

# Genska elektrotransfekcija: vplivajo električni pulzi tudi na celice, ki jim niso bile neposredno izpostavljene?

Mojca Pavlin<sup>1</sup>, Ana Angela Kumer<sup>2</sup>, Maša Kandušer<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Skupina za nano in biotehnoške aplikacije, Tržaška 25, Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biokibernetiko, Tržaška 25, Ljubljana

E-pošta: masa.kanduser@fe.uni-lj.si

**Povzetek.** Genska elektrotransfekcija je nevirusna metoda vnosa genov v celico, pri kateri uporabljamo visokonapetostne električne pulze. Z elektrotransfekcijo v celice in tkiva vnašamo različne molekule, kot sta DNK ali RNK. Metoda je zanimiva za biomedicinske aplikacije, vendar njeni mehanizmi še niso povsem raziskani. V nekaterih primerih je zelo pomembno, da transficirane celice preživijo in ohranijo svoje funkcije, zato smo se v našem prispevku osredinili na vpliv visokonapetostnih pulzov na preživetje celic, ki pulzom niso bile neposredno izpostavljene. Uporabili smo celično linijo CHO v razmerah in vitro in izvedli poskuse na pritrjenih in na celicah v suspenziji. Naši rezultati kažejo, da umirajoče ireverzibilno elektroporirane celice ne zmanjšajo preživetja celic, ki niso bile neposredno izpostavljene električnim pulzom. Pritrjene celice so bile izpostavljene snovem, ki so se sproščale v elektroporacijski medij, ker so rastle v isti gojitveni posodici kot elektroporirane celice, celice v suspenziji pa so bile izpostavljene supernatantu elektroporiranih celic. Preživetje celic smo opazovali 24 ur po elektroporaciji za pritrjene celice ter 24 in 48 ur po elektroporaciji za celice v suspenziji. Zanimivo je, da po 48 opazimo boljše preživetje celic, ki so bile izpostavljene supernatantu elektroporiranih celic. Potrebne so nadaljnje raziskave, ki bodo razjasnile ozadje tega pojava.

**Ključne besede:** genska elektrotransfekcija, velikost in oblika celic, pritrjene celice, celice v suspenziji, in vitro, preživetje

## Impact of high-voltage gene electrotransfer pulses on cells that were not directly exposed to the electric field

Gene electrotransfer is a non-viral method of gene delivery which uses high voltage electric pulses and enables efficient delivery of DNA and RNA molecules with the use of high-voltage electric pulses in a variety of cells and tissues. The method has a great potential in biomedical applications however underlying mechanisms are not known yet. In some applications cell viability of the transfected cells is of great importance therefore we focused our study on the impact of high voltage pulses on cell viability of cells that were not directly exposed to an electric field. We used CHO cells cultured in vitro and performed experiments on plated cells and cells in a suspension. Our results indicate that irreversibly electroporated dying cells do not reduce viability of the neighboring cells growing in the same dish or cells exposed to supernatant of electroporated cells. We even observe the effect of improved cell viability when cells were monitored 48h after the experiments. Further investigations are needed to understand the background of our findings.

**Keywords:** gene electrotransfer, size and cell shape, plated cells, suspension, in vitro, survival

## 1 UVOD

### 1.1 Elektroporacija

Že pred štiridesetimi leti so ugotovili, da dovolj močno električno polje lahko povzroči strukturne spremembe v celični membrani, s čimer se poveča prepustnost membrane za ione in molekule [1,2]. Proces je bil poimenovan elektroporacija, saj naj bi med električnim pulzom v membrani nastale pore, ki omogočijo prehajanje vodotopnih ionov in molekul. Včasih se uporablja tudi izraz elektropermeabilizacija, ki poudarja povečano prepustnost membrane. Na splošno je ključni parameter za uspešno permeabilizacijo inducirana transmembranska napetost [3,4], ki nastane ob prisotnosti zunanjega električnega polja zaradi razlike v električnih lastnostih membrane in zunanjega medija. Po električnem pulzu se membrana popolnoma zaceli, če le pulz ni preveč dolg ali previsok. Proces celjenja traja nekaj minut, kar omogoča prehajanje molekul iz zunanosti v notranost celice. Če jakost električnega polja še povečamo oziroma uporabimo daljše ali več pulzov, pride do ireverzibilnih sprememb in celica umre. Elektroporacijo uporabljajo v in vitro in in vivo

poskusih na živalih in v kliničnih študijah, kljub temu pa molekularni mehanizmi še niso pojasnjeni [2,5].

### 1.2 Elektrogenska transfekcija

Prvi poskusi leta 1982 so pokazali, da lahko z visokonapetostnimi pulzi (elektroporacijo) dosežemo transfekcijo celic – vnesemo gene, ki se nato tudi izražajo [1]. Metoda temelji na uporabi plazmidne DNK ter električnih pulzov, ki povečajo prepustnost celične membrane za to makromolekulo. Danes je elektrogenska transfekcija že uveljavljena metoda za vnos genov in vitro, trenutno poteka vrsta raziskav na živalskih modelih in vivo [2,5], v teku pa so tudi prvi klinični preizkusi elektrogenske terapije (EGT).

Elektrogenska transfekcija je v primerjavi z virusno transfekcijo varnejša metoda, saj ne uporablja virusnih vektorjev ter tako ne pomeni povečanega tveganja za stranske učinke, ki so se že pokazali pri nekaterih kliničnih preizkusih virusne transfekcije [5]. Elektrogenska transfekcija je v primerjavi z drugimi nevirusnimi metodami tudi nabolj vsestranska in učinkovita metoda. Tako je na primer metoda »gene gun« omejena in primerna samo za uporabo na izpostavljenih tkivih, kationski liposomi oziroma polimeri pa so lahko nestabilni, toksični oziroma lahko povzročijo vnetja. Zadnje raziskave so pokazale, da je elektrogenska terapija obetavna metoda za zdravljenje raka, za DNK vakcinacijo, za avtoimune in vnetne bolezni in še za vrsto drugih bolezni in kroničnih obolenj [5].

