

Merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev

Peter Kramar, Damijan Miklavčič, Alenka Maček Lebar

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška 25, 1000 Ljubljana, Slovenija

E-pošta: peter.kramar@fe.uni-lj.si

Povzetek. Lipidne molekule so v naravi glavni sestavni del celične membrane. Sestavljene so iz polarne hidrofilne glave in nepolarne hidrofobnega repa. Zato skupek molekul v vodi lahko tvori energijsko ugodne strukture. Ena takih je ravninski lipidni dvosloj, ki ga z obeh strani obdaja raztopina soli. V raztopino zlahka vstavimo elektrode ter ravninski lipidni dvosloj vzbujamo s tokovnim ali napetostnim signalom poljubne oblike in merimo odziv, ki ga vzbujani signal povzroči.

Lastnosti, ki jih na ta način na ravninskem lipidnem dvosloju opazujemo, so: kapacitivnost, debelina, upornost oziroma prevodnost, pretok snovi in porušitvena napetost. Vsaka od naštetih lastnosti zahteva svoj način merjenja. Kadar raziskujemo pojav elektroporacije v biomedicini in biotehnologiji, je porušitvena napetost ena izmed ključnih lastnosti ravninskega lipidnega dvosloja. Znano je, da je porušitvena napetost odvisna od sestave ravninskega lipidnega dvosloja in koncentracije okoliškega elektrolita ter od trajanja izpostavitve električnemu polju.

V članku predstavljamo osnovne principe merjenja naštetih lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev.

Ključne besede: ravninski lipidni dvosloj, merilni sistemi, kapacitivnost, prevodnost

Measurement of planar lipid bilayer Properties

Extended abstract. Lipid molecules are an important part of the cell membrane. They are composed of polar hydrophobic heads and nonpolar hydrophilic tails. Due to their physical properties and simplicity they can form a wide constituent of self assembly systems such as: monolayer, bilayer, vesicles and micelles. We studied a planar lipid bilayer surrounded by a water solution from both sides.

The properties studied on the planar lipid bilayer were: capacity, thickness, conductivity, resistivity, fluctuations and voltage breakdown. Each property required its own measurement method. The signal used was the voltage or current clamp.

The voltage breakdown is one of the most important properties when studying the phenomena of electroporation in biomedicine and biotechnology. It has been known that the breakdown voltage depends on the lipid membrane composition, ionic bath solution, amplitude and electric field exposure duration.

In most cases, the breakdown voltage of the planar lipid bilayer is determined by applying a rectangular voltage pulse. The amplitude of the voltage pulse is incremented in small steps until the breakdown of the bilayer is obtained. Using the rectangular voltage pulse measuring protocol, the number of applied voltage pulses is not known in advance and each planar lipid bilayer is exposed to a voltage stress many times. Such a pre-treatment of the planar lipid bilayer affects its stability and consequently the determined breakdown voltage of the planar lipid bilayer. Another approach to the breakdown voltage determination was suggested by our group. Using a linear rising signal, the breakdown voltage of each planar lipid bilayer is determined by a single voltage exposure [20,21].

Key words: planar lipid bilayer, property measurement, capacity, permeability

1 Uvod

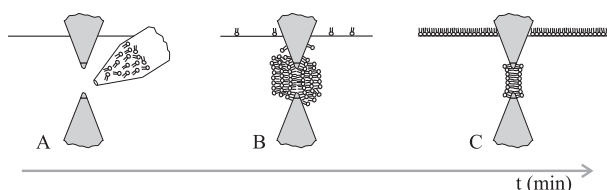
Lipidne molekule so glavni sestavni del celične membrane tako rastlinskih kot živalskih celic. Sestavljene so iz polarne hidrofilne glave in nepolarne hidrofobnega repa. Zato skupek molekul v vodi tvori energijsko ugodno strukturo tako, da nepolarne hidrofobne repi nikoli niso izpostavljeni vodnim molekulam. Prav ta lastnost in njihova preprostost jim omogočata uporabnost na različnih področjih, kot so biologija, kemija, fizika in medicina. Široko paleto lipidnih struktur: enoslojev, dvoslojev, večslojev, zaprtih dvoslojev oziroma veziklov in zaprtih enoslojev oziroma micel lahko tvorimo v različnih okoljih [1].

