UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Črt ZUPANČIČ

### OKREVANJE MEMBRANE CHO CELIC PO ELEKTROPORACIJI PRI SOBNI TEMPERATURI V IZOTONIČNEM IN HIPOTONIČNEM PUFRU

Diplomsko delo Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Črt ZUPANČIČ

### OKREVANJE MEMBRANE CHO CELIC PO ELEKTROPORACIJI PRI SOBNI TEMPERATURI V IZOTONIČNEM IN HIPOTONIČNEM PUFRU

Diplomsko delo

Univerzitetni študij

### RESEALING PROCESS OF CHO CELLS AFTER ELECTROPORATION AT ROOM TEMPERATURE IN ISOTONIC AND HYPOTONIC BUFFERS

Graduation Thesis

University Studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v Infrastrukturnem centru MRIC Laboratorija za biokibernetiko na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Damijana Miklavčiča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Gregor ANDERLUH Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član:	prof. dr. Damijan MIKLAVČIČ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko
Član:	prof. dr. Peter MAČEK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnjice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Črt Zupančič

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ključna dokumentacijska informacija

- ŠD Dul
- DK 602.621:576.3(043.2)=163.6
- KG elektroporacija/okrevanje (celjenje) membran CHO celic/izotonični pufer/hipotonični pufer/sobna temperatura/elektrofuzija
- AV ZUPANČIČ, Črt
- SA MIKLAVČIČ, Damijan (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2010
- IN OKREVANJE MEMBRANE CHO CELIC PO ELEKTROPORACIJI PRI SOBNI TEMPERATURI V IZOTONIČNEM IN HIPOTONIČNEM PUFRU
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP VII, 60 str., 10 sl., 84 vir.
- IJ SI
- JI sl/en
- AI Elektroporacija, ki se v molekularni biologiji uporablja kot način vnosa snovi v celice, povzroči veliko povečanje električne prevodnosti in nespecifične prepustnosti celične plazemske membrane. Če električni pulzi, ki povzročajo elektroporacijo plazemske membrane niso preveliki, sta povečanje prepustnosti celične membrane in izguba celične vsebine prehodni ter izzvenita po določenem času. Govorimo torej o okrevanju (celjenju) membrane celic in samih celic, kar pa je aktiven biološki proces. Proces okrevanja membrane celic je odvisen od metabolizma celic, njegova hitrost pa je v veliki meri odvisna od temperature po dovajanju električnih pulzov. Namen naše naloge je bil določiti okrevanje plazemske membrane pritrjenih in suspendiranih CHO celic in okrevanje samih celic, po elektroporaciji pri sobni temperaturi ter določiti učinek dveh amplitud električnih pulzov (560 in 640 V) in toničnosti elektroporacijskega pufra na proces okrevanja CHO celic v suspenziji. Za elektroporacijo CHO celic smo uporabili generator pulzov Cliniporator, okrevanje membrane celic pa smo spremljali z merjenjem fluorescence propidijevega jodida s pomočjo spektrofluorometra Tecan. Ugotovili smo, da je okrevanje membrane pritrjenih CHO celic relativno hitro. Enako velja tudi za okrevanje membran CHO celic v suspenziji, saj je v obeh primerih po 5 minutah inkubacije pri sobni temperaturi membrana okrevala pri več kot 70 % celic. Kljub temu je proces okrevanja membrane hitrejši pri celicah v suspenziji kot pri pritrjenih celicah. Ugotovili smo tudi, da okrevanje membrane CHO celic v suspenziji ni odvisno od uporabljenih amplitud električnih pulzov (560 in 640 V) ali toničnosti elektroporacijskega pufra.

