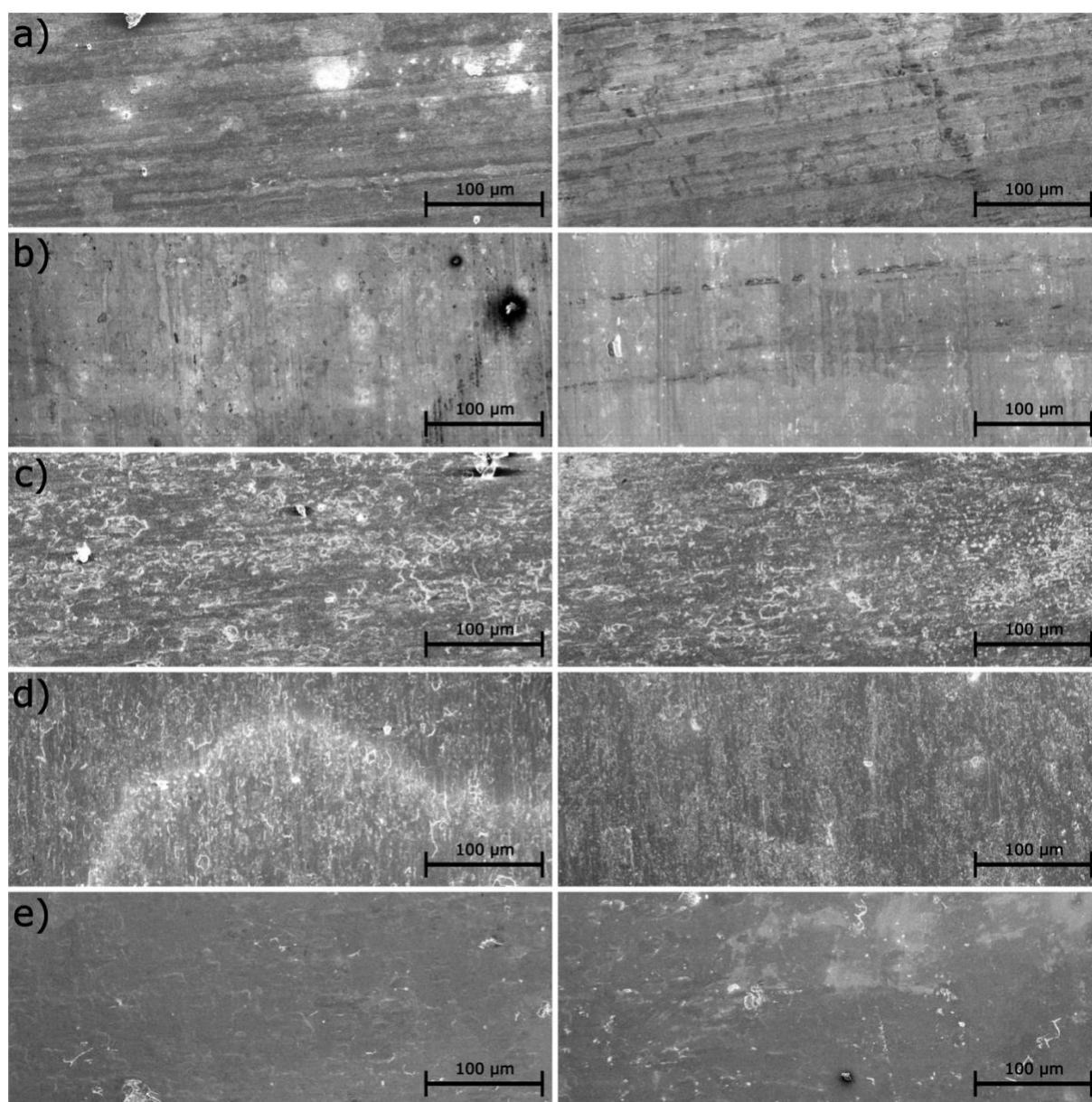
7 Přílohy

Tabulka 1 – Výsledky prvkové analýzy XRF použitých elektrodových materiálů

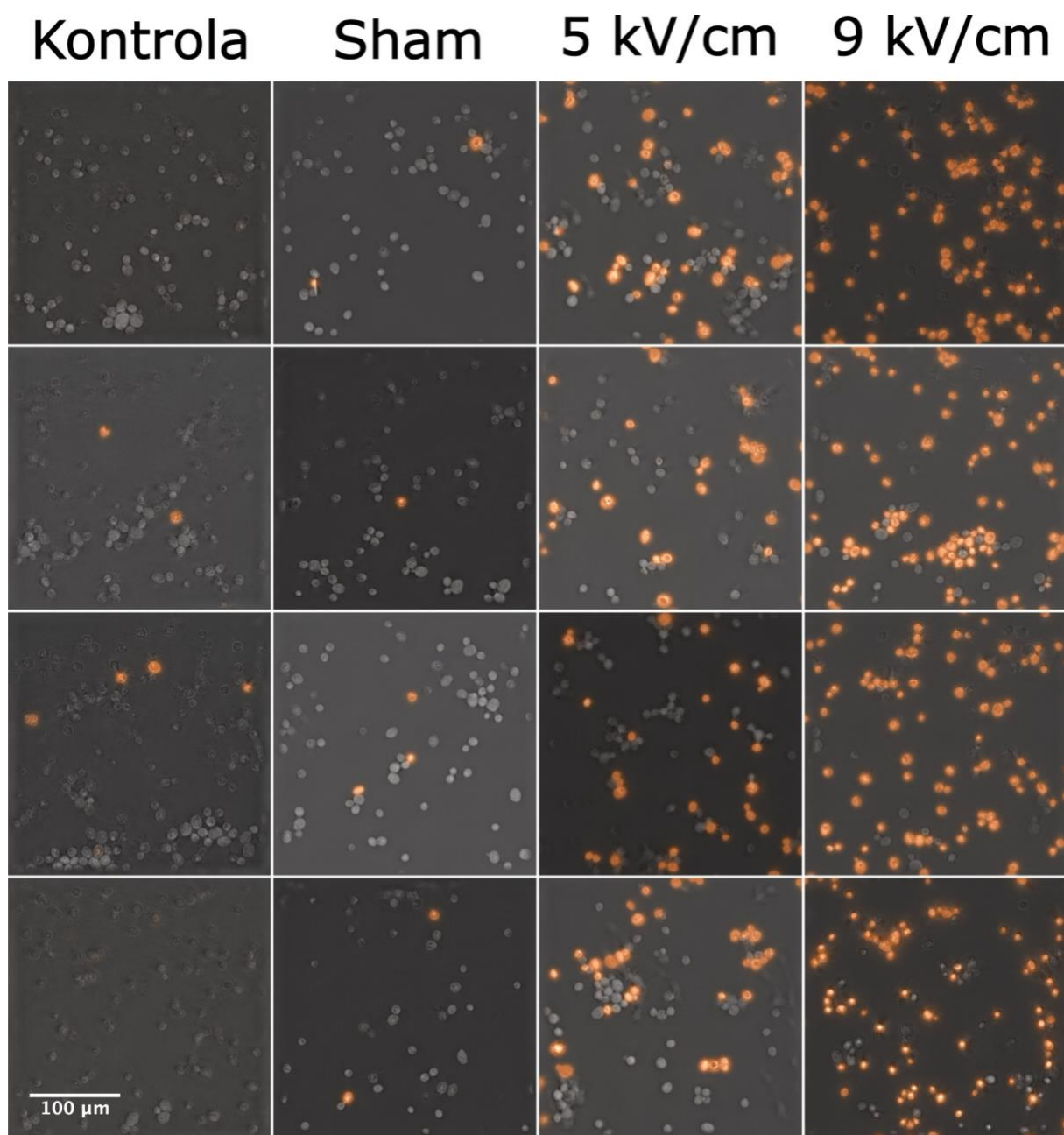
Prvek	Koncentrace (%)	Nejistota
Měď (Cu-ETP-2,0065)		
Cu	99,972	0,001
P	0,028	0,001
Ocel 304 (Aisi-304(V2A)/1,4301)		
Fe	71,886	0,064
Cr	17,845	0,042
Ni	8,176	0,041
Mn	1,044	0,025
Si	0,341	0,008
Cu	0,310	0,011
Co	0,183	0,039
Mo	0,118	0,002
V	0,050	0,006
Pb	0,025	0,002
Ti	0,020	0,007
Nb	0,003	0,001
Ocel 316L (Aisi-316L(V4A)/1,4404)		
Fe	66,502	0,071
Cr	16,271	0,044
Ni	10,028	0,045
Ti	2,628	0,030
Mo	2,144	0,007
Mn	1,012	0,026
Co	0,600	0,040
Si	0,452	0,010
Cu	0,191	0,011
Al	0,149	0,028
Pb	0,018	0,002
Nb	0,004	0,001
Hliník (AlMg3/3,3535)		
Al	99,284	0,011
Fe	0,502	0,009
Si	0,138	0,005
Cr	0,044	0,004
Zn	0,013	0,001
Co	0,010	0,002
Ni	0,008	0,001
Titan (Grade 1)		
Ti	99,765	0,042
V	0,163	0,042
Fe	0,037	0,005
Sn	0,020	0,002
Ni	0,016	0,002
Kyveta (Sigma Aldrich, 0,4 cm)		
Al	98,559	0,036
Mg	0,404	0,035
Si	0,785	0,008
Fe	0,210	0,005
Mn	0,034	0,003
Ni	0,006	0,001
Zn	0,002	0,000