Osnovna struktura celične membrane in membran celičnih organel je lipidni dvosloj. Ker je notranost celice težko dosegljiva, je lastnosti njene membrane zapleteno meriti. Umeten lipidni dvosloj je sicer preprost, a velikokrat zadovoljiv model celične membrane. Tvorimo lahko vezikle ali liposome, kjer je oblika strukture podobna celici, zgradba membrane pa zelo poenostavljena. Druga možnost je ravninski lipidni dvosloj, ki ga lahko predstavljamo kot majhen delček celične membrane. Poglavitna prednost takšnega ravninskega lipidnega dvosloja je, da je med merjenjem dostopen z obeh strani [2].

Ravninske lipidne dvosloje ponavadi pripravimo v posebni komori, ki je sestavljena iz dveh prekatov. Prekata ločuje teflonska folija, v kateri je luknjica s premerom od 0,1 do 1 mm. Na luknjici tvorimo ravninski

lipidni dvosloj z eno od naslednjih metod: metodo barvanja, metodo dvigovanja gladine ali metodo potopitve konice [3, 4].

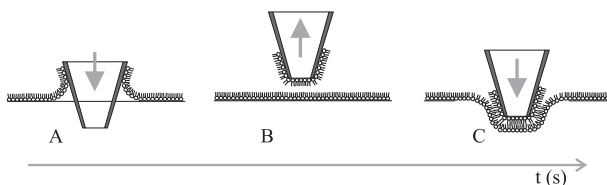
Metoda barvanja (*ang. painted bilayer*) ali Mueller-Rudinova metoda je bila razvita med prvimi [5]. Vodna raztopina je pripravljena v komori, s pipeto pa nanesemo lipide na teflonsko folijo, ki ločuje oba prekata komore (slika 1A). V začetku so lipidne molekule združene v veliko gmoto (slika 1B). Sčasoma odvečni lipidi odplavajo na gladino in na luknjici nastane ravninski lipidni dvosloj (slika 1C).



Slika 1. Metoda barvanja [5]. A) Komora z vodo in nanos lipidov na teflonsko folijo, ki deli prekata komore. B) Gmota nanesenih lipidov se enakomerno razporedi po teflonski foliji, odvečni lipidi odplavajo na gladino. C) Po določenem času nastane lipidni dvosloj.

Figure 1. Painted planar lipid bilayer method [5]. A) The chamber is filled with a water solution. Lipids are painted on a teflon sheet. B) A cluster of painted lipid molecules is slowly spread on a teflon sheet, excess lipids go to a water solution surface. C) After some time, a planar lipid bilayer is formed.

Pri metodi potopitve konice (*ang. Tip-Dip bilayer*) potrebujemo kopel, v katero potopimo ozko cevko [6]. Na gladino nanesemo lipidne molekule, ki se porazdelijo po celotni gladini in na rob cevke (slika 2A). Ko cevko vzamemo iz kopeli, se na njej nabere lipidni enosloj (slika 2A). Cevko dvignemo nad gladino in počakamo, da se molekule lipidov ponovno razporedijo (slika 2B). Ko cevko ponovno potopimo, nastane na njeni konici ravninski lipidni dvosloj (slika 2C).

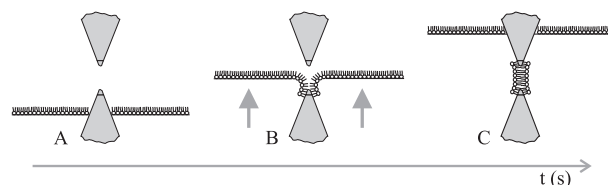


Slika 2. Metoda potopitve konice [6]. A) V kopel potopimo ozko cevko in nanesemo molekule lipidov. B) Cevko dvignemo, C) In jo ponovno potopimo, tako da se na njej tvori ravninski lipidni dvosloj.

Figure 2. Tip-Dip method [6]. A) When a small pipeline is inserted into the bath of a salt solution lipid molecules are added on the surface of the solution. B) The pipeline is lifted out of the bath solution. C) Insertion of the pipeline back to the bath solution forms the planar lipid bilayer on the edge of the pipeline.

