

Tadej Kotnik¹, Alenka Maček Lebar², Maša Kandušer³, Gorazd Pucihar⁴,
Mojca Pavlin⁵, Blaž Valič⁶, Damijan Miklavčič⁷

Elektroporacija celične membrane: teorija ter poizkusi *in vitro*

*Electroporation of the Cell Membrane:
Theory and Experiments in vitro*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: elektroporacija, membranski potenciali, električna kapacitivnost, celična membrana prepustnost

Elektroporacija je pojav, pri katerem pride zaradi kratkotrajne izpostavitve celice električnemu polju dovolj visoke jakosti do izrazitega povečanja prepustnosti membrane. Reverzibilna elektroporacija se pogosto uporablja za vnos snovi v celice v raziskavah, vse bolj pa se uveljavlja tudi v kliničnem okolju (elektrokemoterapija tumorjev). Najbolj uveljavljena razlaga elektroporacije pravi, da pride zaradi povišanja membranske napetosti, ki nastopi ob izpostavitvi polju, do nastanka nanometerskih hidrofilnih por v lipidnem dvosloju. To razlago podpirajo tudi najnovejše simulacije molekularne dinamike lipidov v dvosloju. Elektroporacije ni mogoče opazovati neposredno, saj so pore premajhne, lahko pa jo preučujemo z merjenjem električnih in optičnih lastnosti membrane ali z opazovanjem pretoka ionov in molekul skozi njo. Delež elektroporiranih celic in vnos snovi naraščata z višanjem jakosti, trajanja in števila pulzov, vendar s tem narašča tudi delež celic, ki izpostavitve ne preživijo. Vrednosti parametrov pulzov, pri katerih dobimo najboljše rezultate, je potrebno določiti eksperimentalno v tistih pogojih, v kakršnih nameravamo izvajati poizkuse

ABSTRACT:

KEY WORDS: electroporation, membrane potentials, electric capacitance, cell membrane permeability

Electroporation is a phenomenon during which exposure of a cell to an electric field results in a significant increase in its membrane permeability. Reversible electroporation is widely used for internalisation of various substances in research, and is also becoming important in clinics (tumor electrochemotherapy). Electroporation is explained as formation of

¹ Doc. dr. Tadej Kotnik, univ. dipl. inž. el., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biokibernetiko, Tržaška 25, 1111 Ljubljana.

² Doc. dr. Alenka Maček Lebar, univ. dipl. inž. el., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biokibernetiko, Tržaška 25, 1111 Ljubljana.

³ Dr. Maša Kandušer, univ. dipl. biol., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biokibernetiko, Tržaška 25, 1111 Ljubljana.

⁴ Mag. Gorazd Pucihar, univ. dipl. inž. el., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biokibernetiko, Tržaška 25, 1111 Ljubljana.

⁵ Dr. Mojca Pavlin, univ. dipl. fiz., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biokibernetiko, Tržaška 25, 1111 Ljubljana.

⁶ Mag. Blaž Valič, univ. dipl. inž. el., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biokibernetiko, Tržaška 25, 1111 Ljubljana.

⁷ Prof. dr. Damijan Miklavčič, univ. dipl. inž. el., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biokibernetiko, Tržaška 25, 1111 Ljubljana.

nanometer-sized aqueous pores in the lipid bilayer due to increased membrane voltage caused by an electric field. This explanation is also supported by molecular dynamics simulations of the lipid bilayer. The pores are too small for electroporation to be observable directly, but it can be studied by measuring the electrical and optical properties of the membrane, or by monitoring the flux of ions or molecules through the membrane. The fraction of electroporated cells and the uptake increase with the increase in the strength, duration and/or number of pulses, but so does the fraction of cells that lose viability. For optimal results under specific experimental conditions, the values of pulse parameters must be determined under these same conditions.

UVOD

Celična membrana prepušča le tiste molekule, za katere obstajajo specifični mehanizmi transporta. Posamezne vrste ionov in manjših molekul vstopajo v celico skozi proteinske kanale in črpalke, ki so vgrajeni v membrano, določene večje molekule pa z vezavo na endocitotske receptorje v membrani in posledično tvorbo endocitotskih veziklov. Molekule, za katere specifičen mehanizem transporta ne obstaja, v fizioloških razmerah praktično ne morejo skozi membrano. Težaven prehod skozi membrano omeji uporabnost mnogih zdravil, katerih delovanje v notranjosti celice je sicer zelo učinkovito.

Ena od uspešnejših metod umetnega povečanja prepustnosti membrane je kratkotrajna izpostavitve celice dovolj močnemu električnemu polju. Takšna izpostavitve privede do izrazitega povečanja prepustnosti membrane, ki mu pravimo elektropermeabilizacija oziroma elektroporacija. Strogo gledano pojma nista sopomenki, saj se prvi nanaša na povečanje prepustnosti nasploh, drugi pa privzema, da je to povečanje posledica nastanka hidrofilnih por v membrani. Slednja razlaga se je v zadnjih dveh desetletjih uveljavila zaradi svoje teoretične podprtosti, njej v prid pa govorijo tudi najnovije simulacije molekularne dinamike lipidnih dvoslojev. Tako danes večina avtorjev – v nadaljevanju članka tudi mi – uporabljamo le še besedo elektroporacija. O elektropermeabilizaciji beremo vse redkeje, nekaj krivde za to pa gre verjetno tudi okornosti pojma.

Če električno polje ni premočno in ne traja več kot nekaj milisekund, se po koncu izpostavitve prepustnost membrane postopoma zniža na začetno raven, celice pa ohranijo svoje fiziološko delovanje; pravimo, da je

bila elektroporacija reverzibilna. Povišanje prepustnosti nastopi že v nekaj mikrosekundah, okrevanje pa je mnogo počasnejše in se popolnoma zaključuje šele po več sekundah ali celo minutah.