Key words documentation

- ND Du1
- DC 602.621:576.3(043.2)=163.6
- CX electroporation/membrane resealing of CHO cells/isotonic buffer/hypotonic buffer/room temperature/electrofusion
- AU ZUPANČIČ, Črt
- AA MIKLAVČIČ, Damijan (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- PY 2010
- TI RESEALING PROCESS OF CHO CELLS AFTER ELECTROPORATION AT ROOM TEMPERATURE IN ISOTONIC AND HYPOTONIC BUFFERS
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programme)
- NO VII, 60 p., 10 fig., 84 ref.
- LA SI
- AL sl/en
- AB Electroporation, which is used in molecular biology as a way of introducing substances into cells, leads to a significant increase in electrical conductivity and nonspecific permeability of plasma cell membrane. If the electric pulses, that cause electroporation of the plasma membrane are not too drastic, the increase of permeability of the cell membrane is transient and fades away after some time. In this case, we consider the resealing of the cell membrane, which is an active biological process. The cell membrane resealing process depends on the cell metabolism, and after electroporation its' speed depends on the incubation temperature. The aim of our study was to determine membrane resealing process of plated and suspended CHO cells after electroporation at room temperature, and to determine the effect of two pulse amplitudes (560 in 640 V) and the tonicity of the electroporation buffers used on this process for CHO cells in suspension. For the electroporation of CHO cells, we used a Cliniporator pulse generator, and the resealing was monitored by measuring fluorescence of propidium iodide by means of a Tecan spectrofluorometer. We observed, that the membrane resealing of plated CHO cells is relatively fast. The same applies for the resealing of CHO cells in suspension, since in both cases, after 5 minutes incubation time at room temperature, the membrane resealed in more than 70 % of the cells. Nevertheless, the resealing process is faster for cells in suspension than for plated cells. Also, we found out that the membrane resealing of CHO cells in suspension does not depend on the pulse amplitudes (560 in 640 V) or tonicity of the electroporation buffer used.

#### Kazalo vsebine

		str.
Ključna dokumentacijska informacija		
Key words documentation		
Kazalo vsebine		V
Kazalo slik		VIII
Slovarček		IX
1	UVOD	1
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2	NAMEN IN HIPOTEZA	2
2	PREGLED OBJAV	4
2.1	BIOLOŠKE MEMBRANE	4
2.2	OVARIJSKE CELICE KITAJSKEGA HRČKA	4
2.3	ELEKTROPORACIJA	5
2.3.1	Definicija	5
2.3.2	Spremememba transmembranskega potenciala	5
2.3.3	Reverzibilnost pojava	6
2.3.4	Vnos molekul z uporabo reverzibilne elektroporacije	7
2.3.5	Mehanizem elektroporacije	7
2.3.5.1	»Elektropore«	10
2.4	UPORABA ELEKTROPORACIJE	11
2.5	OKREVANJE (CELJENJE) MEMBRANE CELIC PO ELEKTROPORACIJI	13
2.6	VPLIV PARAMETROV NA ELEKTROPORACIJO IN OKREVANJE CELIČNIH MEMBRAN	13
2.6.1	Parametri električnega polja	14

2.6.2	Fizikalni parametri	16
2.6.2.1	Temperatura	16
2.6.2.2	Prevodnost in ionska jakost elektroporacijskega pufra	17
2.6.2.3	Osmotski tlak	17
2.6.3	Biološki parametri	19
2.6.3.1	Fluidnost membrane	19
2.6.3.2	Citoskelet	19
2.6.3.3	Vpliv ATP	20
2.6.3.4	Druge molekule in ioni	21
3	MATERIAL IN METODE	22
3.1	MATERIAL	22
3.1.1	Kemikalije, raztopine in ostalo	22
3.1.1	Laboratorijska oprema in aparature	22
3.2	METODE	23
3.2.1	Priprava celične kulture	23
3.2.2	Poizkus s pritrjenimi CHO celicami	24
3.2.3	Poizkus s celicami v suspenziji	26
4	REZULTATI	28
4.1	OKREVANJE MEMBRANE PRITRJENIH CHO CELIC	28
4.2	OKREVANJE MEMBRANE CHO CELIC V SUSPENZIJI	29
4.2.1	Okrevanje membrane pritrjenih in suspendiranih CHO celic v izotoničnem mediju	29
4.2.2	Okrevanje membrane suspendiranih CHO celic v izotoničnem in hipotoničnem pufru	30
4.2.3	Okrevanje membrane suspendiranih CHO celic po elektroporaciji z jakostima električnega polja 1400 in 1600 V/cm	33
5	RAZPRAVA	37