Metoda dvigovanja gladine (*ang. folded bilayer*) oziroma Montal-Muellerjeva metoda je ena najpogostejše uporabljenih metod za proučevanje ravninskih lipidnih dvoslojev [7]. Oba prekata komore napolnimo z vodo pod

nivojem luknjice v teflonski foliji. Na gladino obeh prekatov nanesemo lipide in počakamo, da se enakomerno porazdelijo po gladini (slika 3A). Obe gladini nato sočasno dvignemo (slika 3B). Na luknjici v teflonski foliji nastane ravninski lipidni dvosloj (slika 3C). Prednost te metode pred metodo barvanja je predvsem v tem, da brez daljšega čakanja, s spuščanjem in dviganjem gladine v prekatih tvorimo ravninske lipidne dvosloje večkrat zapored drugega za drugim.



Slika 3. Metoda dviganja gladine [7]. A) Gladino vode postavimo tik pod luknjico v teflonski foliji. Na površino nanesemo lipidne molekule in počakamo, da se porazdelijo enakomerno po gladini. B) V obeh prekatih enakomerno dvignemo gladino vode. C) Na luknjici teflonske folije tvorimo ravninski lipidni dvosloj.

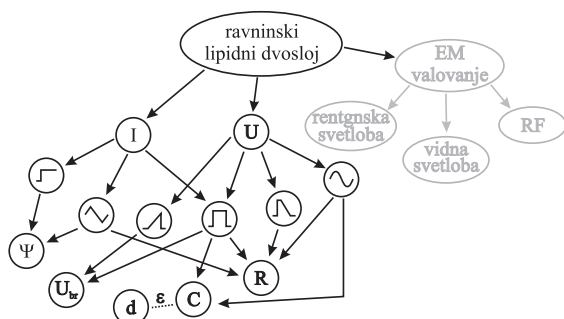
Figure 3. Folded planar lipid bilayer method [7]. A) A layer of lipid molecules on the surface of a salt solution. B) The levels of the salt solution are slowly raised above the hole. C) A planar lipid bilayer is formed on the hole.

Lastnosti lipidnih dvoslojev, kot so prevodnost, kapacitivnost, porušitvena napetost ali debelina, večinoma določamo z meritvijo toka oziroma napetosti prek lipidnega dvosloja ali z optičnim opazovanjem, kjer opazujemo odklon žarka ter absorpcijo svetlobe v lipidnem dvosloju. Električne in optične meritve lahko med seboj tudi kombiniramo.

Omenjene meritve so osnova za opazovanje tako enostavnih lipidnih dvoslojev kot tudi dvoslojev, ki smo jim dodali različne molekule ter jim tako spremenili eno ali več lastnosti [8, 9]. Sestavo lipidnega dvosloja lahko poljubno spreminjamo in jo s tem približamo sestavi prave celične membrane [1]. Tako lahko na preprostem modelu proučujemo, kako na celično membrano vplivajo elektromagnetna valovanja [10]. Lipidne dvosloje lahko uporabljamo tudi kot preprost model tankih plasti [11].

V nadaljevanju se bomo osredinili na opazovanje lipidnih dvoslojev in določanje njihovih lastnosti na podlagi meritev napetosti in toka. Lipidni dvosloj namreč lahko predstavimo s preprostim električnim vezjem; vzporedno vezavo kondenzatorja in upora. Napetostno ali tokovno vzbujanje takega preprostega vezja je lahko osnova za izračun vrednosti elementov, ki določajo lastnosti lipidnega dvosloja. Opisali bomo merjenje kapacitivnosti, upornosti in porušitvene napetosti ravninskega lipidnega dvosloja. Posamezne veličine namreč lahko merimo na različne načine, s kombiniranjem meritev pa se znanje o določenem ravninskem lipidnem dvosloju še dopolnjuje. Natančneje se bomo seznanili z napetostnim in tokovnim vzbujanjem ravninskih lipidnih dvoslojev. Opisali bomo

oblike signalov, ki jih uporabljamo pri posameznem vzbujanju, ter katere lastnosti lahko z njimi opazujemo (slika 4).



Slika 4. Pregled različnih načinov določanja lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev. Z I je označeno tokovno vzbujanje, z U napetostno vzbujanje. Oblika signala vzbujanja je narisana v krožcu. S takimi vzbujanji lahko merimo veličine, kot so nihanje lipidov v membrani (ψ), porušitveno napetost (U_{br}), debelina (d), kapacitivnost (C) in upornost (R).
Figure 4. Review of the planar lipid bilayer properties measurements. I represents the current clamp and U the voltage clamp. The shape of the clamping signal is drawn in the circle. We can directly or indirectly measure: lipid fluctuations (ψ), voltage breakdown (U_{br}), thickness (d), capacitance (C) and resistance (R).