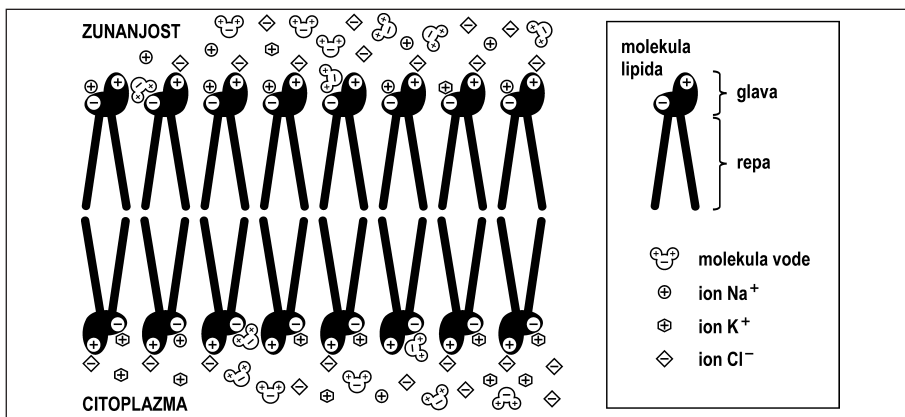
V času povišane prepustnosti membrane je mogoč vnos najrazličnejših učinkovin v celico. Manjše molekule, ki jih sicer v celici ni, vstopajo vanjo z difuzijo, k pretoku ionov in električno nabitih molekul, predvsem večjih (npr. DNA in proteinov), pa v času delovanja električnega polja pomembno prispeva tudi vlečna (elektroforetska) sila, ki jo ustvarja električno polje. Uporaba elektroporacije za vnos snovi v celico sega danes od temeljnih raziskav v biokemiji in molekularni biologiji, prek uporabnih raziskav v biotehnologiji in farmaciji, do predklinične in klinične uporabe v onkologiji in genski terapiji. Kombinacija elektroporacije in kemoterapevtikov (elektrokemoterapija) se je izkazala kot zelo uspešna metoda zdravljenja kožnih in podkožnih tumorjev in se že uveljavlja v kliničnem okolju (1–4). Uporaba elektroporacije za vnos DNA (elektrogenetska terapija) je še v predklinični fazi, rezultati pa so zelo vzpodbudni in obetajo ponovljivo in predvsem varnejšo alternativo genski transfekciji z virusnimi vektorji (5–8).

Namen pričujočega članka je seznaniti bralce s teoretično razlago elektroporacije in njeno uporabo v raziskovalnem okolju *in vitro*.

MIROVALNA IN VSILJENA NAPETOST NA CELIČNI MEMBRANI

Zgradba in električne lastnosti celične membrane

Z električnega vidika predstavlja celična membrana tanek izolacijski sloj, ki loči dve



Slika 1. Lipidni dvosloj in njegova okolica. Glave lipidov so polarne, zato se privlačijo med seboj, privlačijo pa tudi ione in molekule vode, ki so prav tako polarne. Repi lipidov so nepolarni, zato privlačijo repe ostalih lipidov, ione in molekule vode pa izrinejo iz notranjosti membrane.

električno prevodni področji – citoplazmo in zunajcelični prostor. Lipidi, ki so glavni gradniki membrane, se v njej organizirajo v dvosloj, v katerem so polarne glave lipidov obrnjene navzven, nepolarni repi pa navznoter (slika 1). Tudi proteini, ki se nahajajo v membrani, so zgrajeni iz polarnih in nepolarnih področij, v membrano pa se vgradijo tako, da so nepolarni deli v notranjosti membrane, torej v stiku z repi lipidov, polarni deli pa segajo navzven. Zaradi takšne zgradbe voda in v njej raztopljeni ioni obdajajo membrano, v njeno notranjost pa ne morejo oziroma so iz nje hitro izrinjeni.

Mirovalna membranska napetost

Na celični membrani je vseskozi prisotna električna napetost, ki je posledica majhnega primanjkljaja pozitivnih ionov v citoplazmi. Ta primanjkljaj ustvari in vzdržuje sistem črpalk $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ in trajno prepustnih kanalov K^+ . $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ črpalka v enem ciklu prečrpa tri ione Na^+ iz citoplazme v zunajcelični prostor in dva ione K^+ v nasprotni smeri. Z vsakim ciklom te črpalke tako narašča razlika med električnima potencialoma, hkrati pa tudi razlika med koncentracijama Na^+ in K^+ na zunanji in notranji strani membrane. Trajno prepustni K^+ kanali omogočijo ionom K^+ pretok skozi membrano v smeri padanja njihove koncentracije, torej navzven, vendar to še povečuje razliko med električnima potencialoma. Odtekanje ionov K^+ je zaradi tega vse počasnejše in se končno ustavi, s tem pa se vzpostavi rav-

notežno stanje. Napetosti, ki je takrat na membrani, pravimo mirovalna napetost, določa pa jo Goldmanova enačba (9)

$$U_{\text{mirovalna}} = \frac{R_T T}{F} \ln \frac{q [\text{Na}^+]_e + [\text{K}^+]_e}{q [\text{Na}^+]_i + [\text{K}^+]_i},$$

kjer je R_T plinska konstanta, T absolutna temperatura, F Faradayeva konstanta, q razmerje prepustnosti membrane za Na^+ in K^+ (tipično okoli 0,01), $[\text{Na}^+]_e$, $[\text{K}^+]_e$, $[\text{Na}^+]_i$ in $[\text{K}^+]_i$ pa so koncentracije Na^+ in K^+ v zunajceličnem prostoru in v citoplazmi.