Za razlago mehanizma vnosa DNK z električnimi pulzi so raziskovalci na tem področju predlagali več mehanizmov. Prve hipoteze so predvidevale, da električno polje ustvari pore v celični membrani, kar omogoča difuzijo DNA prek membrane v celico, podobno kot velja za vnos manjših molekul [1]. Ta hipoteza temelji na dejstvu, da je tudi elektrogenska transfekcija učinkovita samo nad neko pragovno vrednostjo električnega polja, prav tako pa je učinkovitost odvisna od parametrov električnih pulzov. Vendar pa so nadaljnje raziskave pokazale, da je vnos DNA z električnimi pulzi bolj zapleten proces, ki ga ne moremo razložiti s preprosto difuzijo skozi pore, ki nastanejo zaradi elektroporacije [6-14]. Parametri, ki v nasprotju s klasično elektroporacijo zelo vplivajo na učinkovitost genske elektrotransfekcije, so tudi temperatura, osmolarnost medija in topologija molekule DNA.

Definiramo lahko več korakov, ki so kritični za uspešnost metode [7,8,11-14], med katere spadajo vsiljena transmembranska napetost, ki povzroči elektropermeabilizacijo celične membrane [15,16], stik med permeabilizirano membrano in plazmidno DNK, translokacija skozi membrano, ki ji sledi prehod po citoplazmi do jedra, vstop v jedro in ekspresija vnesenega gena. Ker so za uspešno ekspresijo pomembni tudi biološki dejavniki, je pomembno, da ohranimo dobro preživetje celic [6-14]. Poleg tega se je

treba zavedati, da na elektroporacijo vplivajo velikost, oblika celic in orientacija celic [15-17] in da so celice v tkivu različno velike in tudi različno orientirane glede na smer zunanega električnega polja. Stopnja elektroporacije pa vpliva na to, ali bodo celice reverzibilno elektroporirane in bodo preživele ali bodo električni pulzi povzročili tako velike poškodbe, da jih celica ne bo sposobna popraviti in bodo celice odmrle (ireverzibilna elektroporacija). Za gensko elektrotransfekcijo je pomembno, da so celice reverzibilno elektroporirane, kar pomeni, da se po dovajanju električnih pulzov celična membrana zaceli in celica vzpostavi homeostazo. Ker fiziološko stanje celice po elektroporaciji določa uspešnost transfekcije, je zelo pomembno razumeti, kako umirajoče celice (zaradi ireverzibilne elektroporacije) vplivajo na sosednje celice in na njihovo preživetje. Ta vidik je še posebno pomemben, kadar imamo za elektrotransfekcijo na voljo majhno število težko dostopnih celic in želimo dobiti velik delež preživelih transficiranih celic.

V našem prispevku smo ovrednotili ta vidik elektrogenske transfekcije tako, da smo ovrednotili vpliv snovi (signalnih molekul), ki jo izločajo elektroporirane celice, na sosednje netretirane celice. Elektroporirane celice so bile izpostavljene pulzom, pri katerih je bil delež celic ireverzibilno poškodovan. Snovi teh celic so se izločile v elektroporacijski pufer. Tem snovem so bile izpostavljene sosednje celice, ki so rastle v isti gojitveni posodici pri poskusih na pritrjenih celicah, ali pa smo pufer z izločenimi snovmi elektroporiranih celic odstranili s centrifugiranjem in tako ločili elektroporirane celice in supernatant (pufer, ki je vseboval izločene snovi). Ta supernatant smo nato dodali neelektroporiranim celicam in določili vpliv na preživetje.

## 2 TEORETIČNO OZADJE

Pod vplivom zunanega električnega polja se na celični membrani ustvari potencialna razlika, ki je posledica Maxwell-Wagnerjeve polarizacije. Z drugimi besedami, pod vplivom električnega polja se notranjost celice polarizira, kar povzroči napetost na membrani – vsiljeno transmembransko napetost  $\Delta\Psi$  [3]. Nad nekim kritičnim poljem, ko se ustvari kritična transmembranska napetost ( $\Delta\Psi_c$ ), se poveča prepustnost celične membrane za molekule, ki sicer ne prehajajo čez membrano, to je t. i. reverzibilna permeabilizacija. Nadaljnje povečanje polja pa povzroči ireverzibilne spremembe membrane, ki privedejo do celične smrti. Kot smo že omenili, je površina celice, izpostavljena nadkritični napetosti, pomemben parameter za uspešno elektropermeabilizacijo. Zato je pomembno poznavanje porazdelitve vsiljene transmembranske napetosti na celici.