2 Kapacitivnost (C)

V literaturi zasledimo tri različne metode merjenja kapacitivnosti: merjenje časovne konstante razelektritve ravninskega lipidnega dvosloja, merjenje z izmenično napetostjo sinusne oblike in merjenje s pretvorbo kapacitivnosti v frekvenco. Pri vseh treh metodah izmerjeno kapacitivnost normiramo na površino lipidnega dvosloja. Normirano kapacitivnost tako lahko primerjamo s poizkusi, narejenimi na različnih sistemih z različnimi površinami ravninskih lipidnih dvoslojev.

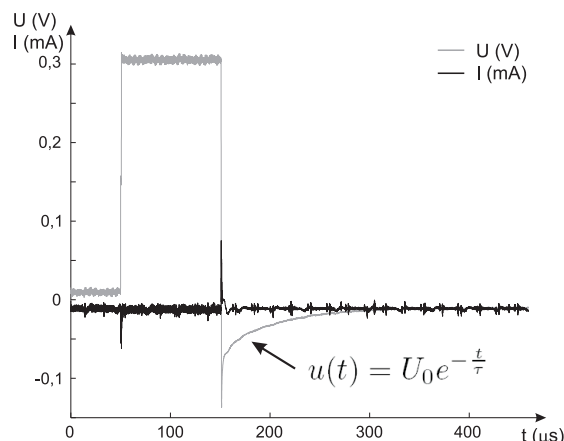
Najpogosteje kapacitivnost merimo z določitvijo časovne konstante razelektritve ravninskega lipidnega dvosloja [12]. Ravninskemu lipidnemu dvosloju vsilimo napetost izbrane velikosti. Pri tem se na ravninskem lipidnem dvosloju nabere naboj. Ko je impulza konec, ravninski lipidni dvosloj razelektrimo prek upora znane vrednosti. Razelektritev ravninskega lipidnega dvosloja lahko opazujemo kar z osciloskopom (slika 5).

Napetost pri razelektritvi na ravninskem lipidnem dvosloju $u(t)$ lahko opišemo kot:

$$u(t) = U_0 e^{-\frac{t}{\tau}}. \quad (1)$$

U_0 je amplituda vsiljene napetosti; τ časovna konstanta, ki je odvisna od kapacitivnosti (C) in upornosti (R) ravninskega lipidnega dvosloja in merilnega sistema,

$$\tau = R \cdot C. \quad (2)$$



Slika 5. Napetost na ravninskem lipidnem dvosloju pri merjenju kapacitivnosti z metodo razelektritve.

Figure 5. Voltage on a planar lipid bilayer during capacitance measurement made by using the discharge method.

Če poznamo upornost sistema in je ta veliko manjša od upornosti ravninskega lipidnega dvosloja ($\sim 10^8 \Omega$) [1], lahko kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja določimo z meritvijo, ki je sestavljena iz dveh delov. Najprej izmerimo kapacitivnost sistema brez ravninskega lipidnega dvosloja (C_{sis}), v drugem delu pa kapacitivnost sistema z lipidnim dvoslojem (C_{SBLM}). Predpostavimo lahko, da je kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja (C_{BLM}) razlika obeh izmerjenih kapacitivnosti:

$$C_{BLM} = C_{sis} - C_{SBLM}. \quad (3)$$

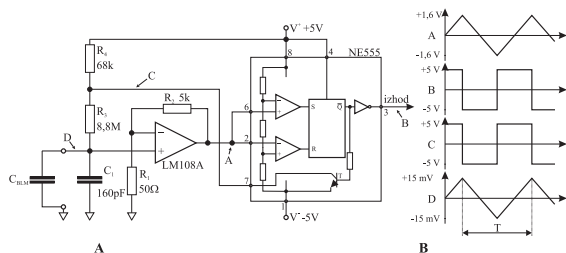
Metoda razelektritve ravninskega lipidnega dvosloja je najpogosteje uporabljena zato, ker je njena izvedba preprosta; potrebujemo le napetostni vir, hitro stikalo ter spominski osciloskop za opazovanje razelektritve ravninskega lipidnega dvosloja.