Po uveljavljenem dogovoru merimo membransko napetost tako, kot če bi bila referenčna elektroda zunaj celice, merilna elektroda pa v citoplazmi. Zato ima mirovalna membranska napetost negativen predznak, po velikosti pa znaša med 40 in 90 milivoltov, odvisno od vrste celice in od faze celičnega cikla.

Pri vzdražljivih celicah, kot so nevroni in mišična vlakna, predstavlja mirovalna napetost izhodiščno točko za začetek vzdraženja celice (nastanek akcijskega potenciala). Obstaja vrsta hipotez, ki pravijo, da ima tudi pri nevzdražljivih celicah mirovalna napetost svojo vlogo, saj npr. poveča občutljivost kanalov v membrani na različne spremembe. Ne glede na veljavnost takšnih predpostavk pa lahko z gotovostjo trdimo, da celična membrana brez škodljivih posledic prenosa napetosti reda nekaj deset milivoltov. To so tudi največje vrednosti, ki se lahko na membrani pojavijo

v fizioloških razmerah, pred iznajdbo električnih naprav pa so bile lahko presežene bržkone le ob udaru nevihtne strele ali pa ob bližnjem srečanju z jeguljo ali skatom.

Vsiljena membranska napetost

Vsiljena membranska napetost nastane zaradi prerazporeditve ionov v električnem polju. Med trajanjem električnih pulzov se ta napetost prišteje mirovalni, po koncu pulzov pa na membrani ponovno ostane samo mirovalna napetost. Ustaljeno vrednost, ki jo vsiljena napetost na membrani okrogle celice doseže v nekaj mikrosekundah pv klopju enosmernega polja, opisuje Schwanova enačba (10)

$$U_{\text{vsiljena}} = \frac{3}{2} ER \cos \theta,$$

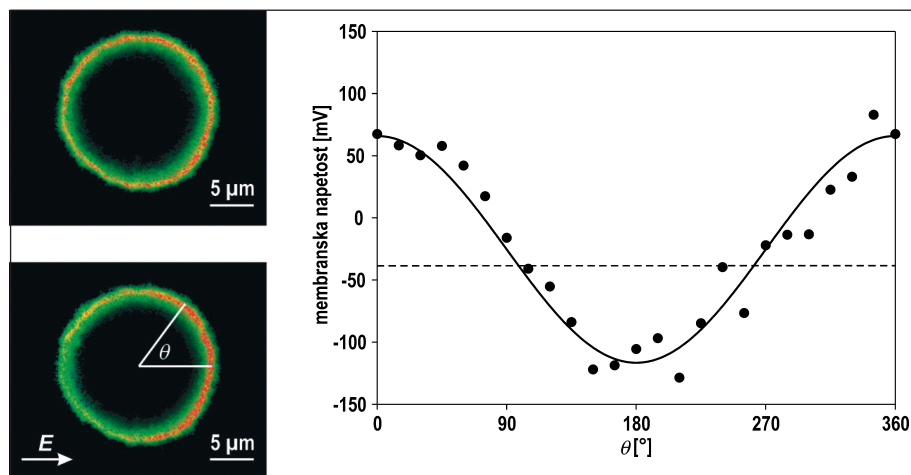
kjer je E jakost zunanega električnega polja, R polmer celice, θ pa kot med smerjo polja in daljico, ki poteka od središča celice do obravnavane točke na membrani. Vsiljena membranska napetost se tako za razliko od mirovalne, ki je povsod po membrani enaka, spreminja z lego, kot to določa kosinus v Schwanovi enačbi (slika 2).

Schwanova enačba pove tudi, da je vsiljena membranska napetost sorazmerna jakosti zunanega električnega polja. Tako lahko pri dovolj močnem polju celotna membranska napetost znatno preseže največje fiziološke vrednosti, na kakršne je membrana prilagojena. Če membranska napetost doseže nekaj sto milivoltov – natančna vrednost je odvisna od vrste celice in eksperimentalnih pogojev – pride do elektroporacije celične membrane.

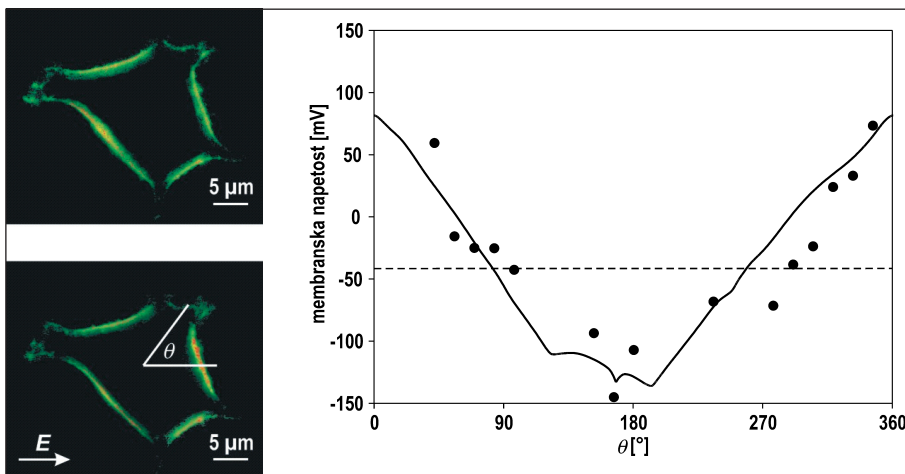
Če celica ni okrogla, velja Schwanova enačba zanjo le približno. Za nekatere pravilne geometrijske oblike, kot so sferoidi in elipsoidi, lahko izpeljemo natančne izraze, ki veljajo namesto Schwanove enačbe (11–13), pri bolj nepravilnih oblikah celic pa si pomagamo s približki (numeričnimi izračuni), ki jih dobimo z računalnikom. Slika 3 prikazuje podoben poizkus kot slika 2, le da je bil izveden na celici bolj zapletene oblike.