5.1	OKREVANJE MEMBRANE PRITRJENIH CHO CELIC	37
5.2	OKREVANJE MEMBRANE CHO CELIC V SUSPENZIJI	38
5.2.1	Primerjava okrevanja membrane pritrjenih CHO celic in CHO celic v suspenziji v izotoničnem mediju	38
5.2.2	Primerjava vpliva toničnosti pufra na okrevanje membrane CHO celic v suspenziji	39
5.2.3	Primerjava vpliva jakosti električnega polja na okrevanje membrane CHO celic v suspenziji	41
6	SKLEPI	43
7	VIRI	44
7.1	TISKANI VIRI	44
7.2	ELEKTRONSKI VIRI	50
	ZAHVALA	

#### Kazalo slik

		str.
Sl. 1:	Nastanek vodne pore po modelu elektroporacije.	9
Sl. 2:	Shematski prikaz odnosa med eksperimentalno izmerjenimi količinami (opažanji) teoretsko interpretacijo.	in 11
S1. 3:	Izpostavitev celice električnemu polju.	12
Sl. 4:	Cliniporator – generator električnih pulzov.	25
S1. 5:	Okrevanje membrane pritrjenih CHO celic po elektroporaciji pri sobni temperaturi izotoničnem pufru.	v 28
Sl. 6:	Primerjava okrevanja membrane pritrjenih in suspendiranih CHO celic po elektroporaciji pri sobni temperaturi v izotoničnem pufru.	30
Sl. 7:	Okrevanje membrane CHO celic v suspenziji po elektroporaciji 1400 V/cm pri sob temperaturi v izotoničnem in hipotoničnem pufru.	oni 31
S1. 8:	Okrevanje membrane CHO celic v suspenziji po elektroporaciji 1600 V/cm pri sob temperaturi v izotoničnem in hipotoničnem pufru.	oni 32
S1. 9:	Okrevanje membrane CHO celic v suspenziji po elektroporaciji 1400 in 1600 V/cr. pri sobni temperaturi v izotoničnem pufru.	n 34
Sl. 10	): Okrevanje membrane CHO celic v suspenziji po elektroporaciji 1400 in 1600 V/c pri sobni temperaturi v hipotoničnem pufru.	em 35

#### Slovarček

ATP	adenozin trifosfat
СНО	ovarijske celice kitajskega hrčka (angl. Chinese Hamster Ovary)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
E	jakost polja
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
F-12 HAM	gojišče za CHO celice
HBSS	angl. Hanks' Balanced Salt Solution
U <sub>ITV</sub>	inducirana transmembranska napetost
k <sub>R</sub>	konstanta hitrosti okrevanja (celjenja) membrane
NK	negativna kontrola
NMR	jedrska magnetna resonanca (angl. nuclear magnetic resonance)
P188	poloksamer 188
PC	fosfatidilholin
PI	propidijev jodid
РК	pozitivna kontrola
r	radij celice
ROS	reaktivne kisikove spojine
φ	kot med tokovnicami polja ter izbrano točko na celični površini

#### 1 UVOD

#### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Vse celice obdaja celična membrana (plazmalema), ki ločuje notranjost celice od zunanjega okolja in nadzoruje gibanje snovi v celico ter iz nje. Govorimo o selektivni prepustnosti celične membrane, saj številne molekule ne morejo prosto prehajati skoznjo.

Izpostavitev celic zunanjemu električnemu polju pa povzroči spremembe membranske strukture oz. permeabilizacijo (prepustnost) celične membrane za molekule, ki drugače ne morejo prosto prehajati skozi njo.