Vsiljena transmembranska napetost je neenakomerna po celici, največja na polih celice in najmanjša na ekvatorju, odvisna pa je od lastnosti celice in gostote

celic [3,4]. Vsiljeno transmembransko napetost na okrogli celici (slika 1) določa Schwanova enačba:

$$\Delta\Psi = g(\lambda) R E_0 \cos\theta \left[ 1 - e^{-r/\tau} \right], \quad (1)$$

kjer je  $\Delta\Psi$  napetost, ki se ustvari na membrani. Časovna konstanta  $\tau$  je:

$$\tau = \frac{R c_m}{\frac{2\sigma_e \sigma_i}{2\sigma_e + \sigma_i} + \frac{R}{d} \sigma_m}, \quad (2)$$

kjer je  $c_m = \varepsilon_m/d$  kapacitivnost membrane. Časovna konstanta  $\tau$  predstavlja karakteristični čas polarizacije membrane, ki je obratno sorazmeren s frekvenco, pri kateri pride do betadisipacije. Za statični primer se ta enačba poenostavi v:

$$\Delta\Psi = g(\lambda) R E_0 \cos\theta. \quad (3)$$

Faktor  $g$  je odvisen od prevodnosti membrane, citoplazme in zunanega medija [4]. Pri normalnih fizioloških razmerah velja  $d \ll R$  in  $\sigma_m \ll \sigma_e, \sigma_i$  [13], tako da se zgornja enačba poenostavi v:

$$\Delta\Psi = 1.5 R E_0 \cos\theta, \quad (4)$$

v primeru, ko imamo nizko prevoden medij ali povečano prevodnost membrane, pa moramo uporabiti natančno enačbo. Faktor 1.5 lahko preprosto izpeljemo tako, da izračunamo polarizacijo neprevodne krogle v prevodnem zunanem mediju.

Pri elektroporaciji se zaradi strukturnih sprememb v membrani poveča prevodnost membrane. Posledica povečane prevodnosti je tako imenovano sesedanje vsiljene transmembranske napetosti, saj zaradi neenakomerne prevodnosti po površini membrane Schwanova enačba ne velja več.

Transmembranski potencial na celici, ki je permeabilizirana, lahko izračunamo po analitični ali numerični poti [4]. Rešujemo Laplace-ovo enačbo v sferičnih koordinatah, ki mora veljati v celici in zunaj nje:

$$\Delta\psi_i(r, \theta, \phi) = \Delta\psi_e(r, \theta, \phi) = 0. \quad (5)$$

Na membrani velja robni pogoj o ohranitvi toka:

$$j_i(R) = j_e(R), \quad (6)$$

iz česar sledi:

$$\sigma_i \left[ \frac{\partial\psi_i}{\partial r} \right]_{r=R} = \sigma_e \left[ \frac{\partial\psi_e}{\partial r} \right]_{r=R} = G [\psi_e - \psi_i]_{r=R}, \quad (7)$$

kjer je  $G$  prevodnost membrane. Uvedimo še brezdimenzijske količine:

$$\Psi_i = \frac{\psi_i}{R E_0}, \quad \Psi_e = \frac{\psi_e}{R E_0}, \quad r' = r/R, \quad (8)$$

$$v = \sigma_i / \sigma_e, \quad g(\theta) = R / \sigma_i G(\theta).$$

Funkcija  $g(\theta)$  opisuje prevodnost membrane, ki je odvisna od stopnje permeabilizacije in kota  $\theta$ .

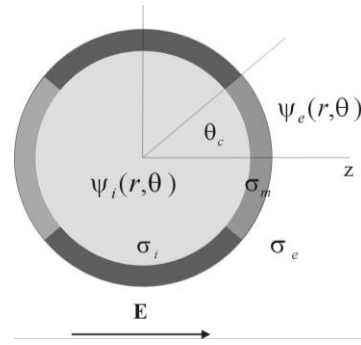
$$g(\theta) = \frac{[\partial\Psi_i / \partial r']_{r'=1}}{[\Psi_e - \Psi_i]_{r'=1}}. \quad (9)$$

Rešitvi Laplaceove enačbe zunaj celice in v njej lahko formalno zapišemo z razvojem po multipolih:

$$\Psi_i = c_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{c_n (r')^n P_n(\cos\theta)}{n}, \quad (10)$$

$$\Psi_e = \left[ r' + \frac{1}{2r'^2} \right] P_1(\cos\theta) + v \sum_{n=1}^{\infty} \frac{c_n P_n(\cos\theta)}{(n+1)(r')^{n+1}}. \quad (11)$$

Enačbe lahko rešimo analitično (dipolni približek) ali numerično [4].



Slika 1: Model permeabilizirane celice, temno osenčeno območje označuje neprevodno membrano, svetleje osenčeni pas pa permeabilizirani del.

Iz Schwanove enačbe lahko tudi izračunamo delež permeabilizirane površine membrane  $S_c$ , kjer transmembranska napetost presega kritično vrednost ( $\Delta\Psi > \Delta\Psi_c$ ). Najprej definirajmo kritični  $\theta_c$  kjer velja  $\Delta\Psi = \Delta\Psi_c$ , iz česar sledi:

$$\Delta\Psi_c = 1.5 R E_0 \cos\theta_c. \quad (12)$$

Kritično polje  $E_c$  definirajmo kot polje, kjer je  $\theta_c = 0$ , torej velja:  $E_c = U_c / 1.5R$ . Iz zgornjih enačb tako lahko izračunamo permeabiliziran delež površine  $S_c$ :

$$S_c = S_0 (1 - E_c / E), \quad (13)$$

ki je odvisen od zunajega električnega polja,  $S_0$  pa je celotna površina celične membrane.

