

Elektroporacija Electroporation

Alenka Maček Lebar*, Gregor Serša**, Maja Čemažar***, Damijan Miklavčič****

Ključne besede
elektroporacija
genska terapija
zdravljenje z zdravili

Key words
electroporation
gene therapy
drug therapy

Izvleček. Elektroporacija je pojav, pri katerem se zaradi prisotnosti električnega polja začasno poveča prepustnost celične membrane. Ob povečani prepustnosti lahko v celico vstopijo različne majhne in velike molekule, za katere je sicer celična membrana nepremagljiva ovira. Na elektroporacijo vplivajo številni dejavniki. Kako bo elektroporacija potekala, je odvisno od parametrov, ki določajo električno polje: električne poljske jakosti, trajanja posameznega pulza, števila in frekvence pulzov, pa tudi od drugih fizikalnih dejavnikov, na primer temperature, prevodnosti poracijskega medija, ozmotskega tlaka in popolnosti celičnega skeleta. Z električnim poljem lahko povečamo prepustnost celične membrane vsaki celici. Električno polje nizkih jakosti ne prizadene celičnega preživetja ali celičnih organelov in povzroči le minimalne motnje membranskih funkcij. Te lastnosti so vzrok njene široke uporabnosti. Elektroporacija je pojav, ki ga s pridom uporabljajo v biokemičnih in celičnih laboratorijih, čedalje večje pa so tudi njene možnosti za uporabo pri kliničnem delu.

Abstract. Electroporation is a process, which causes transient high-permeability of the cell membrane due to application of electric field. In the state of high-permeability, membrane allows different kinds of small and large molecules to be introduced into the cytoplasm, although the cell plasma membrane represents a formidable barrier for them in its normal state. Electroporation is governed by many parameters. Parameters of applied electric field which affect electroporation are the electric field strength, number of pulses, duration of each pulse and applied frequency. Electroporation is also affected by other parameters such as temperature, conductivity of the poration medium, osmotic pressure and cytoskeleton integrity. Transient high-permeability state induced by applied electric field can be obtained on each and every cell, it does not affect cell viability, it does not affect cell organelles and causes minimal irregularities in membrane functions. Therefore, applicability of electroporation is wide. It is a phenomenon which is already widely used in biotechnology cell biology and its importance in clinical practice is growing.

Uvod

V uvodu k »bibliji« o elektroporaciji in elektrofuziji, knjigi Eberharda Neumanna in soavtorjev z naslovom *Electroporation and electrofusion in cell biology* (1), piše: »Celice so lahko zelo smešne. Le za malenkost jim spremenimo gojišče ali ostale pogoje, v katerih rastejo, in kot bi mignil, odmrejo. Lahko pa jih vzdražimo z električnim poljem, ki je dovolj veliko, da bi ubilo konja, in počele bodo tako neverjetne stvari, da znanstveniki o tem razpravljajo na konferencah, pišejo obsežne knjige in govorijo o čisto novi tehnologiji celične manipulacije.«

*As. mag. Alenka Maček Lebar, dipl. ing. elek., Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška 25, 1000 Ljubljana.

**Izr. prof. dr. Gregor Serša, dipl. biol., Onkološki inštitut, Oddelek za tumorsko biologijo, Zaloška 2, 1000 Ljubljana.

***Mag. Maja Čemažar, dipl. biol., Onkološki inštitut, Oddelek za tumorsko biologijo, Zaloška 2, 1000 Ljubljana.

****Izr. prof. dr. Damijan Miklavčič, dipl. ing. elek., Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška 25, 1000 Ljubljana.

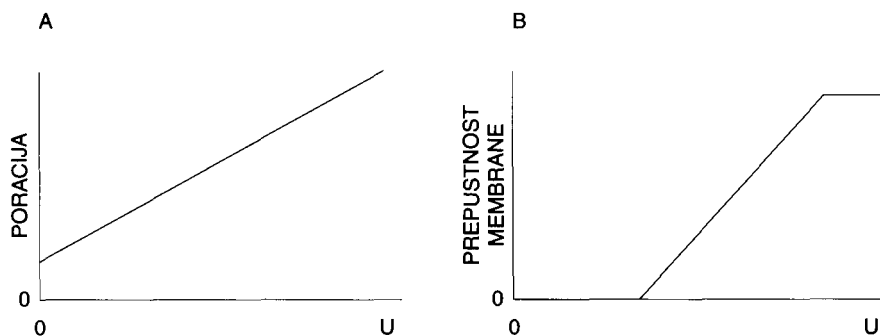
Zakaj spremembe zunanjega električnega polja celice lažje prenašajo kot spremembe drugih dejavnikov svojega okolja? Kakšne posledice, če sploh, pušča električno polje na preživelih celicah? Znanost bo počasi poiskala odgovora na ti dve vprašanji.

Homogeno električno polje deluje na nabite delce s silo, ki je sorazmerna električni poljski jakosti. Nenabite delce skuša električno polje deformirati. V nehomogenem električnem polju na nenabite delce deluje sila, ki povzroči njihovo gibanje. Ta sila je odvisna od kraja in je sorazmerna gradientu energije, le-ta pa je sorazmerna kvadratu električnega polja. V električnem polju lahko torej pride do gibanja celic, celice zaradi prisotnosti električnega polja spremenijo obliko, se uredijo v verige in se v polju orientirajo ... Pulzirajoče električno polje povzroči povezavo dveh ločenih membran v eno, zlitje celic, poveča prepustnost celične membrane in membran celičnih organelov. V rotirajočem električnem polju se celice vrtijo. V tej gruči pojavov, ki jih vzbudi električno polje, se bomo omejili na povečanje prepustnosti celične membrane; pojav, ki so ga poimenovali elektroporacija (1) oziroma elektropermeabilizacija.

V petdesetih in šestdesetih letih se je pojavila vrsta publikacij, ki so opisovale, da zunanje električno polje lahko vsili velik membranski potencial na obeh polih celice. Raziskovalci so vedeli, da lahko zelo veliko električno polje povzroči celično smrt (2, 3). Sale in Hamilton sta s poskusi na različnih bakterijah in eritrocitih ugotovila, da lahko transmembranski potencial, ki doseže kritično vrednost, povzroči spremembe v strukturi membrane, katerih rezultat je izguba polprepustnosti. Kritično vrednost transmembranskega potenciala sta izračunala iz povprečnega premera celic in električne poljske jakosti, ki je povzročila uničenje 50 % celic v opazovani populaciji. Izračunane vrednosti vsiljene spremembe transmembranskega potenciala so se pri vseh opazovanih celicah vrtele okrog enega volta (4). Proti koncu sedemdesetih so odkrili, da električno polje, ki ga dovedemo v obliki zelo kratkega pulza, sicer poruši polprepustno strukturo membrane, vendar celica to lahko popravi in vzpostavi prvotno stanje (5). V začetku osemdesetih so se pojavila poročila, da lahko ob permeabilizaciji membrane v celico vstopijo različne majhne molekule, kot so ioni, barvila in sladkorji, kasneje pa tudi o vnosu različnih makromolekul, kot so DNA in zdravila (6). V zadnjem času je uporaba tega pojava skokovito narasla in se razširila, saj je povečanje prepustnosti celične membrane z električnim poljem neinvazivna, nekemična metoda, ki kakor kaže, ne prizadene biološke strukture in funkcij celice. Ker gre za fizikalno metodo, je uporabna za vse vrste celic, tj. bakterije, rastlinske in živalske celice.