TEORETIČNA RAZLAGA ELEKTROPORACIJE

Obstaja več teoretičnih modelov, ki skušajo razložiti, kako izpostavitve električnim pulzom privede do povišane prepustnosti membrane. Med njimi so takšni, ki skušajo



Slika 2. Če celice obarvamo z enim od t. i. potenciometričnih barvil, lahko membransko napetost opazujemo s fluorescenčnim mikroskopom. Na zgornjih slikah je bilo uporabljeno barvilo di-8-ANEPPS, ki pri negativni membranski napetosti fluorescira šibko, z naraščanjem napetosti pa vse močnejše. Levo zgoraj je prikazana celica B16-F1 (mišji melanom) brez zunanega električnega polja (samo mirovalna napetost ~ -40 mV), levo spodaj pa ista celica pri izpostavitvi električnemu polju (na levi strani celice je napetost bolj, na desni pa manj negativna od mirovalne). Desno je še graf membranske napetosti v odvisnosti od kota θ za spodnjo sliko (krogci prikazujejo izmerjene vrednosti, krivulja pa kosinusni potek, ki ga podaja Schwanova enačba).

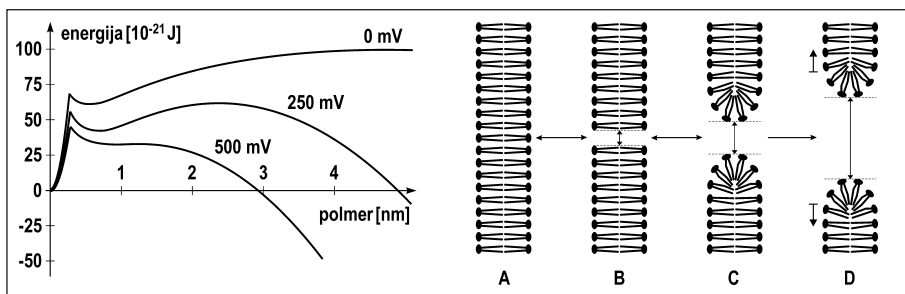


Slika 3. Membranska napetost pri celici B16-F1, pritrjeni na podlago. Ker celica ni okrogla, vsiljene napetosti na njeni membrani ne moremo določiti s Schwanovo enačbo, temveč si moramo pomagati z numeričnim izračunom na računalniku. Levo zgoraj je celica brez zunanega polja (samo mirovalna napetost), levo spodaj pri izpostavitvi električnemu polju, desno pa je graf membranske napetosti v odvisnosti od kota θ za spodnjo sliko (krogi so izmerjene vrednosti, krivulja pa potek, ki ga določimo z računalnikom).

pojav razložiti z elektrokompresijo membrane, z denaturacijo membranskih kanalov, pa tudi s tvorbo razpok med lipidnimi mikropodročji. Nobena od naštetih razlag, katerih podrobnejši pregled najdemo v članku Weaverja in Čizmadževa (14), ni našla podpore v eksperimentalnih rezultatih.

Kot smo že omenili v uvodu, je danes najbolj uveljavljen model, ki povišanje prepustnosti membrane pripisuje nastanku hidrofilnih por v membrani (15, 16). Ta model

napoveduje, da povišana membranska napetost zmanjšuje energijo, potrebno za nastanek hidrofilnih por, s tem pa povečuje verjetnost takšnega dogodka (slika 4). S tem razloži tudi postopnost in počasnost okrevanja, saj mora vsaka pora za svoje zaprtje spet preseči določen energijski prag. Model elektroporacije predvideva, da je premer hidrofilnih por velikostnega razreda enega nanometra, z naraščanjem membranske napetosti pa stabilnost pore hitro upada, dokler pri nadkritični napetosti



Slika 4. Energija membranske pore v odvisnosti od njenega polmera (levo) in skica elektroporacije na molekularnem nivoju (desno). Po zakonih termodinamike minimumi energije pore ustrezajo stabilnim stanjem. Prvi minimum je pri polmeru nič, ko pore ni, torej tedaj, ko membrana ni elektroporirana (desno, A). Koničast maksimum energije, ki sledi, predstavlja prag, pri katerem se pora preoblikuje iz hidrofobne (B) v hidrofilno obliko (C, D). Napetost na membrani ta prag zniža, kar poveča verjetnost nastanka hidrofilnih por. Če ta napetost ni previsoka, sledi še en minimum energije, v katerem se hidrofilna pora ustali (C), to pa omogoči tudi poznejše okrevanje (reverzibilna elektroporacija). Pri previsoki napetosti ta minimum izgine, pora ob raztezanju ne doseže več stabilnosti (D), okrevanje pa prav tako ni več mogoče (ireverzibilna elektroporacija).

reda nekaj sto mV ne pride do ireverzibilne porušitve, kar je prav tako v skladu z eksperimentalnimi ugotovitvami.

Predlaganih je bilo več razširitev in dopolnitev opisanega modela elektroporacije, ki upoštevajo še vlogo prevodnosti membrane (17, 18), ukrivljenosti membrane (19), osmotskega tlaka (20, 21) in koncentracij ionov v celici in njeni okolici (22).

V zadnjih letih je zmogljivost računalnikov presegla mejo, nad katero je že mogoče simulirati molekularno dinamiko lipidov, tj. njihovo gibanje v dvosloju, obdanem z vodo oziroma raztopino ionov. Takšne simulacije v splošnem potrjujejo, da membranska napetost, ki za velikostni razred presega mirovalno vrednost, poviša verjetnost oziroma pogostost nastanka por, pride pa tudi do spontanega oblikovanja hidrofilne notranjosti pore – zaradi vode in ionov v pori se lipidi v njej reorientirajo tako, da z glavami segajo v njeno notranjost (23–25).