Tabulka 2 – Charakteristiky jednotlivých elektroporačních pufrů.

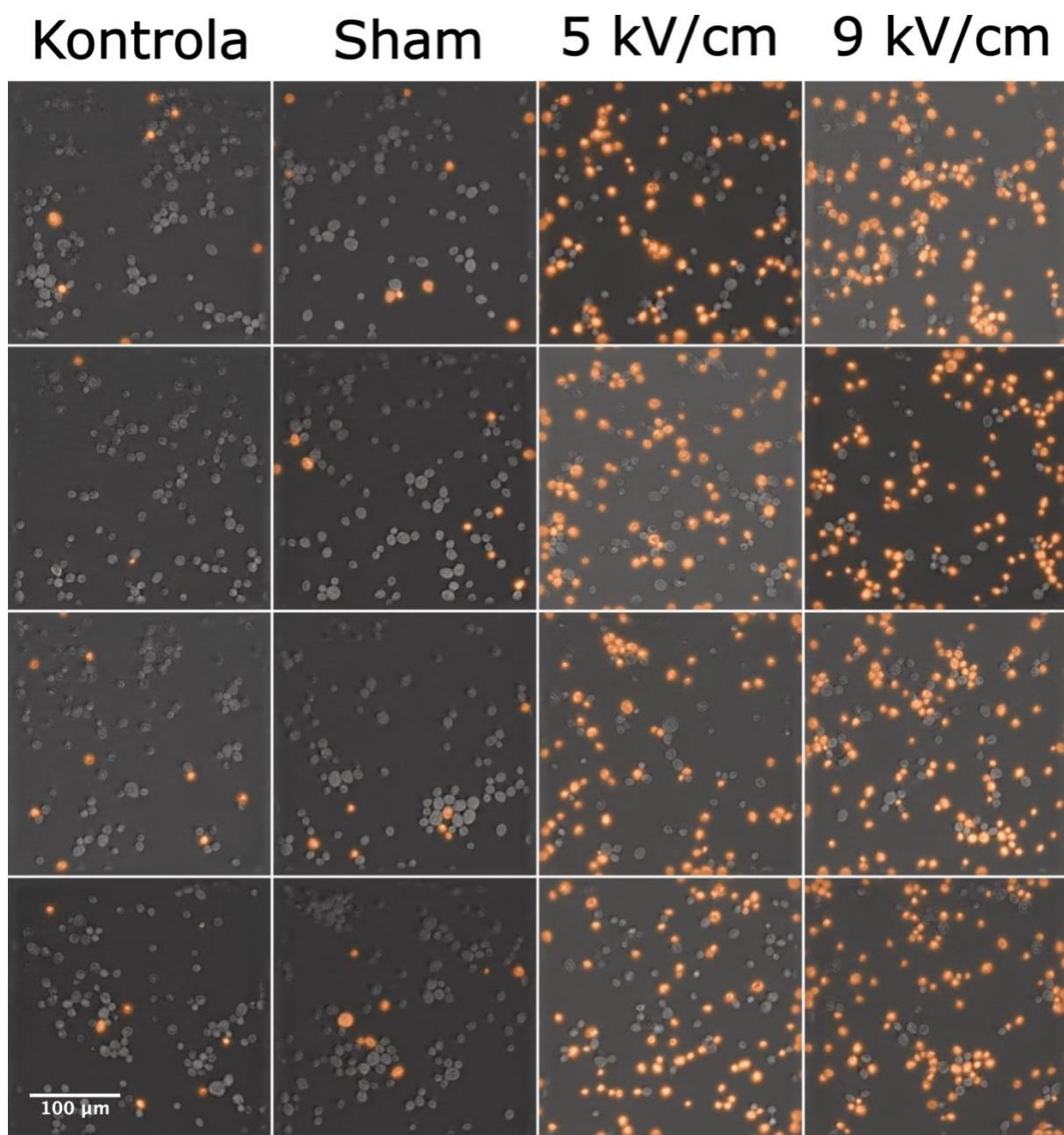
Pufr	Složení	pH	Konduktivita (μS/cm)
A2202	0,594 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,403 mM Na ₂ HPO ₄	7,4	330
LCB	10 mM HEPES; 250 mM sacharóza; 0,6 mM CaCl ₂ ; 1,5 mM MgCl ₂	7,18	201
S1	0,594 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,403 mM Na ₂ HPO ₄ ; 250 mM sacharóza; 0,6 mM CaCl ₂ ; 1,5 mM MgCl ₂	6,5	651
S2	0,594 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,403 mM Na ₂ HPO ₄ ; 250 mM sacharóza;	7,4	238



Obrázek 29 – SEM fotky elektrod nepoužitých (vlevo) a po aplikaci 200 pulzů o intenzitě 5 kV/cm, délce 100 μs, frekvenci 1 Hz v pufru S2, 400 μl (vpravo). Shora: a) hliník, b) anodizovaný hliník, c) titan, d) anodizovaný titan, e) PEDOT:PSS na titanu.



Obrázek 30 – Elektroporované kvasinky zobrazené fluorescenčním mikroskopem pro elektrody z titanu; oranžově svítící jsou permeabilizované buňky, u kterých PI při kontaktu s DNA zvýší svoji fluorescenci 20–30x. Sloupce zleva: pozitivní kontrola (neelektroporované buňky s PI), sham kontrola (neelektroporované buňky s PI, které byly odebrány z elektroporační cely s elektrodami), 5 kV/cm, 9 kV/cm, překryv RI mapy s excitačními filtry: 40 % TRITC a 40 % FITC. Vybráno 5 fotek z 10 pořizovaných.



Obrázek 31 – Elektroporované kvasinky zobrazené fluorescenčním mikroskopem pro elektrody z anodizovaného titanu; oranžově svítící jsou permeabilizované buňky, u kterých PI při kontaktu s DNA zvýší svojí fluorescenci 20–30x. Sloupce zleva: pozitivní kontrola (neelektroporované buňky s PI), sham kontrola (neelektroporované buňky s PI, které byly odebrány z elektroporační cely s elektrodami), 5 kV/cm, 9 kV/cm, překryv RI mapy s excitačními filtry: 40 % TRITC a 40 % FITC. Vybráno 5 fotek z 10 pořízených.