Elektroporacija – opis pojava

Elektroporacija je pojav, pri katerem zaradi prisotnosti že kratkotrajnega visokonapetostnega električnega pulza v celični membrani nastajajo strukturne spremembe, največkrat jih imenujemo kar »pore«. Ob zadostnem številu le-teh in njihovi ustreznih velikosti se poveča prepustnost plazmaleme (slika 1). To povečanje prepustnosti membrane omogoči ionom, majhnim molekulam, zdravilom in makromolekulam, za katere je sicer celična membrana nepremagljiva ovira, neposreden vstop v celično notranjost. Sprememba prepustnosti je lahko ireverzibilna (celica odmre) ali reverzibilna in je posledica znatnih

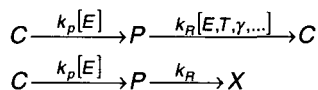


Slika 1. Elektroporacija in prepustnost membrane v odvisnosti od napetosti. A – zaradi prisotnosti kratkotrajnega visokonapetostnega električnega pulza nastajajo v membrani strukturne spremembe; največkrat jih imenujemo pore, pojav pa elektroporacija. B – šele ko je število por in njihova velikost dovolj velika, se poveča prepustnost celične membrane.

sprememb v strukturi membrane, katerih natančni molekularni mehanizmi še vedno niso dobro poznani. Obstaja sicer vrsta modelov (7), ki opisujejo te mehanizme, toda rezultati poskusov niso še nobenega povsem potrdili.

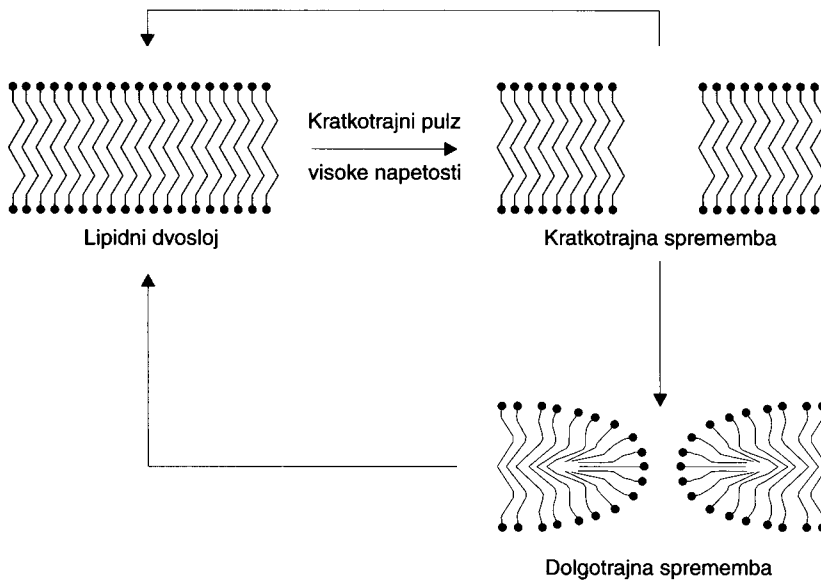
Povečanje prepustnosti celične membrane z električnimi pulzi lahko dosežemo tako na celicah, ki rastejo v celični suspenziji, kot tudi na tistih, ki rastejo v plasti, pritrjene na steno posode; *ex vivo* na tkivih in celicah in *in vivo* na tkivih.

V splošnem lahko spremembe v strukturi membrane opišemo s preprosto shemo, kakršnih smo vajeni iz kemije (8):



Začetno stanje celične membrane, ki ima nizko prevodnost v primerjavi z visoko prevodnostjo citoplazme oziroma zunanjega medija, smo označili s C. Stanje povečane prepustnosti membrane označimo s P. Hitrostni koeficient elektroporacije je označen s $k_p[E]$ in je reda mikrosekund. Ko električno polje izključimo, se začne membrana urejati nazaj v prvotno stanje; hitrost tega procesa opisuje koeficient k_R . Koeficient k_R je lahko tudi reda minut. Če je elektroporacija povezana z vnosom snovi v celico ali izpuščanjem snovi iz celice, potem na ta način spremenjeno celico opišemo s tretjim stanjem, ki smo ga označili z X.

Zaradi zunanjega električnega polja se transmembranski potencial spremeni v nekaj mikrosekundah (7, 9). Če je sprememba transmembranskega potenciala dovolj velika, se zaradi nje spremeni struktura membrane. Sprememba transmembranskega potenciala je premosorazmerna jakosti električnega polja in velikosti celice, ter je odvisna od položaja na membrani. Čim bolj pravokotno tokovnice električnega polja prebadajo površino celice, tem večja je na tem mestu sprememba transmembranskega potenciala.



Slika 2. Zelo preprosta shema por v membrani. Strukturne spremembe se med prisotnostjo zunanje električnega polja večajo oziroma množijo. To so kratkotrajne spremembe v strukturi celične membrane. Ko zunanje električno polje izključimo, se lahko kratkotrajne strukturne spremembe preuredijo v osnovno stanje, ali pa v nekaj mikrosekundah zavzamejo stabilno konfiguracijo. Tako nastale spremembe imenujemo dolgotrajne, saj se le počasi (nekaj 10 minut) preuredijo v izhodiščno stanje.

Prepustnost celične membrane nastopi pri pragovni vrednosti transmembranskega potenciala. Večinoma prevladuje mnenje, da znaša pragovna vrednost transmembranskega potenciala približno 1 V (10), čeprav v literaturi omenjajo tudi nižje vrednosti – okoli 200 mV (11).

Do kakšnih strukturnih sprememb pride v membrani zaradi prisotnosti električnega polja, nam zaenkrat ni znano. Največkrat si jih predstavljamo kot nekakšne pore v membrani – od tu izraz elektroporacija (slika 2).

Strukturne spremembe v celični membrani, ki nastanejo v prisotnosti električnega polja, so nekakšen tristopenjski proces (1). Pojavijo se ob pragovni transmembranski napetosti, ki seveda zahteva pragovno vrednost jakosti zunanje električnega polja. Strukturne spremembe se med prisotnostjo zunanje električnega polja večajo oziroma množijo. To so kratkotrajne spremembe v strukturi celične membrane. Ko zunanje električno polje izključimo, se lahko kratkotrajne strukturne spremembe preuredijo v osnovno stanje, ali pa v nekaj mikrosekundah zavzamejo stabilno konfiguracijo. Tako nastale spremembe imenujemo dolgotrajne, saj se le počasi (tudi nekaj 10 minut) preuredijo v izhodiščno stanje (slika 2).