Pore, ki nastajajo v simulacijah molekularne dinamike, so precej manj pravilnih oblik od tiste na sliki 4, a so vseeno dokaj stabilne in se ob ustreznem znižanju membranske napetosti postopoma zapirajo. To kaže, da je do razumevanja vseh podrobnosti elektroporacije sicer še daleč, a so raziskovalci verjetno na pravi poti.

EKSPERIMENTALNI REZULTATI

Kot prvi je o električni porušitvi celične membrane leta 1958 poročal Stämpfli (26). Približno desetletje kasneje sta Sale in Hamilton objavila serijo člankov, v katerih sta opisala netermično uničevanje mikroorganizmov s kratkimi električnimi pulzi visoke napetosti (27–29). Leta 1972 pa sta Neumann in Rosenheck (30) pokazala, da lahko električni pulzi povzročijo znatno, a reverzibilno povišanje prepustnosti membrane, ki ga lahko uporabimo za vnos snovi v celico. Njune ugotovitve predstavljajo mejnik v raziskovanju elektroporacije, saj so vzbudile zanimanje širšega kroga raziskovalcev, eksperimentalni podatki pa so se nato pričeli kopičiti hitreje in bolj sistematično. V nadaljevanju bomo pregledali različne metode raziskovanja elektroporacije in rezultate, dobljene z njimi.

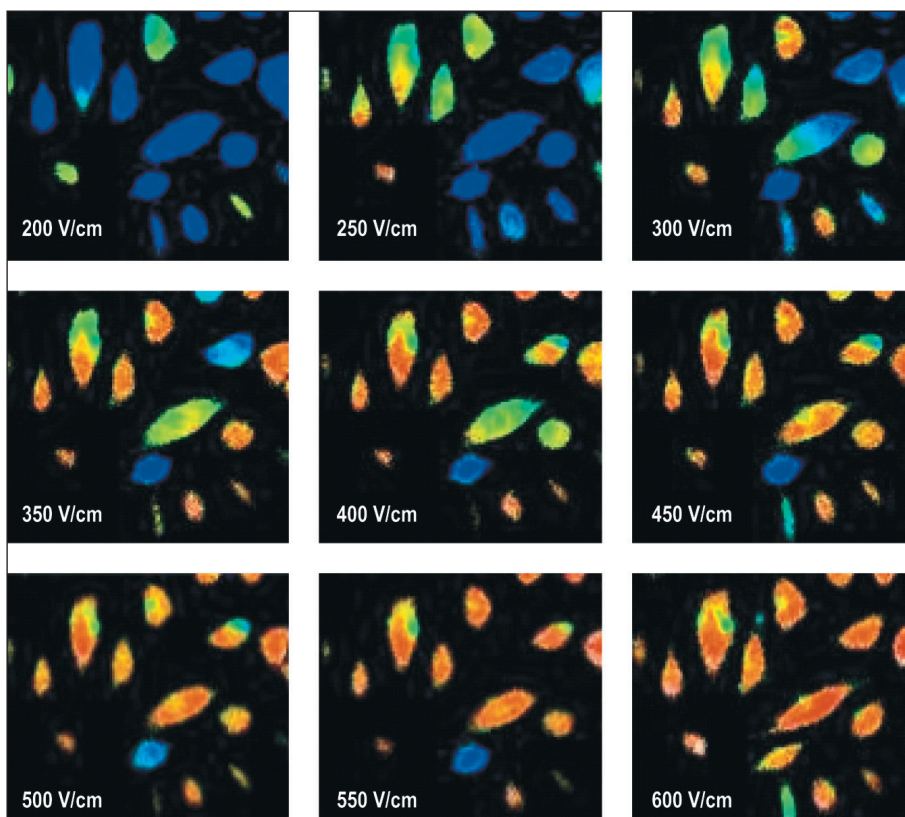
Prve sistematične raziskave elektroporacije so temeljile na meritvah električnih

lastnosti membrane med izpostavitvijo električnim pulzom. Te meritve so pokazale, da v primeru, ko napetost na membrani preseže določeno kritično vrednost (med 0,2 V in 1 V, odvisno od vrste celic in eksperimentalnih pogojev), že nekaj mikrosekund po začetku električnega pulza zaznamo spremembo prevodnosti in kapacitivnosti membrane (30–32). Prevodnost membrane se poveča za več tisočkrat, začetno povečanje kapacitivnosti pa znaša le nekaj odstotkov, kar kaže, da elektrokompresija membrane ne igra znatne vloge pri elektroporaciji. Če pulzi niso predolgi, se po njihovem koncu kapacitivnost in prevodnost membrane postopoma vrtneta v začetno stanje.

Raziskave na celicah so pokazale, da gre večji del povišanja prevodnosti pripisati lipidnemu delu membrane, tako da tudi denaturacija membranskih proteinov nima pomembnejšega vpliva na elektroporacijo (32, 33).

Več raziskovalcev je poizkušalo elektroporacijo opazovati pod mikroskopom. Danes vemo, da neposredno opazovanje por ni mogoče, saj so premajhne tudi za najvišje ločljivosti elektronskih mikroskopov. Zato preostane le posredno opazovanje, pri katerem spremljamo enega od pojavov, ki so posledica elektroporacije. Tako lahko s katerim od potenciometričnih barvil, ki se vgradijo v membrano, opazujemo spremembe membranske napetosti (glej npr. sliki 2 in 3), s katerim od vodotopnih (ponavadi fluorescentnih) barvil pa lahko opazujemo pretok snovi skozi membrano. Če v celico vnesemo barvilo, ki fluorescira le ob prisotnosti določenih ionov, za katere je membrana neprepustna (pogosto Ca^{2+}), v zunajcelični prostor dodamo raztopino teh ionov, nato pa celice elektroporiramo, lahko opazujemo vnos ionov v celico (34). Primer takšnega poizkusa prikazuje slika 5. Druga možnost je, da v zunajcelični prostor dodamo barvilo, ki ne prehaja skozi membrano, če ta ni elektroporirana, nato pa celico elektroporiramo in opazujemo vnos tega barvila.