Iz tega je razvidno, da zunanje električno polje ključno določa delež permeabilizirane površine – to je površine, čez katero poteka transport ionov, molekul pa tudi plazmidne DNK, kar je ključno za uspešno elektrotransfekcijo [13]. Seveda pa sam vnos molekul in inov določa še vrsta drugih parametrov, od fizikalnih (velikost molekul, drugi parametri pulzov, temperatura) do bioloških (celična linija, fiziološko stanje celice, itd.).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Celične kulture

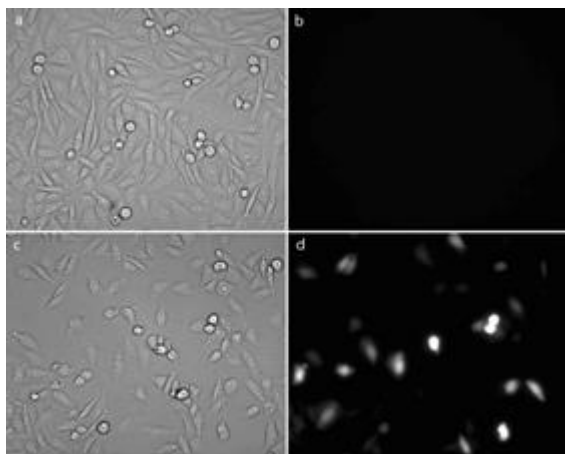
Za poskuse smo uporabili celično linijo CHO (ovarijske celice kitajskega hrčka; Evropska zbirka celičnih kultur, Velika Britanija) in in jo gojili v F-12HAM z dodanimi 10 % seruma telečjega zarodka in 0,15 mg/ml L-glutamina (Sigma-Aldrich Co, USA).

Za elektroporacijo smo uporabili 10 mM izosmolarni fosfatni pufer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  z dodanim magnezijevim kloridom ( $\text{MgCl}_2$ ) in saharozo.

#### 3.2 Genska elektrotransfekcija

##### 3.2.1 Pritrjene celice

Celice v eksponentni fazi rasti smo nasadili v mikrotiterske plošče s 24 razdelki v koncentraciji  $5 \times 10^4$  celic na razdelek. Celice smo gojili 24 ur v inkubatorju. Pred poskusom smo odstranili gojišče in dodali 150  $\mu\text{l}$  fosfatnega pufera s plazmidom pEGFP-N1 v koncentraciji 10  $\mu\text{g/ml}$  (Clontech, ZDA), ki nosi zapis za protein GFP (Green Fluorescent Protein). Dve do tri minute pozneje smo vzorec izpostavili električnim pulzom. Za elektroporacijo smo uporabili Cliniporator (IGEA s.r.l., Carpi, Modena, Italija). Vsak razdelek v mikrotiterski plošči smo izpostavili štirim električnim pulzom dolžine 200  $\mu\text{s}$ , s ponavljalno frekvenco 1 Hz ( $4 \times 200 \mu\text{s}$ ) in določeno amplitudo električnega polja. Dovedene amplitude električnega polja so bile: 0,3, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 in 1,4 kV/cm. Razdalja med elektrodama je bila 4 mm. Kontrolne celice niso bile izpostavljene električnim pulzom. V vsak razdelek smo nato dodali 1 ml gojišča in celice dali za 24 ur v inkubator na 37 °C.



Slika 2: Pritrjene celice CHO pod invertnim fluorescentnim mikroskopom: a) celice v negativni kontroli ( $E = 0$  kV/cm) pod faznim kontrastom, b) pripadajoča fluorescenca; c) celice, izpostavljene električnemu polju ( $E = 1.4$  kV/cm) in d), pripadajoča fluorescenca, kjer celice izražajo protein GFP

Po štiriindvajsetih urah smo določili delež uspešno transficiranih celic na mikroskopskih slikah pri 20-kratni povečavi objektivna z invertnim fluorescentnim mikroskopom (Axiovert 200, Zeiss, Nemčija). Zajeli smo vsaj sedem parov slik celic med elektrodama (MetaMorph imaging system, Visitron, ZR Germany). Vsak par je vseboval eno sliko faznega kontrasta (vse celice pri izbranem parametru) in eno sliko fluorescence (samo celice, ki so bile uspešno transficirane in izražajo GFP). Uspešnost transfekcije smo določili kot količnik celic, ki izražajo GFP in vseh celic v izbranem polju. Vsi poskusi so bili ponovljeni vsaj štirikrat v različnih dneh.

##### 3.2.2 Celice v suspenziji

Gensko elektrotransfekcijo pri celicah v suspenziji smo določili na celicah CHO, ki so bile v eksponentni fazi rasti. Celice smo tripsinizirali z 0,25-odstotno raztopino tripsin/EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Nemčija), nato pa smo jih pet minut centrifugirali pri 1000 obratih/minuto in 4 °C. Supernatant smo odstranili, pelet, v katerem so se nahajale celice, pa smo resuspendirali v elektroporacijskem pufru v koncentraciji  $2.5 \times 10^6$  celic/ml.

Za dovajanje električnih pulzov smo uporabili kivete z vgrajenimi 4 mm elektrodami (Eppendorf, Hamburg, Nemčija). V vsako kiveto smo dali 200  $\mu\text{l}$  vzorca. Nato smo dodali plazmid (pEGFP-N1) v koncentraciji 40  $\mu\text{g/ml}$ . Po 2–3 minutni inkubaciji smo jih izpostavili vlaklu pluzov  $4 \times 200 \mu\text{s}$  z različnimi vrednostmi električnega polja:  $E = 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4$  in  $1,6$  kV/cm in ponavljalno frekvenco 1 Hz. Celice v negativni kontroli niso bile izpostavljene električnim pulzom.

Po elektroporaciji smo celice inkubirali pet min pri 37 °C, nato smo dodali gojišče in jih gojili še nadaljnjih štiriindvajset ur. Celice smo tripsinizirali, jih centrifugirali in suspenzijo v koncentraciji  $1 \times 10^6$  celic/ml analizirali s pretočnim citomentrom (Coulter EPICS Altra flow cytometer, Beckman Coulter Electronics). Delež transficiranih celic, ki so izražale GFP, smo določili pri 509 nm in za vsak parameter ovrednotili 10.000 dogodkov.