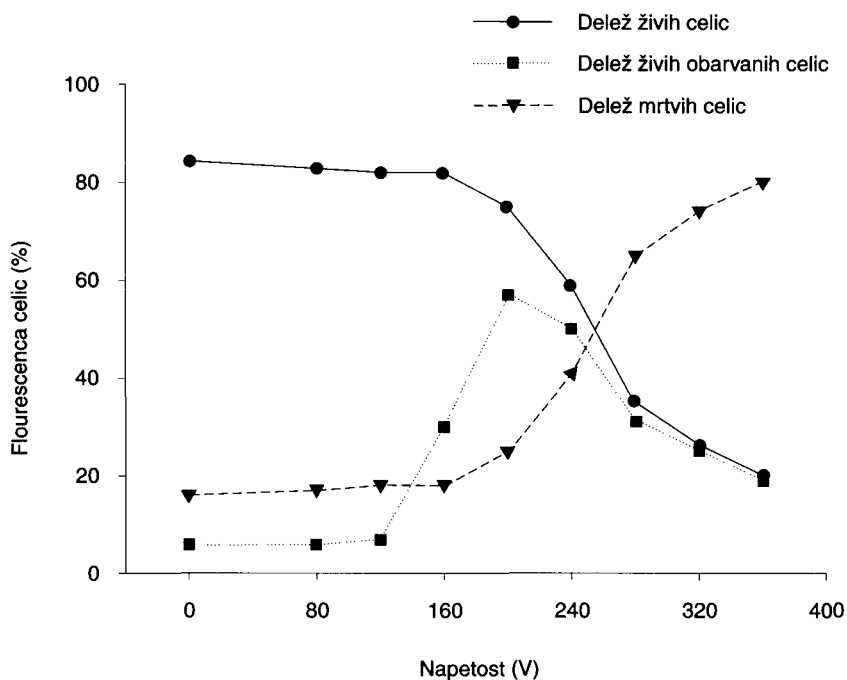
Povečanje prepustnosti membrane, ki ga povzroči električno polje, omogoča vstop v celico različnim molekulam, od preprostih ionov do makromolekul. Kako bo molekula prišla

v celico, pa je odvisno od njene velikosti, molekularne teže in naboja (tabela 1). Danes prevladuje mnenje, da so dolgotrajne spremembe v strukturi membrane nekakšne vodne poti (12), ki omogočajo ionom in majhnim molekulam (do nekaj kDa) vstop v celico. Ko se prične povečevati prepustnost membrane, se vnos molekul povečuje z višanjem električne poljske jakosti in hitro doseže največjo vrednost (plato) (slika 1B). Pri nizkih jakostih električnega polja je transport nadzorovan z nekim, od električnega polja odvisnim procesom (13). Zaenkrat vseh zakonitosti tega procesa še ne poznamo. Zaradi nekaterih lastnosti bi lahko sklepali, da je neznan proces elektroosmoza (14); zaradi drugih, da je elektroforeza (12). Pri višjih električnih poljskih jakostih, to je tistih, pri katerih dosežemo plato vnosa molekul, pa transport ni več odvisen od jakosti električnega polja (13). Tudi natančna narava tega procesa ni poznana, lahko bi bila tudi preprosta difuzija (7). Mnogi poskusi so namreč pokazali, da se koncentraciji majhnih molekul v notranjosti celice in v njeni okolici po elektroporaciji praktično ujemata (5, 15), kar podpira hipotezo, da je difuzija možna oblika transporta teh molekul. Ker lahko majhne molekule dodamo v celično okolico tudi po aplikaciji električnega polja, sklepamo, da so za njihov vnos odločilne dolgotrajne spremembe v celični membrani, ki jih lahko povzročimo že s kratkimi električnimi pulzi (16).

Tabela 1. Molekule, ki jih zelo pogosto uporabljamo za študij elektroporacije. Predstavljene so njihove molekularne teže in količina molekul (glede na zunanjo količino), ki lahko pride v notranjost uspešno permeabilizirane celice ob optimalnih pogojih elektroporacije. PI – propidijev jodid, BLM – bleomicin in PAP – ribosomska deaktivacijska beljakovina.

Molekula	Molekularna teža (Da)	Količina molekul v notranjosti celice glede na zunanjo koncentracijo (%)
Lucifer rumeno	457	100
PI	660	90
BLM	1500	30
Fragmenti oligonukleotidov	3000	20
PAP	30.000	10
FITC dekstran	70.000	<< 1
Protitelesa	150.000	0,1

Makromolekule (protitelesa, encimi, nukleinske kisline, nekatera zdravila) vstopijo v celico le v primeru, če so prisotne že med aplikacijo električnega polja; sklepamo, da so za njihov vnos odločilne kratkotrajne spremembe v strukturi membrane (10). Makromolekule zato potrebujejo dlje trajajoče pulze ali večje število krajših pulzov (1, 17). V literaturi opisanih poskusih ni navedeno, da bi se koncentracija makromolekul v celični notranjosti izenačila s koncentracijo makromolekul v celični okolici. Mehanizem prenosa teh molekul se zelo verjetno razlikuje od preproste difuzije. Koliko makromolekul bo med prisotnostjo električnega polja prišlo v celico, je odvisno od njihove molekularne teže; težjih molekul bo v celico vstopilo manj kot lažjih (18).



Slika 3. Delež živih, fluorescentnih in mrtvih celic v odvisnosti od napetosti. Celice DC3F so bile izpostavljene osmim pulzom dolžine 100ms ob prisotnosti propidijevega jodida.

Višja je jakost električnega polja, več celic je elektroporiranih. Toda hkrati se povečuje tudi delež celic, ki jih močno električno polje uniči (slika 3). Kadar je jakost električnega polja zelo velika, elektroporacije ne preživi nobena celica. Celično smrt zaradi prisotnosti močnega električnega polja razlagata dve hipotezi (19):

- v nekaterih delih membrane nastane nenadna intenzivna sprememba v strukturi membrane, ki povzroči nastanek velike nepopravljive luknje v membrani;
- skozičasne pore v membrani stečejo tokovi v notranjost celice in iz celice, kar tako močno poruši kemijsko ravnovesje, ki ga sicer vzdržuje membrana, da celica te spremembe ne preživi.

Zaenkrat sta to le hipotezi. Dodatne raziskave bodo pokazale, katera izmed obeh hipotez je pravilna; lahko pa bo čas obe ovrgel.