Pri opazovanju membranske napetosti je pomembno, da uporabimo barvilo, ki se odziva dovolj hitro, saj spremembe membranske napetosti nastopijo že v prvih mikrosekundah po začetku električnih pulzov. Na ta način so ugotovili, da že v manj kot mikrosekundi po začetku pulza membranska napetost dobi



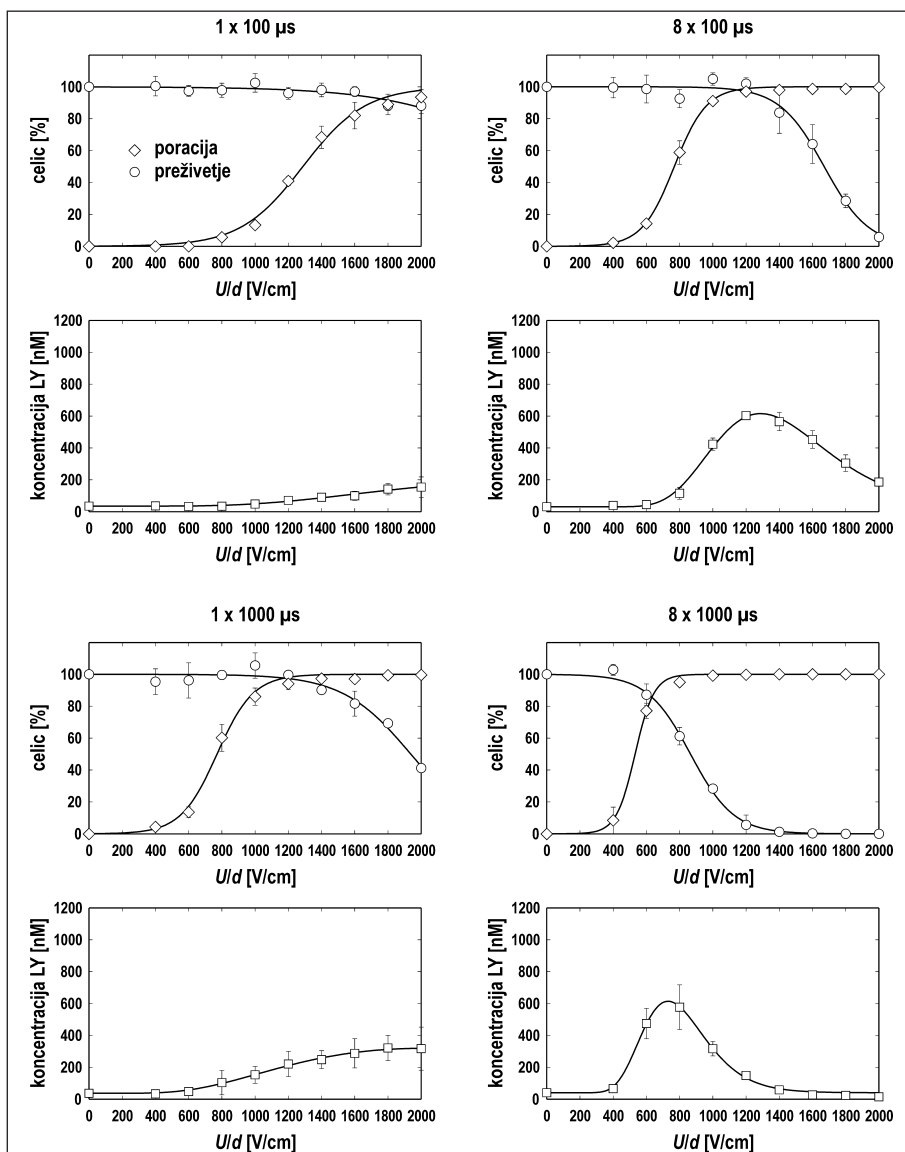
Slika 5. Pretok kalcijevih ionov v celice HeLa (humani karcinom), pritrjene na podlago, pri izpostavitvi različnim jakostim električnega polja med 200 V/cm in 600 V/cm. Uporabljeno je bilo fluorescentno barvilo Fura-2 AM, ki je aktivno le v notranjosti celice in fluorescira ob vezavi na ione Ca^{2+} . Vidimo, da se z višanjem jakosti polja povečuje delež celic, pri katerih pride do elektroporacije, pa tudi vnos kalcija v te celice.

komponento kosinusne oblike, kot to predvideva Schwanova enačba. Če je napetost dovolj visoka, se kosinusna porazdelitev na področjih, kjer presega določeno kritično vrednost, v naslednjih nekaj mikrosekundah spet zniža, kar odraža začetek elektroporacije tistega področja membrane (35, 36).

Če želimo opazovati pretok snovi skozi membrano, hitrost barvila ni tako pomembna. Za opazovanje pretoka ionov je pomembno predvsem, da barvilo, ki fluorescira ob prisotnosti teh ionov, prehaja skozi membrano tudi tedaj, ko ta ni elektroporirana, saj mora barvilo v celico vstopiti že pred elektroporacijo, ki jo želimo opazovati. Kadar opazujemo vnos barvila samega, pa je pogoj ravno nasproten – barvilo ne sme prehajati skozi membrano, če ta ni elektroporirana.

Z meritvami polarizacije absorbirane in odbite svetlobe je mogoče oceniti tudi orientacijo glav lipidnih molekul v membrani. Neumann s sodelavci (37) je na ta način ugotovil, da prve spremembe polarizacije svetlobe nastopijo v prvih mikrosekundah po začetku pulza. Njihove meritve tudi nakazujejo, da v času teh sprememb v lipidni dvosloj vdre določena količina vode, kar vidijo kot dokaz za nastanek hidrofilnih por (prehod iz B v C na sliki 4). Te naj bi obsegale med 0,02 in 0,2% celotne površine membrane, odvisno od intenzivnosti elektroporacije (torej od jakosti in trajanja napetostnih pulzov).