Zasledimo tudi merilno metodo, v okviru katere vrednost kapacitivnosti pretvorimo v čas [13]. Enakomerno naelektrimo lipidni dvosloj do neke napetostne vrednosti, ko jo presežemo, ravninski lipidni dvosloj praznimo. Periodično polnjenje in praznjenje C_{BLM} da na izhodu vezja pravokotni signal s periodo, ki je odvisna od kapacitivnosti lipidnega dvosloja (slika 6).

Kondenzator C_{BLM} na sliki 6 predstavlja kapacitivnost lipidnega dvosloja. Na kondenzatorju merimo napetost v točki D in jo ojačimo z operacijskim ojačevalnikom. Ta ima ojačenje k določeno z uporoma R_1 in R_2 :

$$k = \frac{R_1 + R_2}{R_1}. \quad (4)$$

Izhod ojačevalnika je pripeljan v integrirano vezje NE555, v katerem sta dva napetostna primerjalnika. Vhod prvega je merjena napetost v točki A, drugega pa razdeljena napetost, ki gre prek delilnika treh uporov.



Slika 6. A) Vezje za transformacijo kapacitivnosti v periodo. B) Potek signalov na posamezni točki v vezju [13].

Figure 6. A) Capacitance to the time transformation circuit. B) Voltage signal on selected points of the signal [13].

Glede na nivo napetosti se preklopi izhod RS spominske celice. Izhod iz celice invertiramo, rezultat pa je pravokotni signal, kateremu zlahka izmerimo periodo T_p . Napetost na lipidnem dvosloju lahko izrazimo z enačbo:

$$U_{BLM} = \frac{2}{3} V \frac{1}{k} = \frac{2 \cdot V \cdot R_1}{3(R_1 + R_2)}. \quad (5)$$

Merjenje razdelimo v dve fazi. Prva faza je polnjenje kondenzatorja, kjer teče tok iz napajalnika prek uporov R_4 in R_3 v kondenzator. Tranzistor T je zaprt. V drugi fazi se zaradi preklopa RS celice tranzistor T odpre in kondenzator C_{BLM} se razelektri. Tok teče prek upora R_3 in tranzistorja T v negativni pol napajanja. Zaradi ohranjanja energije velja, da je produkt napajalne napetosti (V) in časa v eni periodi T_p enak:

$$T_p \cdot V = U_{BLM} (R_3 + R_4) C_{BLM} + U_{BLM} R_3 C_{BLM}. \quad (6)$$

V vezju izberemo simetrično napajanje $V = V^+ = |V^-|$ ter vrednost upora $R_3 \gg R_4$. Iz enačbe (6) izrazimo periodo, pri čemer zanemarimo upornost R_4 (zaradi $R_3 \gg R_4$). Kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja je torej:

$$C_{BLM} = \frac{VT_p}{2U_{BLM}R_3}. \quad (7)$$

Kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja merimo tudi z uporabo izmenične napetosti [14]. Usmerjena izhodna napetost se spreminja v odvisnosti od vrednosti kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja. Merilni sistem je treba najprej umeriti na spektru znanih kapacitivnosti, da določimo parametre parabolične krivulje, kateri sledi odvisnost. Na omenjeni način lahko sočasno merimo tudi upornost ravninskega lipidnega dvosloja.

3 Upornost (R) oziroma prevodnost (G)

Upornost (R) oziroma prevodnost (G) lipidnih dvoslojev ponavadi opišemo z razmerjem izmerjenega in vzbujalnega signala. Kadar vzbujamo lipidni dvosloj z

napetostjo, lahko z opazovanjem toka neposredno opazujemo prevodnost. Nasprotno je pri tokovnem vzbujanju, ko opazujemo upornost ravninskega lipidnega dvosloja z merjenjem napetosti. Ustrezno razmerje obeh signalov podaja upornost ravninskega lipidnega dvosloja, ki je praviloma izredno velika (reda $10^8 \Omega$).