Elektroporacija je lahko ireverzibilna, pri čemer nastanejo nepopravljive poškodbe bioloških struktur (npr. membran). Torej membrane ostanejo trajno prepustne, kar vodi v izgubo celično vsebine in posledično tudi v celično smrt.

Lahko pa je reverzibilna. Tako membrane po elektroporaciji v določenem času okrevajo (se zacelijo; *angl. reseal*). To okrevanje membrane omogoči celicam preživetje in nadaljnje opravljanje svoje normalne biološke funkcije. Reverzibilna elektroporacija se uporablja v *in vitro* ali *in vivo* pogojih in ima veliko uporabno vrednost v biologiji, biotehnologiji in medicini.

Reverzibilna elektroporacija se tako uporablja za vključevanje manjših ali večjih hidrofilnih molekul v citoplazmo celic. Poznamo elektrokemoterapijo, pri kateri z elektroporacijo vnašamo hidrofilne citotoksične kemoterapevtike (npr. cisplatin, bleomicin) v tumorske celice. Možna je tudi uporaba elektroporacije za ne-virusni prenos DNK v celice, govorimo o t.i. elektrotransfekciji. Ta se lahko uporablja v genski terapiji in tudi za proizvodnjo gensko spremenjenih organizmov (GSO). Uporaba je možna tudi za vstavljanje beljakovin v celično membrano ali za celično zlitje (fuzijo). V zadnjem primeru gre za t.i. elektrofuzijo celic, ki je ne-virusna in ne-kemična električna metoda, za pripravo hibridnih celic in njihovih produktov (npr. monoklonskih protiteles).

Reverzibilna elektroporacija je kompleksen proces, katerega molekularni mehanizem, kljub široki uporabi te metode, še ni popolnoma pojasnjen. Zato je poznavanje parametrov, ki določajo uspešnost reverzibilne elektroporacije in s tem tudi okrevanja membran po njej, ključnega pomena za praktično implementacijo te metode in poznavanje njenega mehanizma delovanja. Torej sta optimizacija in kontrola vsakega koraka reverzibilne elektroporacije izrednega pomena.

Za maksimalno uspešnost reverzibilne elektroporacije, moramo uporabiti optimalne parametre zunanjega električnega polja ter optimalne biofizikalne in biološke parametre. Ključno vlogo igrajo prej omenjeni parametri zunanjega električnega polja (amplituda, trajanje, oblika, število, frekvenca pulzov ter tip, geometrija in pozicija elektrod), biološki parametri (tip, stanje, velikost, orientacija in gostota celic, zmožnost okrevanja membrane po pulzih) in biofizikalni parametri (vsiljena transmembranska napetost, ionska sestava elektroporacijskega pufra, temperatura, fluidnost membrane, itd.) ter naboj in velikost molekul, ki jih želimo vnesti v celice. Ti parametri morajo omogočati maksimalno elektropermeabilizacijo celic in povrnitev membran teh celic v prvotno stanje, zato da celice lahko ohranijo svojo viabilnost.

Nekateri od omenjenih parametrov, ki vplivajo na potek reverzibilne elektroporacije, vplivajo tudi na proces okrevanja (celjenja) membrane celic, saj je le-ta pomemben del reverzibilne elektroporacije. V naši nalogi smo se osredotočili predvsem na vpliv stanja celic (biološki parameter), saj smo primerjali okrevanje membrane pritrjenih CHO celic in CHO celic v suspenziji. Zanimal nas je tudi vpliv toničnosti elektroporacijskega pufra (biofizikalni parameter) na okrevanje membrane CHO celic v suspenziji. Poleg tega, pa smo del naloge posvetili vplivu dveh amplitud (parameter zunanjega električnega polja) na okrevanje membrane CHO celic v suspenziji.

#### 1.2 NAMEN IN HIPOTEZA

Našo nalogo smo usmerili k pridobitvi podatkov o okrevanju (celjenju) membrane CHO celic po elektroporaciji pri sobni temperaturi, saj se ta proces pri tej temperaturi začne takoj po elektropermeabilizaciji celic, poteka zelo hitro in spontano izgine s časom. Proces okrevanja membrane po elektroporaciji je zelo pomemben korak pri metodi elektrofuzije in genske transfekcije, saj je v obeh primerih pomembno, da se membrane po elektroporaciji zacelijo in da tako celice ostanejo viabilne.