Dejavniki, ki vplivajo na elektroporacijo

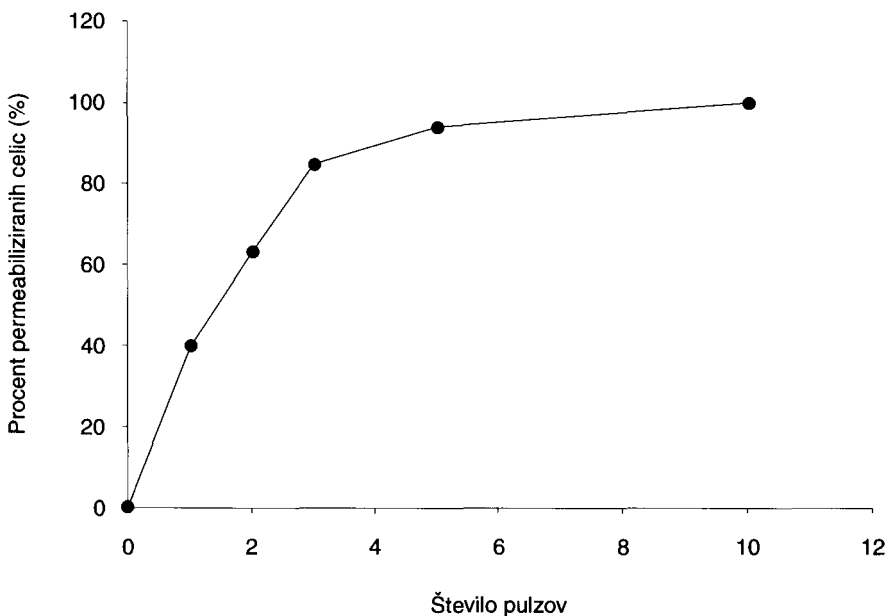
Na elektroporacijo in povečanje prepustnosti celične membrane ter vnos eksogenih molekul vplivajo številni dejavniki. Naše današnje znanje še ni popolno, zato se bomo omejili

predvsem na električne parametre, kot so jakost električnega polja, trajanje pulza, število pulzov, frekvenca aplikacije pulzov in na nekatere druge dejavnike, za katere že vemo, da vplivajo na elektroporacijo.

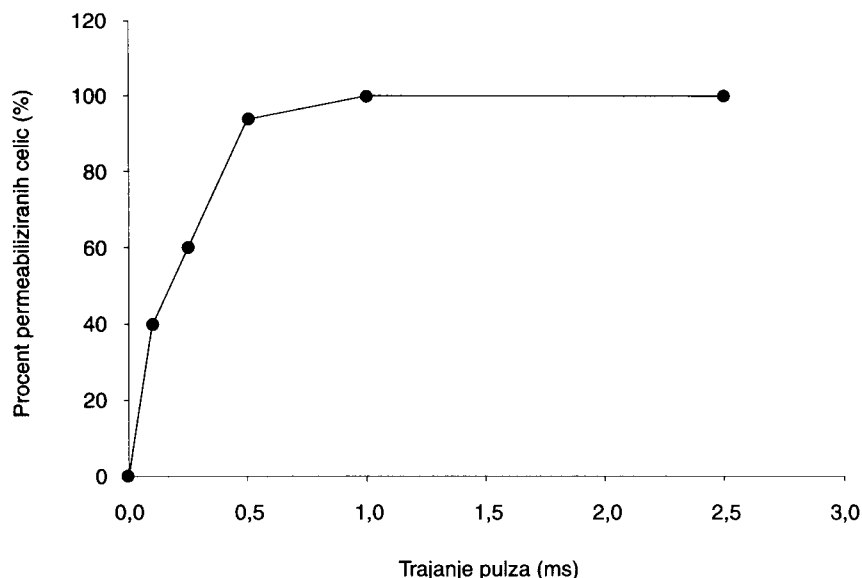
Parametri električnega polja

Elektroporacijo celice dosežemo tako, da damo celico v električno polje z ustrezno električno poljsko jakostjo. Električna poljska jakost mora biti višja od pragovne in hkrati dovolj nizka, da plazmaleme ne poškoduje trajno.

Pri električni poljski jakosti, ki je višja ali enaka pragovni, tako povečanje števila pulzov (slika 4), kot tudi podaljšanje trajanja pulzov (slika 5) izboljša učinkovitost permeabilizacije; seveda le do nekega platoja, ki ga dosežemo že pri relativno majhni vrednosti tako trajanja kot števila pulzov (13, 20). Permeabilizacija je bolj učinkovita, če je čas med posameznimi pulzi krajši (20). Pri vseh teh parametrih pa so seveda vrednosti omejene z njihovim vplivom na preživetje celic. Vrednosti parametrov so odvisne od velikosti celice, njene oblike, orientacije, gostote celic ipd. in se tako od celice do celice razlikujejo (12).



Slika 4. Odstotek permeabiliziranih celic v odvisnosti od števila pulzov. Dolžina enega pulza je bila 1 ms, jakost električnega polja med posameznim pulzom pa 900 V/cm. Celice CHO so bile pulzom izpostavljene ob prisotnosti propidijevega jodida (20).



Slika 5. Odstotek permeabiliziranih celic v odvisnosti od trajanja pulza. Celice CHO so bile izpostavljene petim pulzom ob prisotnosti propidijevega jodida. Jakost električnega polja med posameznim pulzom je bila 900 V/cm (20).

Drugi dejavniki

Temperatura

Elektroporacija ne spremeni temperature celic oziroma tkiva. Zaradi električnega polja, ki je prisotno le v kratkih časovnih intervalih, se temperatura visokopredvodnih medijev dvigne približno za 1°C, temperatura nizkopredvodnih medijev pa še manj. Elektroporacija torej ni termalni pojav (19).

Vnos snovi v celico je boljši, če so celice pred aplikacijo električnega polja pri temperaturi mešanice vode in ledu (4°C) (6). Na preživetje celic ta sprememba temperature praktično ne vpliva. Po aplikaciji električnih pulzov je najprimernejša inkubacijska temperatura 37°C, kar poveča učinkovitost poracije, preživetje pa je pri tej temperaturi največje (21).

Prevodnost medija

Vpliv električnega polja na površino membrane posredujejo ioni v okoliški tekočini z medploskovno polarizacijo. Za uspešno permeabilizacijo potrebujemo končno koncentracijo ionov v okoliškem mediju (8). V tipično nizkopredvodnih medijih se namreč izrazito zmanjša vsiljeni transmembranski potencial. Za permeabilizacijo je zato potrebno električno polje višjih jakosti oziroma dlje trajajoči pulzi (9). Višja je koncentracija prostih ionov v mediju, učinkovitejša bo poracija, saj je nagib krivulje odvisnosti števila permeabilizi-

ranih celic v populaciji od jakosti električnega polja bistveno bolj strm v visoko prevodnem kot v nizko prevodnem mediju (22).

Ozmotski tlak

Poskusi na celicah, ki rastejo v plasti pritrjene na dno posode, so pokazali, da ozmotski tlak močno vpliva na pragovno vrednost jakosti zunanega električnega polja, ki je bistveno večja pri višjem ozmotskem tlaku (23). Tudi plato elektropermeabilizacije dosežemo pri nižjem ozmotskem tlaku pri izrazito manjših vrednostih jakosti električnega polja kot pri višjem ozmotskem tlaku. Nižji je osmotski tlak, učinkovitejša je elektropermeabilizacija; saj je nagib krivulje odvisnosti števila permeabiliziranih celic v populaciji od jakosti električnega polja v tem primeru bistveno bolj strm. Učinkovitost permeabilizacije je odvisna samo od ozmotskega tlaka med aplikacijo električnih pulzov in ne od ozmotskega tlaka pred aplikaciji pulzov ali po njej. Na celice, ki jih poriramo v suspenziji, ima ozmotski tlak podoben vpliv, le pragovna vrednost jakosti zunanega električnega polja naj bi bila neodvisna od ozmotskega tlaka (23).