Vse poskuse smo ponovili vsaj trikrat v različnih dneh.

#### 3.3 Vpliv električnih pulzov na preživetje elektroporiranih celic in celic, ki niso bile izpostavljene električnim pulzom

##### 3.3.1 Pritrjene celice

Poskus smo izvedli podobno kot gensko elektrotransfekcijo pritrjenih celic, vendar celicam nismo dodali plazmidne DNK. Uporabili smo vlak pulzov  $4 \times 200 \mu\text{s}$  z različnimi vrednostmi električnega polja:  $E = 0,3$  kV/cm ( $U = 80$  V),  $E = 0,6$  kV/cm ( $U =$

120 V),  $E = 1.0$  kV/cm ( $U = 200$  V),  $E = 1.4$  kV/cm ( $U = 280$  V) in elektrode v razdalji 2mm.

Preživetje celic smo določili štiriindvajset ur po poraciji na slikah faznega kontrasta. Zajeli smo vsaj pet slik celic med elektroporirane celice (EP-celice) in vsaj pet slik celic zunaj elektrod (sosednje celice) za vsak parameter. Preživetje smo izračunali kot razmerje števila vseh celic v negativni kontroli in števila vseh prešteti celic pri določenem parametru. Predpostavili smo, da so celice v kontroli stooostotno viabilne.

Vsi rezultati so predstavljeni s srednjimi vrednostmi in standardnimi deviacijami.

### 3.3.2 Celice v suspenziji

Celice smo tripsinizirali, centrifugirali in pelet resuspendirali v elektroporacijskem pufu tako, da smo dobili koncentracijo  $2.5 \times 10^6$  celic/ml.

Za dovajanje električnih pulzov smo uporabili kivete z vgrajenimi 4 mm elektrodami (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

V vsako kiveto smo dali 150  $\mu$ l vzorca. Celice smo izpostavili vlaklu pulzov  $4 \times 200$   $\mu$ s z različnimi vrednostmi električnega polja:  $E = 1.4$  kV/cm ( $U = 280$  V) in  $E = 2$  kV/cm ( $U = 400$  V). Celice v negativni kontroli niso izpostavljene električnim pulzom.

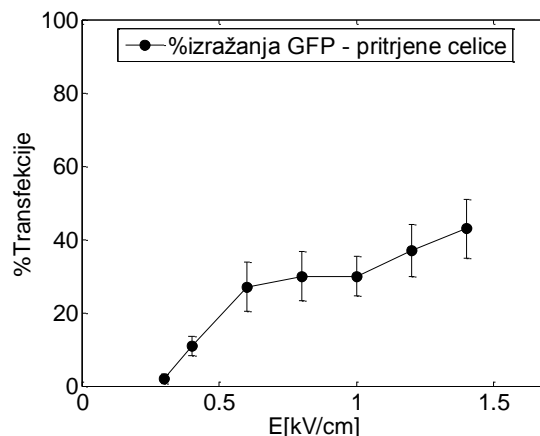
Elektroporirane celice (EP celice) smo po elektroporaciji ponovno centrifugirali in resuspendirali v elektroporacijskem pufu, medtem ko smo supernatant dodali celicam, ki niso bile izpostavljene električnim pulzom (supernatant).

Vzorci vseh celic smo odpipetirali v mikrotitrsko ploščo s 96 razdelki ter jih inkubirali na 37 °C za pet minut in jim nato dodali gojišče. Preživetje smo določili s testom MTS po navodilih izdelovalca 24 in 48 ur po elektroporaciji. Preživetje celic smo določili kot razmerje med izmerjenimi vrednostmi v vzorcih in vrednostmi izmerjenimi v negativni kontroli. Naredili smo tri neodvisne poskuse za vsak parameter in rezultate predstavili kot srednjo vrednost  $\pm$  standardna napaka.

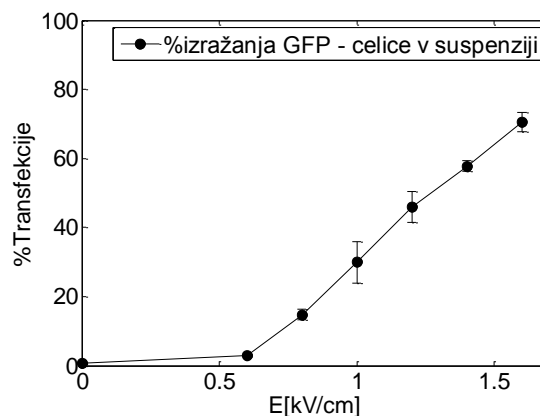
## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V že objavljenih delih [11–16] smo analizirali vpliv jakosti električnega polja na elektrogensko transfekcijo CHO celice (pritrjenih in v suspenziji), prikazano na sliki 3.