Ker je reverzibilnost elektroporacije odvisna od parametrov zunanjega električnega polja, biofizikalnih in bioloških parametrov, smo se odločili, da se bomo v naši nalogi osredotočili prav na ta proces, v odvisnosti od omenjenih parametrov.

Za doseganje reverzibilne elektroporacije in največjega preživetja celic smo uporabili optimalne parametre zunanjega električnega polja. Da smo dosegli enako permeabilizacijo pritrjenih CHO celic in CHO celic v suspenziji, smo za pritrjene CHO celice uporabili jakost električnega polja 1000 V/cm ( $8 \times 100 \mu s$ , 1 Hz) in izotonični elektroporacijski pufer, za celice v suspenziji pa smo uporabili dve različni amplitudi električnih pulzov (560 in 640 V) oziroma jakosti električnega polja 1400 ali 1600 V/cm ( $8 \times 100 \mu s$ , 1 Hz) in izotonični ter hipotonični elektroporacijski pufer. Hipotonični elektroporacijski pufer se pogosto uporablja za elektrofuzijo, saj je ta ob uporabi le-tega uspešnejša.

Namen diplomske naloge je bil določiti okrevanje plazemske membrane pritrjenih CHO celic in CHO celic v suspenziji po elektroporaciji pri sobni temperaturi v izotoničnem elektroporacijskem pufru, določiti vpliv toničnosti (izotonični in hipotonični elektroporacijski pufer) medija na proces okrevanja membrane CHO celic v suspenziji in določiti vpliv dveh amplitud električnih pulzov na proces okrevanja membrane CHO celic v suspenziji.

Naša hipoteza je bila, da membrane pritrjenih in suspendiranih CHO celic okrevajo relativno hitro in da amplitudi električnih pulzov (560 in 640 V) ter toničnost pufra vplivata na okrevanje plazemske membrane CHO celic v suspenziji.

#### 2 PREGLED OBJAV

#### 2.1 BIOLOŠKE MEMBRANE

Celična membrana (plazemska membrana ali plazmalema) je biološka membrana, ki ločuje notranjost celice od zunanjega okolja in je zato ključna za preživetje celic. Obdaja vse celice, je selektivno prepustna in nadzoruje gibanje snovi v celico in iz nje (Alberts in sod., 2002).

Sestavljena je iz različnih bioloških molekul, primarno lipidov, ki se urejajo v lipidni dvosloj in proteinov, ki se po modelu tekočega mozaika urejajo v dvodimenzionalno tekočino, v kateri lahko bolj ali manj prosto prehajajo z difuzijo (Singer in Nicolson, 1972).

Razmerje med lipidi in proteini v membranah je specifično glede na vrsto celice, običajno pa je le-to 1:1. Poleg tega, membrane tvorijo tudi ogljikovi hidrati, ki se pojavljajo v obliki glikoproteinov in glikolipidov, vendar se ti nahajajo na zunajcelični površini membrane (Alberts in sod., 2002).

V fizioloških razmerah so membrane selektivno prepustne in prepuščajo le molekule, za katere obstajajo specifični mehanizmi transporta (Kotnik in sod., 2005; Tarek in Delemotte, 2009).

Prehod je odvisen predvsem od polarnosti, električnega naboja in molekulske mase molekul, ki prehajajo. Bolj nepolarne oziroma električno nevtralne in manjše molekule lažje prehajajo skozi membrano kot večje, nabite molekule. Celice lahko zato s pomočjo transmembranskih proteinskih kompleksov (pore, kanali, prenašalci) nadzirajo gibanje snovi (Alberts in sod., 2002).