Popolnost celičnega skeleta

Če poškodujemo celični skelet, bodisi kemično ali s temperaturnim šokom, postanejo tako imenovane dolgotrajne spremembe v strukturi membrane nestabilne (24).

Poskusi na eritrocitih so pokazali, da enourna inkubacija celic pri temperaturi 50°C povzroči spremembe v konformaciji spektrina in s tem v spektrinsko-aktinskem kompleksu. Eritrociti so izgubili svojo značilno obliko, postali so okrogli. Posledica temperaturnega šoka je bil dvig praga električne poljske jakosti za elektroporacijo in nastanek le kratko trajajočih strukturnih sprememb v celični membrani, saj po zaključku aplikacije električnih pulzov ni bilo več mogoče zaznati sprememb v celični notranjosti (24).

Tudi snovi, ki poškodujejo mrežo spektrina in aktina, imajo na elektroporacijo podoben učinek; dolgo trajajoče strukturne spremembe izginejo prej kot v minuti (24).

Področja uporabe elektroporacije

Membrana je neprepustna za določeno molekulo, če le-ta sama ne more skozi membrano, in je izključena iz vseh membranskih transportov. Permeabilizacija, povzročena z električnim poljem, ima nekaj prednosti pred drugimi biokemičnimi metodami:

- lahko jo uporabimo na vsaki celici,
- ne prizadene celičnega preživetja,
- je specifična za plazmalemo in ne prizadene membran celičnih organelov,
- povzroči le minimalne motnje membranskih funkcij.

Opisane lastnosti so vzrok njeni široki uporabnosti. Z elektropermeabilizacijo vnašamo v celice gene in zdravila. V celično membrano vstavljamo beljakovine. Z njeno pomočjo preučujemo aktivnosti encimov *in vivo* ter vnašamo v celice specifične inhibitorje znotrajcelične encimske aktivnosti. Preučujemo celično signalizacijo preko nadzora koncentracije ionov v citosolu (25, 26). Raziskujemo, na kakšen način virusi okužijo rastline. S pomočjo električnih

pulzov vnašamo v telo zdravila preko kože in *ex vivo* antibiotike v krvne celice. Celične strukture označujemo s specifičnimi označevalci, ki sicer ne morejo v celico.

Poglejmo si nekatera naštetá področja podrobneje.

Molekularna genetika

Kadar za vnos genskega materiala v celico uporabljamo postopek z visokonapetostnimi električnimi pulzi, govorimo o elektrotransfekciji (27). Prvič je to metodo uporabil Neumann leta 1982 na mišjih fibroblastih (28). Danes metodo široko uporabljamo v molekularni biologiji in genetiki, saj z njo lahko vnesemo DNA v vsako prokariontsko in evkariontsko celico. Postopek je enostaven, ponovljiv in zelo učinkovit. V primerjavi z drugimi tehnikami, ki so danes v uporabi za vnašanje genskega materiala v žive celice, elektrotransfekcija povzroči najmanj sprememb na ciljni celici in najmanj mutacij na genskem materialu. Z elektroporacijo lahko vnesemo v celico izredno velike molekule DNA, tudi desetkrat večje kot z drugimi metodami (29).

Visoko učinkovitost metode dosežemo s pravilno izbiro dejavnikov, ki vplivajo na vnos DNA. DNA mora biti prisotna v mediju že pred nastopom električnega pulza. Amplitudo in trajanje pulza moramo prilagoditi vrsti celic. Sprva so uporabljali eksponentno upadajoče pulze, ki jih generiramo na osnovi praznjenja kondenzatorja (30). Kasneje so začeli uporabljati pravokotne impulze, ki pa jih je težje in dražje generirati (5). Najuspešnejši vnos DNA v celico dobimo s kombinacijo dveh pravokotnih pulzov (31). Prvi pulz je kratek in ima visoko amplitudo. Povzroči poracijo celice, vendar zaradi kratkega trajanja le redko pride do vnosa DNA. Drugi pulz, ki prvemu lahko sledi po nekajsekundnem premoru, pa je dolg, a ima nizko amplitudo. Ta pulz omogoči molekulam DNA vstop v celico. Količina molekul DNA v celici je sorazmerna naboju drugega pulza. Na ta način lahko količino molekul DNA v celici povečamo za cel velikostni red. Vnos DNA v celico naj bi torej potekal v treh korakih (31, 32) (slika 5):

- DNA se usmeri v električnem polju,
- kationi spodbujajo pritrditev DNA na membrano – pride do nekakšnega medsebojnega mehničnega vpliva med DNA in poro,
- elektroforeza DNA v celico.

Zaenkrat menimo, da DNA vstopi v celico z elektroforezo. Zmanjšanje elektroforetične mobilnosti DNA, bodisi s povečanjem viskoznosti medija bodisi z zmanjšanjem naboja DNA, namreč povzroči manjši vnos DNA v celico (27).

Gene lahko zelo učinkovito vnesemo v celico tudi z izjemno kratkimi pulzi električnega polja, ki si sledijo zelo hitro; s frekvencami, ki jih uporabljamo pri prenašanju radijskih valov (17).

Elektrogeno zdravljenje

Z genskim zdravljenjem mutirani gen, ki določa neko bolezensko stanje, zamenjamo z normalnim. Da bi ta cilj dosegli, potrebujemo:

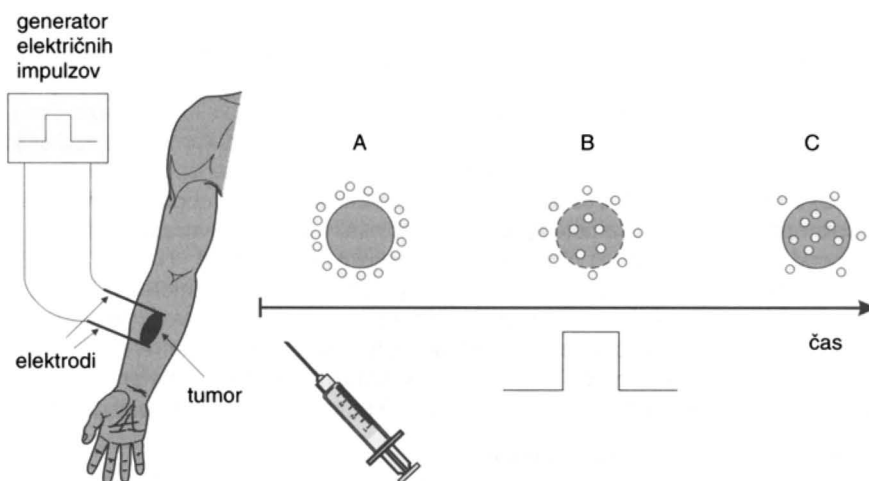
- gen, ki bo, če ga vstavimo v celico v relativno majhnih količinah, postal funkcionalen in bo tako povzročil izboljšanje zdravja;
- način, kako klonirani gen vstaviti v celico, ne da bi jo pri tem poškodovali.