Pri metodi, ko ravninski lipidni dvosloj vzbujamo s sinusnim signalom poljubne amplitude (0,1 - 1,5 V) in frekvenco 1 Hz, merimo upornost in kapacitivnost sočasno. Temu signalu prištejemo še sinusni signal amplitude 2 mV in frekvence 1 kHz [14]. Z 1 kHz signalom merimo kapacitivnost, kot smo opisali v razdelku o merjenju kapacitivnosti. Nadomestno vezje za tak sistem vidimo na sliki 7. Zapišemo napetostni enačbi za realni

$$V_1 \cos(\varphi - \varphi_1) + V_{BLM} \cos(\varphi_{BLM} - \varphi) = V_S \quad (8)$$

in imaginarni del napetosti

$$V_1 \sin(\varphi - \varphi_1) = V_{BLM} \sin(\varphi_{BLM} - \varphi). \quad (9)$$

Iz kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja in znanega toka lahko izračunamo fazni kot φ_{BLM} na lipidnem dvosloju z enačbo:

$$\omega C_{BLM} V_{BLM} = I \sin \varphi_{BLM}, \quad (10)$$

pri čemer znani tok izrazimo z uporom R_1 in kondenzatorjem C_1 :

$$I = V_1 \sqrt{(\omega C_1)^2 + \left(\frac{1}{R_1}\right)^2}. \quad (11)$$

Z vsemi tremi enačbami lahko izračunamo še napetost na lipidnem dvosloju V_{BLM} in fazni kot φ celotnega sistema. Prevodnost na lipidnem dvosloju izračunamo iz relacije:

$$G_{BLM} V_{BLM} = I \cos \varphi. \quad (12)$$

Taka metoda merjenja nam omogoča sočasno spremljanje kapacitivnosti in upornosti; tudi med spreminjanjem lastnosti lipidnega dvosloja.

4 Porušitvena napetost lipidnega dvosloja (V_C)

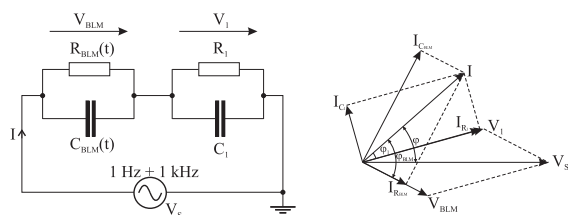
Pod vplivom električnega polja tako v celični kot tudi v umetni membrani nastanejo strukturne spremembe – pore, ki omogočajo transport ionov in molekul skozi ravninski lipidni dvosloj. Natančni mehanizmi nastajanja por, njihova velikost, struktura in stabilnost niso v celoti poznani [15]. V zadnjem času v literaturi najdemo molekularne modele, ki nakazujejo dinamično nastajanje por in s tem delno pojasnjujejo tudi mehanizme nastajanja [16,17]. Z meritvijo porušitvene napetosti dobimo

podatek o trdnosti in stabilnosti ravninskega lipidnega dvosloja. Porušitveno napetost ponavadi merimo tako, da opazujemo tok ob pravokotnih napetostnih pulzih, ki jih dovedemo na ravninski lipidni dvosloj. Amplitudo napetostnih pulzov povečujemo, dokler ne zaznamo povečanja električnega toka (slika 8). Električni tok je znak, da je ravninski lipidni dvosloj porušen. Amplitudo napetostnega pulza, s katerim smo ravninski lipidni dvosloj porušili, imenujemo porušitvena napetost [8]. Pri tako zasnovanih meritvah je izmerjena porušitvena napetost odvisna od trajanja pulza in od časa predhodnih izpostavitve ravninskega lipidnega dvosloja električnemu polju [18,19], ki pa ga vnaprej ne poznamo.

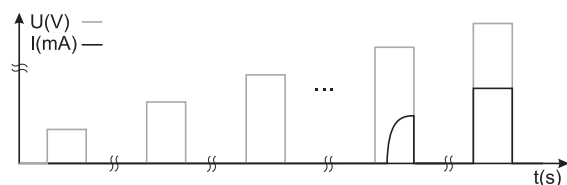
Zato smo predlagali novo metodo določanja porušitvene napetosti, ki bi bila predvsem preprostejša in učinkovitejša od tistih, ki so jih uporabljali do zdaj [20]. Porušitveno napetost ravninskega lipidnega dvosloja določimo z linearno naraščajočim napetostnim signalom (slika 9). Naklon in končno napetost linearne naraščajočega signala je treba prej izbrati. Izbira končne napetosti mora zagotavljati, da se bo ravninski lipidni dvosloj zagotovo porušil. Izkazalo se je, da je metoda odlična [20]. Z različnimi nakloni linearne naraščajočih signalov lahko določimo celo prag porušitvene napetosti za izbrani lipidni dvosloj – to je napetost, pri kateri se ravninski lipidni dvosloj poruši, če ji je izpostavljen daljši čas. Med meritvijo je ravninski lipidni dvosloj izpostavljen napetostnemu signalu le enkrat, tako se izognemo vplivu večkratne izpostavitve ter zmanjšamo stresanje vrednosti izmerjene porušitvene napetosti [20].