Selektivna prepustnost membrane in aktivni transport omogočata na membrani stalno prisotno mirovno membransko napetost (-90 do -40 mV), ki je posledica majhnega primanjkljaja pozitivnih ionov v citoplazmi (Cole, 1972; Atwood in Mackay, 1989).

Membrana igra pomembno vlogo pri zagotavljanju celične homeostaze. Tako je ena pomembnejših vlog membrane ravno regulacija transporta molekul v celico in iz nje. Vendar se vloga membrane tu še ne konča, saj so membranske molekule vključene v različne celične procese, npr.: encimska aktivnost, površinsko prepoznavanje celic, celična in medcelična signalizacija ter komuniciranje, celična adhezija in vezava na citoskelet (Alberts in sod., 2002).

#### 2.2 OVARIJSKE CELICE KITAJSKEGA HRČKA

Ovarijske celice kitajskega hrčka (CHO; Chinese Hamster Ovary) so ene najbolj široko uporabljenih in raziskanih sesalčjih celičnih linij. Imajo številne prednosti pred ostalimi celičnimi linijami, saj jih je lahko gojiti, rastejo hitro, nimajo strogih zahtev glede rastnega

medija in lahko rastejo kot enoslojne kulture na ploščah ali v suspenziji, torej lahko služijo tudi kot modelni sistemi tkiv (Nickoloff, 1995; Schmeer in sod., 2004).

Primerne so tudi zaradi velike količine podatkov, ki je bila do sedaj zbrana, ravno za pojav elektroporacije (Rols in Teissié, 1990).

#### 2.3 ELEKTROPORACIJA

#### 2.3.1 Definicija

Elektroporacija ali elektropermeabilizacija je pojav, pri katerem se zaradi prisotnosti zunanjega električnega polja spremeni transmembranski potencial, kar nato povzroči spremembo prepustnosti plazmaleme (Neumann in sod., 1982; Lebar in sod., 1998; Lebar, 1999; Miklavčič, 2003; Teissié, 2003; Kotnik in sod., 2005; Neumann, 2005; Trontelj, 2005).

Strogo gledano pojma elektropermeabilizacije oziroma elektroporacije nista sopomenki, saj se prvi nanaša na povečanje prepustnosti nasploh, drugi pa privzema, da je to povečanje posledica nastanka hidrofilnih por v membrani (Lebar in sod., 1998; Kotnik in sod., 2005).

#### 2.3.2 Spremememba transmembranskega potenciala

Ko je celica izpostavljena zunanjemu električnemu polju, se polje v bližini celice skoncentrira v membrani. Ta izpostavitev povzroči nastanek dodatne komponente transmembranskega potenciala, to je vsiljenega (induciranega) transmembranskega potenciala, ki se doda komponenti mirovnega transmembranskega potenciala (Kotnik, 2003; Teissié, 2003; Kotnik in sod., 2005; Trontelj, 2005).

Vsiljena transmembranska napetost ( $U_{ITP}$ ) nastane zaradi prerazporeditve ionov v električnem polju, kar teoretično opišemo s Schwanovo enačbo:

$$U_{\rm ITP} = 1,5 \times r \times E \times \cos\varphi \qquad \dots (1)$$

Radij celice predstavlja r, E pomeni jakost električnega polja in  $\varphi$  predstavlja kot med smerjo polja ter izbrano točko na celični površini (Neumann in sod., 1989).

Torej se vsiljena transmembranska napetost ( $U_{ITP}$ ) spreminja z lego ( $\phi$ ) in je sorazmeren z jakostjo električnega polja (E) ter polmerom (r) celice. Največji učinek zunanjega električnega polja na celice je na mestu, ki je najbližje elektrodam in kjer je električno polje pravokotno na membrano (Lebar in sod., 1998; Lebar, 1999; Kotnik, 2003; Teissié, 2003; Kotnik in sod., 2005).