Danes poznamo kar nekaj genov, ki so za gensko zdravljenje primerni. Načinov, s katerimi vstavljamo gene v celico, je več. Najpogosteje so kot vektorji uporabljeni retrovirusi. Vnos genov z retrovirusi je bistveno uspešnejša metoda kot elektroporacija (29). Vendar imajo retrovirusi pomanjkljivost: retrovirus, ki pride v celico, se naključno vključi v genom in zato lahko povzroči nezaželeno mutacijo. Pri elektroporaciji pa se elektroporirani geni rekombinirajo z njihovimi homolognimi gostiteljskimi geni. Celica ima novo obliko gena prav na mestu mutiranega gena, zato je metoda zelo zanesljiva. Še ena prednost elektroporacije obstaja: omogoča lokalno gensko zdravljenje. S kombinacijo lokalno apliciranih pulzov visoke napetosti in vnosa genov v arterijo lahko gene vstavimo le v celice želenih organov in tkiv *in vivo* (33).

Elektrokemoterapija

Nekaj let za prvim uspešnim vnosom genskega materiala v celico s elektroporacijo se je rodila ideja, da bi na enak način v celico vnesli zdravila, ki sicer v celico le težko prodrejo ali pa vanjo sploh ne morejo. Ta problem je najbolj pogost pri zdravljenju rakavih obolenj s kemoterapijo. Nekatera citotoksična zdravila namreč le težko vstopijo v celico, kar pomeni, da potrebujemo visoko koncentracijo učinkovine v bližini celice. Visoke koncentracije v telesu pa povzročajo močne stranske učinke, ki so seveda nezaželeni. Vnos zdravil v celice z elektroporacijo so poimenovali elektrokemoterapija (slika 6).

Začetnika te nove veje sta Okino in Mohri (34), ki sta delala poskuse na podganah z umetno induciranimi tumorji. Uporabila sta le en električni pulz (10 kV), generiran z razelektrovitvijo kondenzatorja, in bleomicin, ki sta ga 30 minut prej vbrizgala v mišico v bližini



Slika 6. Elektrokemoterapija tumorja. A – molekule v veno vbrizganega zdravila obkrožijo tumorske celice. B – pulz visoke napetosti povzroči nastanek por v celični membrani. Molekule zdravila vstopijo v celično notranjost. C – pore se zaprejo. Molekule zdravila uničijo tumorske celice.

tumorja. Tumorji, ki so bili zdravljeni z elektrokemoterapijo, so se po nekaj dneh bistveno zmanjšali, tumorji, zdravljeni samo s kemoterapijo ali elektroterapijo, pa ne (35). Sočasno in neodvisno so tudi Belehradek Jr., Mir in Orlowski v Franciji naredili vrsto poskusov na celičnih kulturah in na živalih (miši). Ugotovili so, da se citotoksičnost zdravil, ki slabo prehajajo skozi celično membrano, z elektroporacijo bistveno poveča. Citotoksičnost netropsina se na primer poveča dvestokrat, citotoksičnost bleomicina pa kar sedemstokrat (15, 36). Bistveno manjši vpliv ima elektroporacija na zdravila, ki že sama po sebi hitro difundirajo skozi membrano (hipofilna zdravila, npr. aktinomycin D). Toksičnost teh zdravil se zaradi prisotnosti električnega polja poveča le tri- do petkrat (36). S poskusi na imunsko kompetentnih in imunsko zavrtih miših so ugotovili, da elektrokemoterapija spodbudi delovanje imunskega sistema; končni uspeh elektrokemoterapije na imunsko zavrtih miših je bil namreč bistveno slabši (37–40). Da z elektrokemoterapijo na neki način vzbudimo sistemsko protitumorsko imunost, so potrdili tudi poskusi s celicami, ki izločajo interleukin-2 (IL-2) (41). Po elektrokemoterapiji so miškam vbrizgali gensko spremenjene histokompatibilne celice, ki izločajo IL-2. To je povzročilo popolno ozdravitev vseh z elektrokemoterapijo zdravljenih tumorjev in tudi netretiranih tumorjev, ki so bili inducirani na kontralateralni strani živali. Še več, zdravljenje je preprečilo nastanek novih tumorjev, kar so pokazali z vbrizganjem enakih tumorskih celic živalim, ki so jih ozdravili z elektrokemoterapijo.

Elektrokemoterapija je že bila uspešno uporabljena tudi v klinični praksi. Posebno primerna je za zdravljenje tumorjev vratu in glave (42–48).

Z elektrokemoterapijo se ukvarjamo tudi v Sloveniji (Oddelek za tumorsko biologijo na Onkološkem inštitutu in Laboratorij za biokibernetiko na Fakulteti za elektrotehniko). Rezultati naših poskusov *in vitro* in *in vivo* so podprli rezultate drugih raziskovalnih skupin in tako smo tudi mi pripomogli k uveljavitvi elektrokemoterapije (49). Še posebno, ker smo pokazali, da je elektrokemoterapija zelo uspešna tudi s *cis*-diamindikloroplatinom II (CDDP) in ne samo z bleomicinom, kot je bilo znano prej (47, 50). Posvetili smo se iskanju optimalnega tipa in položaja elektrod, s katerimi apliciramo električne pulze. Predlagali smo tretiranje tumorja z več strani, s spremembo orientacije elektrod med aplikacijo električnih pulzov (51). Eksperimentalne rezultate podpiramo z numeričnimi izračuni električnih polj v tumorjih (52, 53), s čimer želimo prispevati k jasnejši sliki dogajanja med elektrokemoterapijo (54). Elektrokemoterapijo smo kombinirali s sočasnim vnosom tumorskega nekroznega dejavnika (TNF- α) (55). Rezultati poskusov so pokazali, da je na ta način uporabljena koncentracija zdravila lahko nižja kot pri običajni elektrokemoterapiji. Na Onkološkem inštitutu smo elektrokemoterapijo uporabili tudi v klinični praksi. Pri dveh bolnikih (maligni melanom) smo uporabili elektrokemoterapijo z bleomicinom (46), pri štirih (maligni melanom, bazalni celični karcinom in skvamozni karcinom) pa elektrokemoterapijo s CDDP (47). S slednjo smo dosegli popolno regresijo vseh zdravljenih tumorjev.

Vstavljanje beljakovin v celično membrano

Z visokonapetostnimi pulzi je mogoče v celično membrano vstavljati beljakovine. Jakost električnega polja, v katerem so celice, mora biti ravno pod pragovno, ki je potrebna za permeabilizacijo (56, 57).

Že pred odkritjem vstavljanja beljakovin v celično membrano z visokonapetostnimi pulzi so stekli poskusi v želji, da bi aids pozdravili z glikoproteinom CD4. CD4 je receptor za HIV, ki ga najdemo na površini limfocita T4. Ko se HIV pritrdi na CD4, HIV vstopi v limfocit T4 in se tam podvaja. Število HIV v krvnem obtoku se poveča, število limfocitov T4 pa zmanjša. Zdelo se je, da bi že dodatek prostega CD4 v krvi lahko pozdravil aids. Toda v krvnem obtoku je prosti glikoprotein CD4 zelo neobstoje, HIV pa ima veliko večjo afiniteto vezave s CD4, ki je vgrajen v membrano limfocitov T4, kakor pa vezave s prostim CD4. Zato bi bil terapevtski odmerek CD4, s katerim bi onemogočili vezavo HIV na limfocite T4, mnogo prevelik. Z visokonapetostnimi pulzi pa so glikoprotein CD4 vstavili v membrano eritrocitov (58). Obstojnost CD4 se je bistveno zvečala, afiniteta po vezavi s HIV pa je primerljiva s tisto pri limfocitih T4. Tako eritrociti vsrkajo viruse HIV, ki so prisotni v krvnem obtoku, in jih odstranijo.