A)



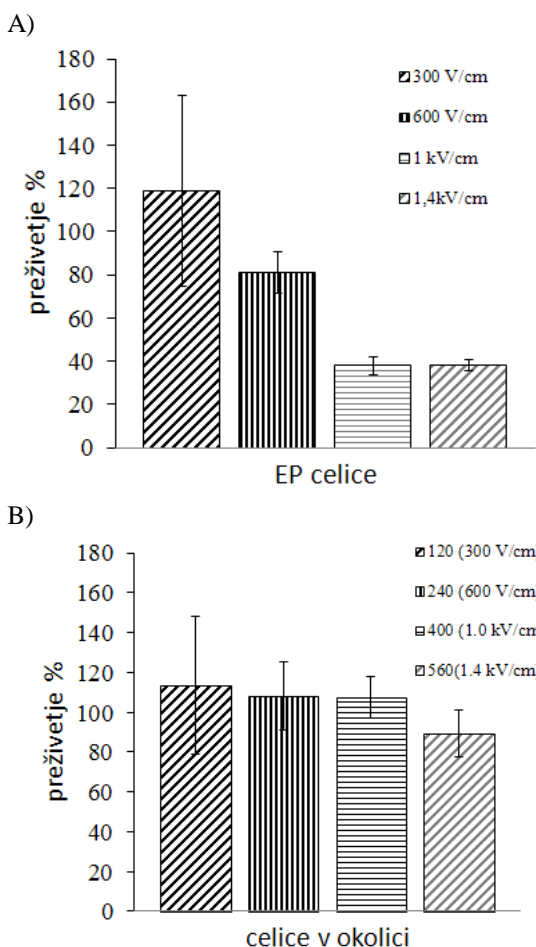
B)



Slika 3: Delež elektrotransfektiranih CHO-celic v odvisnosti od jakosti električnega polja  $E = U/d$  A) pritrjenih celic in B) celic v suspenziji. Celice so bile izpostavljene vlaklu 4 pulzov  $4 \times 200$   $\mu$ s, 1 Hz ponavljalne frekvence.

Objavljene rezultate smo nadgradili z novimi poskusi, s katerimi smo ovrednotili vpliv električnih pulzov na celice, ki jim niso bile neposredno izpostavljene. Primerjali smo pritrjene celice in celice v suspenziji in določili delež preživelih celic (slika 4). Z naraščajočo električno poljsko jakostjo preživetje upada. Zanimalo nas je tudi, ali take celice proizvajajo kakšne signalne molekule, ki vplivajo na preživetje sosednjih celic. Pri poskusih na pritrjenih celicah smo določili preživetje celic, ki so se nahajale zunaj območja električnih pulzov (celice v okolici).

Pri celičnih suspenzijah pa smo ugotavljali vpliv supernatanta elektroporiranih celic na preživetje ne-elektroporiranih celic.



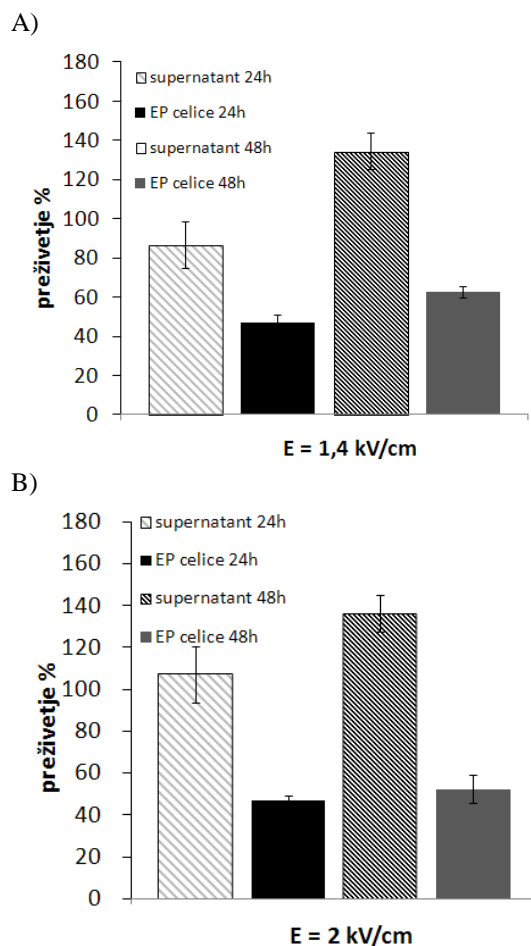
Slika 4: Vpliv amplitude električnih pulzov na preživetje pritrjenih CHO-celic: A) Celice smo izpostavili vlaklu štirih električnih pulzov  $4 \times 200 \mu\text{s}$ , 1 Hz ponavljalne frekvence, amplituda pulzov je bila 300V/cm, 600V/cm, 1 kV/cm in 1.4 kV/cm – EP celice, B) pritrjene celice, ki niso bile izpostavljene električnim pulzom (celice v okolici) v istem razdelku mikrotiterske plošče kot elektroporirane celice – celice v okolici. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost treh neodvisnih poskusov  $\pm$  standardna napaka.

Na sliki 4 A je prikazano zmanjšanje deleža živih celic v odvisnosti od jakosti električnega polja za pritrjene celice, izpostavljene električnim pulzom. Kot smo pričakovali in v skladu z našimi že objavljenimi rezultati [11–13], preživetje celic vpada z naraščajočo amplitudo električnih pulzov.

Da bi ugotovili, kako vpliva fiziološko stanje elektroporiranih umirajočih celic na sosednje celice, smo določili tudi njihovo preživetje glede na kontrolo (slika 4B). Te celice so rastle v neposredni bližini elektroporiranih celic. Iz grafa je razvidno, da elektroporacija celic ne vpliva na preživetje sosednjih celic. Viabilnost teh celic je 100-odstotna in vsa odstopanja lahko pripišemo napaki poskusov. Pri napetostih 300, 600 V/cm in 1 kV/cm opazimo tendenco boljšega preživetja v primerjavi s celicami negativne kontrole. Pri teh poskusih smo preživetje celic določili

24 ur po izpostavitvi električnim pulzom, ko razlike še niso bile tako očitne. Pri deležu preživetja pritrjenih celic (slika 4) je opaziti visoko variabilnost (visoke vrednosti standardne napake), kar lahko pripišemo razlikam v obliki celic, velikosti in orientaciji glede na smer električnega polja. Vsi naštetih dejavnikov pripomorejo k nehomogeni elektroporaciji in posledično k razlikam v deležu preživelih celic po elektroporaciji. Preživetje celic v okolici je ostalo višje od 90 % tudi, ko so bile elektroporirane celice izpostavljene vlaklu pulzov z amplitudo 1.4 kV/cm.