Če poizkuse izvajamo na večji populaciji celic, želimo doseči čim večji delež takšnih celic, ki so elektroporirane in nato okrevaajo. Hkrati je pogosto zaželeno, da je tudi vnos



Slika 6. Primerjava deleža elektroporiranih celic, preživelih celic (tistih, ki okrevaajo) in povprečnega vnosa barvila Lucifer Yellow (LY) v celico pri izpostavitvi enemu ali osmim pulzom dolžine 100 µs ali 1000 µs in pri različnih jakostih (razmerjih med napetostjo na elektrodah in razdaljo med njima) pulzov. Grafi kažejo, da lahko z osmimi pulzi dosežemo znatno višji vnos kot z enim samim pulzom. Glede na namen poizkusov je optimalna jakost pulzov tista, ki ustreza vrhu krivulje vnosa (za čim višji povprečni vnos), ali pa presečišču med krivuljama elektroporacije in preživetja (za čim več celic z vnosom). Na grafih je pri osmih pulzih dolžine 100 µs to presečišče višje kot pri osmih pulzih 1000 µs, zato je v teh pogojih najbolje uporabiti osem pulzov dolžine 100 µs in jakosti 1200 V/cm.

snovi čim večji. V splošnem velja, da intenzivnost elektroporacije – s tem pa tudi vnos snovi – narašča z višanjem jakosti in trajanja električnega pulza, če uporabimo več pulzov, pa tudi s številom pulzov. Vendar z višanjem

vsakega od teh parametrov narašča tudi delež celic, ki izpostavitve ne preživijo oziroma po njej več ne okrevaajo popolnoma. Skozi več kot desetletje eksperimentalnega dela številnih skupin po svetu so nastala okvirna priporo-

čila glede napetosti, trajanja in števila pulzov, pri katerih dosežemo optimalno razmerje med številom elektroporiranih in preživelih celic (38–40). V eksperimentalnih pogojih *in vitro* se tako za vnos manjših molekul pogosto uporablja osem pulzov, od katerih vsak traja 100 μ s, sledijo pa si v razmikih 1 s.

Pri vnosu večjih električno nabitih molekul igra pomembno vlogo tudi elektroforeza, torej vlečna sila, s katero električno polje deluje na nabite delce. Za zadovoljiv vnos molekul, kakršna je na primer DNA, so zato potrebni daljši pulzi kot v primeru manjših molekul. Tako se v zadnjem času v genski terapiji uveljavljajo postopki, v katerih krajšemu pulzu (nekaj sto mikrosekund) z visoko napetostjo sledi daljši pulz (nekaj deset milisekund) z nekajkrat nižjo napetostjo (41–43).

Napetost na elektrodah, pri kateri dosežemo najboljše rezultate, je odvisna od tega, kako daleč narazen sta elektrodi. Schwanova enačba namreč pove, da je vsiljena membranska napetost sorazmerna jakosti električnega polja, ki mu je celica izpostavljena, ta jakost pa je sorazmerna napetosti med elektrodama in približno obratno sorazmerna z razdaljo med njima. Če sta elektrodi ploščati in njuna velikost znatno presega razdaljo med njima, je razmerje med napetostjo in razdaljo med elektrodama dober približek jakosti električnega polja; če je U_E napetost med elektrodama

in d razdalja med njima, lahko torej pišemo $E \approx U_E/d$. S tem izrazom in Schwanovo enačbo si pomagamo pri določanju napetosti med elektrodama, pri kateri bo membranska napetost dosegla želeno vrednost.

Število, trajanje in jakost pulzov, pri katerih dosežemo najboljše rezultate, so seveda odvisni tudi od vrste celic, s katerimi delamo, snovi, ki jo želimo vnašati, pa tudi od ostalih eksperimentalnih pogojev. Optimalne vrednosti teh parametrov lahko določimo le s poizkusi, seveda s tistimi celicami in v takšnih pogojih, v kakršnih nameravamo poizkuse tudi nadaljevati. Slika 6 prikazuje del rezultatov serije poizkusov, katerih namen je bil določiti optimalne pogoje za elektroporacijo celic DC-3F (pljučnih fibroblastov kitajskega hrčka).

Preučevali so tudi učinek oblike pulzov na učinkovitost elektroporacije. Nekaj poročil je trdilo, da lahko učinkovitost elektroporacije povišamo tako, da navadnim »pravokotnim« pulzom dodamo sinusno valovanje s frekvenco nekaj deset ali nekaj sto kHz. Vendar zaenkrat kaže, da sta ključna parametra pulza največja napetost, ki jo pulz doseže, in trajanje te napetosti (38–40). Razlike v rezultatih, ki jih dobimo z različnimi oblikami pulzov, je mogoče razložiti z razlikami med vrednostmi teh dveh parametrov pri posameznih oblikah pulzov.