Vnašanje antibiotikov v krvne celice

Za vnos antibiotikov v levkocite ni treba izolirati posameznih celic, temveč lahko celotno kri izpostavimo električnim pulzom. Metoda je namreč velikostno selektivna, saj večje celice postanejo prepustne pri nižji električni poljski jakosti kot manjše. V literaturi zasledimo podatek, da so uspeli permeabilizirati 70 % levkocitov, eritrociti pa so ostali nepermeabilizirani (59). Na ta način lahko tretiramo velike količine krvnih celic. Tako dobimo imunokompatibilne nosilce zdravil po telesu. Najprej so stekli poskusi na eritrocitih (5), ki naj bi služili kot intravenozna skladišča zdravila. Pomembno je, da ti nosilci prinesejo zdravilo na mesto vnetja, zato so nevtrofilce – celice, ki izvajajo fagocitozo – izločili iz krvi in vanje z elektroporacijo vnesli ustrezno zdravilo (60). S poskusi na podganah so pokazali, da se tako nepulzirani kot tudi pulzirani nevtrofilci naberejo na področju vnetja v desetkrat višji koncentraciji kot na kontrolnih področjih in ohranijo svoje fagocitotične lastnosti. Posebno primeren se ta postopek zdi za zdravljenje v primerih, ko so obolenja težko dostopna, npr. v jetrih in pri okužbah v kosteh.

Vnos zdravil prek kože

Vnos zdravil prek kože je alternativa konvencionalnim načinom (oralni, z injekcijo). Toda koža sesalcev predstavlja po zaslugi odmrle plasti – *stratum corneum* – nepremagljivo oviro vrsti snovi. Zato lahko preko kože vnesemo le peščico zdravil z majhnimi, večinoma lipofilnimi molekulami, zdravila z nabitimi polarnimi molekulami pa morajo v telo na konvencionalen način. Znanstveniki iščejo metode, ki bi povečale prehodnost takih zdravil. Kemijskim metodam sta se pridružili iontoforeza in elektroporacija. Pri iontoforezi kot gonilno silo za vnašanje nabitih in polarnih molekul uporabljamo enosmeren električni tok razmeroma nizkih jakosti. Iontoforesa je torej metoda, ki v svoji osnovi deluje na molekule zdravila. Električni pulzi, ki jih uporabljamo pri elektroporaciji, pa povzročijo začasne strukturne spremembe v koži (*stratum corneum*). Za razliko od iontoforeze pri elektroporaciji električno polje ne deluje na molekule zdravila, temveč na pot, po kateri te molekule pridejo v telo. Opazili so, da se tok polarnih molekul z naboji med -1 in -4 in molekularnimi težami malo več kot 1000 ob prisotnosti električnega polja poveča kar za štiri velikostne razrede (13). Podoben tok so opazili tudi na živalski koži *in vivo* (61). Količina zdravila, ki se kot posledica elektroporacije prenese prek kože, je linearno sorazmerna napetosti in trajanju uporabljenih pulzov električnega polja (61).

Sklep

Elektroporacija je v zadnjih letih dobila svoje mesto med standardnimi laboratorijskimi tehnikami, s katerimi vnašamo v celice predvsem eksogene molekule. Enostavno ravnanje in dobri rezultati so prepričali mnoge uporabnike. Tudi izsledki različnih kliničnih aplikacij so zelo obetajoči. Ne trdimo, da bo elektroporacija igrala ključno vlogo pri zdravljenju bolezni v prihodnosti, vsekakor pa si zasluži precejšnjo pozornost.

Zahvala

Raziskave je omogočilo Ministrstvo za znanost in tehnologijo Republike Slovenije.

Literatura

1. Neumann E, Sowers AE, Jordan CA. *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. New York: Plenum Press, 1989: 1–105.
2. Sale AJH, Hamilton WA. Effects of high electric fields on microorganisms I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochim Biophys Acta* 1967; 148: 781–8.
3. Hamilton WA, Sale AJH. Effects of high electric fields on microorganisms II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochim Biophys Acta* 1967; 148: 789–800.
4. Sale AJH, Hamilton WA. Effects of high electric fields on microorganisms III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochim Biophys Acta* 1968; 163: 37–43.
5. Kinosita KJ, Tsong TY. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. *Nature* 1977; 268: 438–41.
6. Zimmermann U, Vienken J, Pilwat G. Development of drug carrier systems: electrical field induced effects in cell membranes. *Bioelectrochem Bioenerg* 1980; 7: 553–74.
7. Weaver JC, Chizmadzhev YA. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochem Bioenerg* 1996; 41: 135–60.
8. Neumann E. Membrane electroporation and direct gene transfer. *Bioelectrochem Bioenerg* 1992; 28: 247–67.
9. Kotnik T, Bobanović F, Miklavčič D. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields – a theoretical analysis. *Bioelectrochem Bioenerg* 1997; 43: 285–91.
10. Orłowski S, Mir L. Cell electroporation: a new tool for biochemical and pharmacological studies. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1154: 51–63.
11. Teissie J, Rols MP. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation. *Biophys J* 1993; 65: 409–13.
12. Gift EA, Weaver JC. Observation of extremely heterogeneous electroporative molecular uptake by *Saccharomyces cerevisiae* which changes with electric field pulse amplitude. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1234: 52–62.
13. Prausnitz MR, Bose VG, Langer R, Weaver JC. Electroporation of mammalian skin: A mechanism to enhance transdermal drug delivery. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993; 90: 10504–8.
14. Dimitrov DS, Sowers AE. Membrane electroporation – fast molecular exchange by electroosmosis. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1022: 381–92.
15. Mir LM, Banoun H, Paoletti C. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: direct access to the cytosol. *Exp Cell Res* 1988; 175: 15–25.
16. Bartoletti DC, Harrison GI, Weaver JC. The number of molecules taken up by electroporated cells: quantitative determination. *FEBS Lett* 1989; 256: 4–10.
17. Chang DC, Chassy BM, Saunders JA, Sowers AE. *Guide to Electroporation and Electrofusion*. New York: Academic Press, 1992: 1–411.