Da bi dobili jasnejšo sliko o vplivu elektroporiranih celic na neelektroporirane celice, smo naredili dodatne poskuse, pri katerih smo uporabili celice v suspenziji. Te celice so okrogle in imajo manjši razpon velikosti kot pritrjene celice zato na ta način lahko izločimo vpliv velikosti in oblike celic na elektroporacijo in zmanjšamo variabilnost eksperimentalnih rezultatov. Delež preživelih celic smo določali 24 in 48 ur po elektroporaciji.



Slika 5: Celice v suspenziji, ki smo jih izpostavili  $4 \times 200 \mu\text{s}$  pulzom 1 Hz in A) amplitude 1.4 kV/cm in amplitude 2.0 kV/cm. Delež preživelih celic smo določili 24 in 48 ur po tretmaju. EP-celice so bile neposredno izpostavljene električnim pulzom, celice z oznako supernatant pa so bile izpostavljene supernatantu elektroporiranih celic. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost treh neodvisnih poskusov  $\pm$  standardna napaka.

Na sliki 5A so predstavljeni rezultati deleža preživelih celic, ki smo jih izpostavili vlaklu štirih električnih pulzov z amplitudo 1.4 kV/cm (EP celice), in celic, ki smo jih izpostavili supernatantu elektroporiranih celic (supernatant). Prva dva stolpca rezultatov prikazujeta delež preživelih celic 24 ur po elektroporaciji, medtem ko druga dva stolpca predstavljata preživetje celic 48 ur po tretmaju. Po 24 urah opazimo vpad deleža preživelih elektroporiranih celic, preživetje celic, ki so bile izpostavljene samo supernatantu, pa ostaja na ravni kontrolnih netretiranih celic. Isti vzorec po 48 urah kaže podoben delež živih celic kot en dan prej za elektroporirane celice. Delež preživelih celic, ki so bile tretirane s supernatantom poriranih celic, pa je povečan na 140 % kontrole in ta razlika je višja od variacij zaradi eksperimentalne napake poskusov.

Na sliki 5B vidimo delež preživelih celic pri električnih pulzih napetosti 2 kV/cm. Tudi pri tej napetosti opazimo podoben odziv. Celice, ki niso bile neposredno izpostavljene električnim pulzom, rastejo bolje kot celice v kontroli in razlika je največja 48 ur po elektroporaciji.

Naše rezultate bi lahko pojasnili s predpostavko, da elektroporirane celice v elektroporacijski pufer izločajo snov, ki stimulira rast sosednjih celic. Ker je ta snov prisotna v supernatantu, povzroči povečanje števila celic, ki so bile tretirane s supernatantom. Iz do zdaj objavljene literature ni razvidno, katera snov (signalna molekula) bi to bila. Objavljene so bile študije, ki opozarjajo, da pri elektroporaciji nastajajo prosti kisikovi radikali ROS (reactive oxigene species) [18]. Zanimivo je tudi, da imajo molekule ROS dvojni učinek na biološke procese v celici; učinkujejo tako zavirajoče kot tudi stimulatивно. Za gensko elektrotransfekcijo je dobro preživetje celic zelo pomembno, še zlasti za vse aplikacije, kjer imamo na voljo majhno število celic, namenjenih elektrotransfekciji [13, 17]. Naši rezultati pripomorejo k razumevanju odziva celic na izpostavitve stresnim pogojem, ki jih pomenijo električni pulzi amplitude 1–2 kV/cm. Razumevanje odziva celic je pomemben korak, ki pripomore k prepoznavanju različnih dejavnikov, vključenih v kompleksni proces genske elektrotransfekcije. V pričujoči študiji smo predstavili preliminarne rezultate, potrebne pa bodo nadaljnje raziskave, ki bodo potrdile ali ovrgle naše rezultate. Širše pa so ti rezultati zanimivi za vse aplikacije elektroporacije, od genske elektrotransfekcije do elektrokemoterapije [19].

## 5 SKLEPI

Naši rezultati kažejo, da preživetje CHO-celic, ki so bile izpostavljene električnim pulzom amplitude 1 kV/cm ali več, z amplitudo električnega pulza pada. Če primerjamo pritrjene celice in celice v suspenziji, opazimo razliko v variabilnosti rezultatov. Ta razlika je posledica različnih velikosti in orientacij celic v električnem polju, kar povzroči razlike v vsiljeni

transmembranski napetosti in posledično razlike v elektroporaciji celične membrane [15, 16]. Rezultati preživetja celic, ki niso bile neposredno izpostavljene električnim pulzom, temveč samo poracijskemu pufru elektroporiranih celic, kažejo boljše preživetje kot kontrolne celice. Mogoče je, da elektroporirane celice v pufer izločajo snov, ki vpliva na preživetje neelektroporiranih celic. Rezultati so zanimivi, potrebne pa bodo nadaljnje raziskave.