LITERATURA

- Mir LM, Glass LF, Serša G, Teissie J, Domenge C, Miklavčič D, Jaroszeski MJ, Orłowski S, Reintgen DS, Rudolf Z, Belehradek M, Gilbert R, Rols MP, Belehradek J Jr, Bachaud JM, DeConti R, Štabuc B, Čemažar M, Coninx P, Heller R. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumors by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1998; 77: 2336–2342.
- Heller R, Gilbert R, Jaroszeski MJ. Clinical applications of electrochemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* 1999 35: 119–129.
- Gothelf A, Mir LM, Gehl J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 371–387.
- Serša G, Čemažar M, Rudolf Z. Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients. *Cancer Ther* 2003; 1: 133–142.
- Rols MP, Deltell C, Golzio M, Dumond P, Cros S, Teissie J. In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 168–171.
- Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nature Biotechnol* 1998; 16: 867–870.
- Ferber D. Gene therapy: safer and virus free. *Science* 2001; 294: 1638–1642.
- Golzio M, Rols MP, Teissie J. In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. *Methods* 2004; 33: 126–135.
- Goldman DE. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiol* 1943; 27: 37–60.
- Schwan HP. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv Biol Med Phys* 1957; 5: 147–209.
- Schwarz G, Saito M, Schwan HP. On the orientation of nonspherical particles in an alternating electrical field. *J Chem Phys* 1965; 10: 3562–3569.
- Kotnik T, Miklavčič D. Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells. *Biophys J* 2000; 79: 670–679.
- Valič B, Golzio M, Pavlin M, Schatz A, Faurie C, Gabriel B, Teissie J, Rols MP, Miklavčič D. Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur Biophys J* 2003; 32: 519–528.

14. Weaver JC, Chizmadzev YA. Theory of electroporation: a review. *Bioelectroch Bioener* 1996; 41: 135–160.
15. Weaver JC, Mintzer RA. Decreased bilayer stability due to transmembrane potentials. *Phys Lett* 1981; 86A: 57–59.
16. Glaser RW, Leikin SL, Chernomordik LV, Pastushenko VF, Sokirko AV. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochim Biophys Acta* 1988; 940: 275–287.
17. Barnett A, Weaver JC. Electroporation: a unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and rupture. *Bioelectroch Bioener* 1991; 25: 163–182.
18. Freeman SA, Wang MA, Weaver JC. Theory of electroporation for a planar bilayer membrane: predictions of the fractional aqueous area, change in capacitance and pore-pore separation. *Biophys J* 1994; 67: 42–56.
19. Neumann E, Kakorin S, Tonsing K. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectroch Bioener* 1999; 48: 3–16.
20. Rols MP, Teissie J. Modulation of electrically induced permeabilization and fusion of Chinese hamster ovary cells by osmotic pressure. *Biochemistry* 1990; 29: 4561–4566.
21. Golzio M, Mora MP, Raynaud C, Deltail C, Teissie J, Rols MP. Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys J* 1998; 74: 3015–3022.
22. DeBruin KA, Krassowska W. Modeling electroporation in a single cell. II. Effects of ionic concentrations. *Biophys J* 1999; 77: 1225–1233.
23. Tieleman DP, Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ. Simulation of pore formation in lipid bilayer by mechanical stress and electric fields. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 6382–6383.
24. Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ. Molecular dynamics simulations of hydrophilic pores in lipid bilayers. *Biophys J* 2004; 86: 2156–2164.
25. Kasson PM, Pande VS. Molecular dynamics simulation of lipid reorientation at bilayer edges. *Biophys J* 2004; 86: 3744–3749.
26. Stämpfli R. Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a Ranvier node. *An Acad Brasil Ciens* 1958; 30: 57–63.
27. Sale JH, Hamilton WA. Effects of high electric field on microorganisms I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochim Biophys Acta* 1967; 148: 781–788.
28. Hamilton WA, Sale JH. Effects of high electric field on microorganisms II. Mechanisms of action of the lethal effect. *Biochim Biophys Acta* 1967; 148: 789–800.
29. Sale JH, Hamilton WA. Effects of high electric field on microorganisms III. Lyses of erythrocytes and protoplasts. *Biochim Biophys Acta* 1968; 163: 37–43.
30. Neumann E, Rosenheck K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J Membrane Biol* 1972; 10: 279–290.
31. Babakov AV, Ermishkin LN. Influence of electric field on the capacity of phospholipids membranes. *Nature* 1966; 210: 953–955.
32. Zimmermann U. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim Biophys Acta* 1982; 694: 227–277.
33. Chernomordik LV, Sukharev SI, Popov SV, Pastushenko VF, Sokirko AI, Abidor IG, Chizmadzev YA. The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies. *Biochim Biophys Acta* 1987; 902: 360–373.
34. Bobanović F, Bootman MD, Berridge MJ, Parkinson NA, Lipp P. Elementary $[Ca^{2+}]_i$ signals generated by electroporation functionally mimic those evoked by hormonal stimulation. *FASEB J* 1999; 13: 365–376.
35. Hibino M, Shigemori M, Itoh H, Nagayama K, Kinoshita K Jr. Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophys J* 1991; 59: 209–220.
36. Hibino M, Itoh H, Kinoshita K Jr. Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophys J* 1993; 64: 1789–1800.
37. Kakorin S, Stoylov SP, Neumann E. Electrooptics of membrane electroporation in diphenylhexatriene-doped lipid bilayer vesicles. *Biophys Chem* 1996; 58: 109–116.
38. Rols MP, Teissie J. Electroporemeabilization of mammalian cells. quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys J* 1990; 58: 1089–1098.
39. Canatella PJ, Karr JF, Petros JA, Prausnitz MR. Quantitative study of electroporation-mediated molecular uptake and cell viability. *Biophys J* 2001; 80: 755–764.
40. Kotnik T, Puchar G, Reberšek M, Mir LM, Miklavčič D. Role of pulse shape in cell membrane electroporemeabilization. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1614: 193–200.
41. Klenchin VA, Sukharev SI, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzev YA. Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys J* 1991; 60: 804–811.
42. Sukharev SI, Klenchin VA, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzev YA. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J* 1992; 63: 1320–1327.
43. Štkauskas S, Bureau MF, Puc M, Mahfoudi A, Scherman D, Miklavčič D, Mir LM. Mechanisms of in vitro DNA electrotransfer: Respective combination of cell electroporemeabilization and DNA electrophoresis. *Mol Ther* 2002; 5: 1–7.