18. Escande - Geraud ML, Rols MP, Dupont MA, Gas N, Teissie J. Reversible plasma membrane ultrastructural changes correlated with electroporabilization in Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* 1988; 939: 247–59.
19. Weaver JC. Electroporation: A general phenomenon for manipulating cells and tissues. *J Cell Biochem* 1993; 51: 426–35.
20. Wolf H, Rols MP, Boldt E, Neumann E, Teissie J. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys J* 1994; 66: 524–31.
21. Rols MP, Delteil C, Serin G, Teissie J. Temperature effects on electrotransfection of mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 1994; 22: 540.
22. Rols MP, Teissie J. Ionic-strength modulation of electrically induced permeabilization and associated fusion of mammalian cells. *Eur J Biochem* 1989; 179: 109–15.
23. Rols MP, Teissie J. Modulation of electrically induced permeabilization and fusion of Chinese hamster ovary cells by osmotic pressure. *Biochemistry* 1990; 29: 4561–7.
24. Rols MP, Teissie J. Experimental evidence for the involvement of the cytoskeleton in mammalian cell electroporabilization. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1111: 45–50.
25. Ozil JP, Swann K. Stimulation of repetitive calcium transients in mouse eggs. *J Phys* 1995; 483: 331–46.
26. Bobanović F. *Vpliv električnih polj na fiziološke parametre aktivacije živčnih celic*. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, 1996: 66–97.
27. Klenchin VA, Sukharev SI, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev YA. Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys J* 1991; 60: 804–11.
28. Neumann E, Schaefer - Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1982; 1: 841–5.
29. Potter H. Application of Electroporation in Recombinant DNA Technology. *Method Enzymol* 1993; 217: 461–83.
30. Neumann E, Rosenheck K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J Membrane Biol* 1972; 10: 279–90.
31. Sukharev SI, Klenchin VA, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev YA. Electroporation and electroporetic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J* 1992; 63: 1320–7.
32. Tsong TY, Xie TD. Mechanisms of cell transfection by electroporation: field induced DNA uptake and transfection efficiency. *IEEE* 1992; 2: 307–8.
33. Nishi T, Yoshizato K, Yamashiro S et al. High-efficiency *in vivo* gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following *in vivo* electroporation. *Cancer Res* 1996; 56: 1050–5.
34. Okino M, Mohri H. Effects of high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on *in vivo* growing tumors. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78: 1319–21.
35. Okino M, Esato K. The effects of a single high voltage electrical stimulation with an anticancer drug on *in vivo* growing malignant tumors. *Jpn J Surg* 1990; 20: 197–204.
36. Orłowski S, Belehradek J Jr, Paoletti C, Mir LM. Transient electroporabilization of cells in culture: increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 4727–33.
37. Mir LM, Orłowski S, Belehradek J Jr, Paoletti C. Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 1991; 27: 68–72.
38. Mir LM, Orłowski S, Poddevin B, Belehradek J Jr. Electrochemotherapy tumor treatment is improved by interleukin-2 stimulation of the host's defenses. *Eur. Cytokine Netw.* 1992; 3: 331–4.
39. Serša G, Miklavčič D, Čemažar M, Belehradek J Jr, Jarm T, Mir LM. Electrochemotherapy with CDDP on LPB sarcoma: comparison of the anti-tumor effectiveness in immunocompetent and immunodeficient mice. *Bioelectrochem Bioener* 1997; 43: 279–83.
40. Serša G, Kotnik V, Čemažar M, Miklavčič D, Kotnik A. Electrochemotherapy with bleomycin in SA-1 tumor-bearing mice—natural resistance and immune responsiveness. *Anti-Cancer Drug* 1996; 7: 785–91.
41. Mir LM, Roth C, Orłowski S, et al. Systemic antitumor effects of electrochemotherapy combined with histoincompatible cells secreting interleukin-2. *J Immunother* 1995; 17: 30–8.
42. Mir LM, Belehradek M, Domenge C, et al. L'electrochimiotherapie, un nouveau traitement antitumoral: premier essai clinique. *C R Acad Sci Paris* 1991; 313: 613–8.

43. Belchradek M, Domenge C, Luboinski B, Orłowski S, Belchradek J Jr, Mir LM. Electrochemotherapy, a New Antitumor Treatment. *Cancer* 1993; 72: 3694–700.
44. Domenge C, Orłowski S, Luboinski B, et al. Antitumor Electrochemotherapy New Advances in the Clinical Protocol. *Cancer* 1996; 77: 956–63.
45. Heller R, Jaroszeski MJ, Glass LF, et al. Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. *Cancer* 1996; 77: 964–71.
46. Rudolf Z, Štabuc B, Čemažar M, Miklavčič D, Vodovnik L, Serša G. Electrochemotherapy with bleomycin: the first clinical experience in malignant melanoma patients. *Radiol Oncol* 1995; 29: 229–35.
47. Serša G, Štabuc B, Čemažar M, Jančar B, Miklavčič D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: potentiation of local cisplatin antitumor effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1213–18.
48. Mir LM, Glass LF, Serša G, et al. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumors by electrochemotherapy. *B J Cancer* 1998; 77: 2336–42.
49. Serša G, Čemažar M, Miklavčič D, Mir LM. Electrochemotherapy: variable anti-tumor effect on different tumor models. *Bioelectroch Bioener* 1994; 35: 23–27.
50. Serša G, Čemažar M, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with *cis*-Diamminedichloroplatinum (II) in mice. *Cancer Res* 1995; 55: 3450–5.
51. Čemažar M, Miklavčič D, Vodovnik L, et al. Improved therapeutic effect of electrochemotherapy with cisplatin by intratumoral drug administration and changing of electrode orientation for electropermeabilization on EAT tumor model in mice. *Radiol Oncol* 1995; 29: 121–7.
52. Serša G, Čemažar M, Šemrov D, Miklavčič D. Changing electrode orientation improves the efficacy of electrochemotherapy of solid tumors in mice. *Bioelectroch Bioener* 1996; 39: 61–6.
53. Šemrov D, Miklavčič D. Calculation of the electrical parameters in electrochemotherapy of solid tumours in mice. *Comput Biol Med* 1998; 28: 439–48.
54. Serša I, Beravs K, Dodd NJF, Zhao S, Miklavčič D, Demšar F. Electric current density imaging of mice tumours. *Magnet Reson Med* 1997; 37: 404–9.
55. Serša G, Čemažar M, Menart V, Gaberc - Porekar V, Miklavčič D. Anti-tumor effectiveness of electrochemotherapy with bleomycin is increased by TNF- α on SA-1 tumors in mice. *Cancer Lett* 1997; 116: 85–92.
56. Mouneimne Y, Tosi PF, Gazitt Y, Nicolau C. Electro-insertion of xeno-glycophorin into the red blood cell membrane. *Biochem Biophys Res Co* 1989; 159: 34–40.
57. Lynch PT, Davey MR. *Electrical manipulation of cells*. New York: Chapman & Hall, 1996: 185–200.
58. Zeira M, Tosi PF, Mouneimne Y, et al. Full-length CD4 electroinserted in the erythrocyte membrane as a long-lived inhibitor of infection by human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4409–13.
59. Sixou S, Teissie J. Specific electropermeabilization of leucocytes in a blood sample and application to large volumes of cells. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1028: 154–60.
60. Sixou S, Teissie J. In vitro targeting of inflamed areas by electroloaded neutrophils. *Biochem Biophys Res Co* 1992; 186: 860–6.
61. Vanbever R, Lecouturier N, Preat V. Transdermal Delivery of Metoprolol by Electroporation. *Pharmaceut Res* 1994; 11: 1657–62.