## LITERATURA

- [1] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider, Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields, *EMBO J.* 1 (1982) 841–845.
- [2] M. J. Jaroszeski, R. Heller, R. Gilbert, *Electrochemotherapy, electrogenetherapy and transdermal drug delivery: electrically mediated delivery of molecules to cells*, (1999) Humana Press, New Jersey.
- [3] J. C. Weaver, Y. A. Chizmadzhev, Theory of electroporation: A review, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 41 (1996) 135–60.
- [4] M. Pavlin and D. Miklavčič, Effective conductivity of a suspension of permeabilized cells: a theoretical analysis, *Biophys. J.* (2003) 85: 719–729.
- [5] G. J. Prud'homme et al. Electroporation-enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases, *Current Gene Ther* 6: 243–273 (2006).
- [6] M. P. Rols, J. Teissie. Electroporation of mammalian cells to macromolecules, *Biophys. J.* 75:1415–1423 (1998).
- [7] M. Golzio, J. Teissie, M. P. Rols, Direct visualization at the single cell level of electrically mediated gene delivery, *PNAS* 99 (2002)1292–1297.
- [8] C. Faurie, E. Phez, M. Golzio, C. Vossen, J. C. Lesbordes, C. Delteil, J. Teissie, M. P. Rols, Effect of electric field vectoriality on electrically mediated gene delivery in mammalian cells, *BBA*. 1665 (2004), 92–100.
- [9] S. I. Sukharev, V. A. Klenchin, S. M. Serov, L. V. Chernomordik, Y. A. Chizmadzhev, Electroporation and electroporetic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores, *Biophysical Journal* 63 (1992) 1320–1327.
- [10] S. Šatkauskas, M. F. Bureau, M. Puc, A. Mahfoudi, D. Scherman, D. Miklavčič, L.M. Mir, L.M. Mechanisms of in vivo DNA electro transfer, Respective contributions of cell electroporation and DNA electrophoresis, *Molecular Therapy* 5 (2002) 1–8.
- [11] M. Kandušer, D. Miklavčič M. Pavlin, Mechanisms involved in gene electrotransfer using high- and low-voltage pulses – An in vitro study. *Bioelectrochemistry*. 74 (2009): 265–271.
- [12] M. Pavlin, K. Fliser, M. Kandušer. The role of electrophoresis in gene electrotransfer. *The Journal of Membrane Biology* 236 (2010) 75–79.
- [13] M. Kandušer and M. Pavlin Gene electrotransfer: from understanding the mechanisms to optimization of parameters in tissues In *Advances in planar lipid bilayers and liposomes* (A. Iglic ed), (2012) Elsevier.
- [14] S. Haberl, M. Kandušer, K. Fliser, V. B.regar, D. Miklavčič, J. M.ESCOFFRE, M. P. Rols M. P., M. Pavlin. Effect of different parameters used for in vitro gene electrotransfer on gene expression efficiency, cell viability and visualization of plasmid DNA at the membrane level. *J. Gene Med.* 15 (2013) 169–181.
- [15] B. Valič, M. Golzio, M. Pavlin, A. Schatz, C. Faurie, B. Gabriel, J. Teissie, M. P. Rols, D. Miklavčič Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur. Biophys. J.* 32 (2003) 519–528.

- [16] Marjanovič, S. Haberl, D. Miklavčič, M. Kandušer, M. Pavlin. Analysis and comparison of electric pulse parameters for gene electrotransfer of two different cell lines. *The Journal of Membrane Biology* 236 (2010) 97–105.
- [17] M. Reberšek, M. Kandušer, D. Miklavčič, Pipette tip with integrated electrodes for gene electrotransfer of cells in suspension: a feasibility study in CHO cells. *Radiol. Oncol.* 45 (2011) 204–208.
- [18] Ray P. D., Huang B.-W., Tsuji, Reactive oxygene species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signaling* 24 (2012): 981–990.
- [19] D. Pavliha, M. Reberšek, D. Miklavčič, Krmilnik biomedicinskega visokonapetostnega signalnega generatorja z grafičnim uporabniškim vmesnikom, *Elektroteh. Vestn.* 78 (2011) 281–286.

**Mojca Pavlin** je diplomirala leta 1998 na Fakulteti za matematiko in fiziko, oddelek za fiziko, Univerze v Ljubljani, leta 2003 pa je doktorirala s področja elektrotehniko-biomedicinske tehnike na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Leta 1998 se je zaposlila na Fakulteti za elektrotehniko, kjer od leta 2010 vodi Skupino za nano in biotehnoške aplikacije. Njeno raziskovalno delo zajema teoretično delo na področju razvoja analitičnih in numeričnih modelov kompozitnih materialov, analize interakcij EM polj z biološkimi sistemi ter analize difuzije pri vnosu učinkovin, kot tudi eksperimentalno delo, ki zajema različne metode vnosa učinkovin v celice in razvoj biomedicinskih aplikacij za dostavo učinkovin, predvsem z gensko elektrotransfekcijo ter z uporabo magnetnih nanodelcev.

**Ana Angela Kumer** je študentka univerzitetnega študija Fakultete za elektrotehniko na Univerzi v Ljubljani. Raziskovalno se je ukvarjala z analizo vpliva elektroporacije na preživetje celic v različnih razmerah.

**Maša Kandušer** je diplomirala leta 1989 na oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Doktorirala je leta 1997 na oddelku za rastlinsko fiziologijo (Departamento de Fisiología vegetal) Visoke tehnične šole za agronomijo (Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agronomos) na Politehniški univerzi v Valencii (Universidad Politécnica de Valencia). Leta 1998 se je zaposlila na Fakulteti za elektrotehniko in od leta 2008 vodi infrastrukturni center Celična elektrotehnika na Fakulteti za elektrotehniko MRIC UNI-LJ. V zadnji letih se ukvarja z raziskavami na področju elektroporacije, in sicer z gensko elektrotransfekcijo, elektrofuzijo in ireverzibilno elektroporacijo bakterij.