5 Sklep

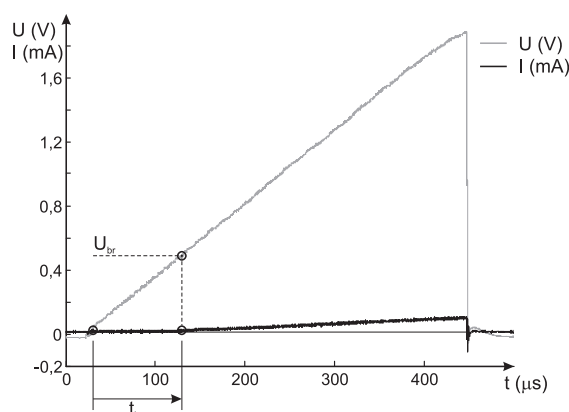
Ravninski lipidni dvosloj je preprost model celične membrane. Njegova poglavitna prednost je dostopnost z obeh strani. Zasnova modela omogoča preprosto spreminjanje kemijske strukture ravninskega lipidnega dvosloja in merjenje njegovih lastnosti: kapacitivnosti, upornosti in porušitvene napetosti.



Slika 7. Nadomestno vezje sistema in kazalni diagram za merjenje električnih lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev s sinusnim vzburjanjem [14].
Figure 7. Substitute electrical properties of planar lipid bilayers with a sinus signal [14].



Slika 8. Določitev porušitvene napetosti ravninskega lipidnega dvosloja.
Figure 8. Planar lipid bilayer breakdown determination.



Slika 9. Določitev življenjske dobe ter porušitvene napetosti ravninskega lipidnega dvosloja. Svetla krivulja predstavlja pritisnjeno napetost, temna krivulja pa tok skozi ravninski lipidni dvosloj. Čas med začetkom naraščanja pritisnjene napetosti ter začetkom naraščanja toka definiramo kot življenjsko dobo ravninskega lipidnega dvosloja t_{br} . Ob času ko začne naraščati tok iz napetostnega signala odčitamo porušitveno napetost ravninskega lipidnega dvosloja U_{br} .
Figure 9. Planar lipid bilayer breakdown and lifetime determination. The light curve on the plot represents the applied voltage and the dark curve the current through the planar lipid bilayer. The lifetime of planar lipid bilayer t_{br} is defined as the time between the beginning of the rising applied linear rising voltage and a time the current starts to flow across the membrane. Voltage breakdown U_{br} is defined as the value of the applied voltage at t_{br} .

6 Zahvala

Avtorji se zahvaljujejo Agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za finančno podporo.

7 Literatura

- [1] H.T.Tien and A.Ottova, *The lipid bilayer concept: Experimental realization and current applications*. In Planar lipid bilayers (BLMs) and their applications. (Ed. H.T.Tien and A.Ottova-Leitmannova) 1–74, Elsevier, New York 2003.
- [2] H.T.Tien, *Bilayer Lipid Membranes (BLM)*, Marcel Dekker, inc., New York 1974.
- [3] M.Smeyers, M.Leonetti, E.Goormaghtigh and F.Homble, *Structure and function of plant membrane ion channels reconstituted in planar lipid bilayers*. In Planar Lipid Bilayers (BLMs) and their Applications. (Ed. H.T.Tien and A.Ottova-Leitmannova) 449–478, Elsevier, New York 2003.

- [4] B.E.Ehrlich, *Incorporation of Ion Channels in Planar Lipid Bilayers: How to Make Bilayers Work for You*. In *The Heart and Cardiovascular System*. (Ed. H.A.Fozzard et al.) 551–560, Raven Press, New York 1992.
- [5] P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien, W.C. Wescott, *Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solutions*. *J. Phys. Chem.* 67, 534–535 (1963).
- [6] R. Coronado and R. Latorre, *Phospholipid-bilayers made from monolayers on patch-clamp pipettes*. *Biophysical Journal* 43, 231–236 (1983).
- [7] M. Montal and P. Mueller, *Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69, 3561–3566 (1972).
- [8] G.C.Troiano, L.Tung, V.Sharma and K.J.Stebe, *The Reduction in Electroporation Voltages by the Addition of Surfactant to Planar Lipid Bilayer*. *Biophysical Journal* 75, 880–888 (1998).
- [9] V.Sharma, K.Uma Maheswari, J.C.Murphy and L.Tung, *Poloxamer 188 Decreases Susceptibility of Artificial Lipid Membranes to Electroporation*. *Biophysical Journal* 71, 3229–3241 (1996).
- [10] T.F.Eibert, M.Alaydrus, F.Wilczewski and V.W.Hansen, *Electromagnetic and Thermal Analysis for Lipid Bilayer Membranes Exposed to RF Fields*. *IEEE transactions on biomedical engineering* 46, 1013–1021 (1999).
- [11] A.Iglič and V.Kralj-Iglič, *Effect of anisotropic properties of membrane constituents on stable shapes of membrane bilayer structure*. In *Planar Lipid Bilayers (BLMs) and their Applications*. (Ed. H.T.Tien and A.Ottova-Leitmannova) 143–172, Elsevier, New York 2003.
- [12] R.Benz and K.Janko, *Voltage-induced capacitance relaxation of lipid bilayer membranes; effects on membrane composition*. *Biochimica et Biophysica Acta* 455, 721–738 (1976).
- [13] S.Kalinovski and Z.Figaszevski, *A new system for bilayer lipid membrane capacitance measurements: method, apparatus and applications*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1112, 57–66 (1992).
- [14] E.Gallucci, S.Micelli and G.Monticelli, *Pore Formation in Lipid Bilayer Membranes Made of Phosphatidylinositol and Oxidized Cholesterol Followed by Means of Alternating Current*. *Biophysical Journal* 71, 824–831 (1996).
- [15] M.Pavlin, T.Kotnik, D.Miklavčič, P.Kramar, A.Maček Lebar, *Electroporation of Planar Lipid Bilayers*. In *Membranes Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes Volume 6*. (Ed. A. Leitmannova Liu) 165–226, Academic Press 2008.
- [16] D.P.Tieleman, H.Leontiadou, A.E.Mark, S.J.Marrink, *Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields*. *Journal of the American Chemical Society* 125, 6382–6383 (2003).
- [17] M.Tarek, *Membrane electroporation: A molecular dynamics simulation*. *Biophysical Journal*, 88, 4045–4053 (2005).
- [18] I.G.Abidor, V.B.Arakelyan, L.V.Chernomordik, Y.A.Chizmadzhev, V.F.Pastushenko and M.R.Tarasevich, *246 - Electric Breakdown of Bilayer Lipid Membranes I. The Main Experimental Facts and Their Qualitative Discussion*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 6, 37–52 (1979).
- [19] A.Maček Lebar, G.C.Troiano, L.Tung, D.Miklavčič, *Inter-pulse interval between rectangular voltage pulses affects electroporation threshold of artificial lipid bilayers*. *IEEE Transactions on Nanobioscience* 1, 116–120 (2002).
- [20] P.Kramar, D.Miklavcic, A.Macek Lebar, *Determination of lipid bilayer breakdown voltage by means of linear rising signal*. *Bioelectrochemistry*, 70, 23–27 (2007).
- [21] P.Kramar, D.Miklavcic, A. Macek Lebar, *A system for the determination of planar lipid bilayer breakdown voltage and its applications*. *IEEE Transactions on Nanobioscience* 8, 132–138 (2009).

Peter Kramar je diplomiral leta 2003 in magistriral leta 2005 na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Na isti fakulteti je od leta 2003 zaposlen, najprej kot raziskovalec, zdaj pa kot asistent. Raziskovalno se ukvarja z elektroporacijo ravninskih lipidnih dvoslojev.

Alenka Maček Lebar je diplomirala leta 1991, magistrirala leta 1995 ter doktorirala leta 1999 na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Je docentka na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Raziskovalno in pedagoško se ukvarja z vplivom električnega polja na biološke sisteme.

Damijan Miklavčič je diplomiral leta 1987, magistriral leta 1991 ter doktoriral leta 1993 na Fakulteti za elektrotehniko, Univerze v Ljubljani. Je redni profesor na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Raziskovalno in pedagoško se ukvarja z vplivom električnega polja na biološke sisteme.