Če je sprememba transmembranske napetosti dovolj velika, ali z drugimi besedami, če preseže nadpražno (kritično) vrednost, ki znaša od 200 do 1000 mV (razlike med vrstami celic), se v nekaj µs spremeni struktura membrane, tako da se začasno zelo poveča

električna prevodnost in nespecifična prepustnost plazemaleme. Na ta način je plazmalema zaščitena pred popolnim razpadom. V tem primeru Schwanova enačba ne velja več. Pride do hitre depolarizacije membrane in do pojava, ki mu običajno pravimo elektroporacija oziroma elektropermeabilizacija. Odvisnost deleža elektropermeabiliziranih celic od jakosti zunanjega električnega polja nad kritično vrednostjo najbolje opisuje sigmoidna krivulja (Neumann in sod., 1982; Rols in Teissié, 1989; Rols in Teissié, 1990; Teissié in Rols, 1993; Gabriel in Teissié, 1995; Nickoloff, 1995; Lebar in sod., 1998; Rols in Teissié, 1998; Vernhes in sod., 1998; Lebar, 1999; Teissié in sod., 1999; Miklavčič, 2003; Teissié, 2003; Kotnik in sod., 2005; Kakorin, 2005; Trontelj, 2005; Kandušer in Miklavčič, 2009).

Iz Schwanove enačbe (enačba 1) sledi, da je uporabljena jakost električnega polja (E) odvisna tudi od velikosti (radija) celic (Rols in Teissié, 1990; Rols in Teissié, 1998). Za elektropermeabilizacijo večjih celic (večji r) moramo uporabiti nižjo jakost električnega polja (manjši E), saj so večje celice bolj občutljive na zunanje električno polje od manjših. Obratno pa velja za manjše celice (manjši r) (Gabriel in Teissié, 1995; Teissié in sod., 1999; Teissié, 2003; Kandušer in sod., 2005).

Torej je uporabljena jakost električnega polja (E) odvisna od polmera (r), oziroma velikosti celic in je zato različna za pritrjene CHO celice in CHO celice v suspenziji, saj so pritrjene celice večje in jih zato lahko elektropermeabiliziramo z uporabo nižje jakosti električnega polja (E) (Teissié, 2003). Tako je za uspešno elektropermeabilizacijo pritrjenih CHO celic, pri uporabi 10 pulzov dolžine 5 ms, potrebna jakost električnega polja ~400 V/cm (Golzio in sod., 1998), za CHO celice v suspenziji pa ta znaša ~700 V/cm pri uporabi 5 pulzov dolžine 100 µs (Teissié in Rols, 1986).

#### 2.3.3 Reverzibilnost pojava

Ob uporabi zelo velikega zunanjega električnega polja, jakosti nekaj kV/cm, začne dolgoživost por hitro upadati. Membrana se ireverzibilno poruši, kar povzroči nekontroliran vstop molekul in ionov v celice, npr. molekularni transport med znotrajceličnim in zunajceličnim okoljem, vodi v preveliko kemijsko neravnovesje in zato ne pride do okrevanja membrane in celice. Posledica tega je osmotsko nabrekanje celic, uhajanje znotrajcelične vsebine, poškodbe DNK in na koncu celična liza ter smrt. V tem primeru govorimo o ireverzibilni elektroporaciji. Ta se predvsem uporablja za uničenje mikroorganizmov in v tehnikah uničevanja tkiva (Nickoloff, 1995; Lebar in sod., 1998; Vernhes in sod., 1998; Teissié in sod., 1999; Teissié, 2003; Kandušer in sod., 2005; Kotnik in sod., 2005; Kandušer in Miklavčič, 2009).

Če pa jakost zunanjega električnega polja ni prevelika, torej je višja od nadpražne vrednosti in hkrati dovolj nizka, da celične membrane ne poškoduje trajno, se po koncu izpostavitve polju v celični membrani sčasoma vzpostavi prvotno stanje ali drugače povedano, celična membrana sčasoma okreva oziroma se zaceli. Prepustnost membrane je v tem primeru začasna, pravimo, da je elektroporacija reverzibilna, saj se prepustnost

membrane postopoma zniža na začetno raven in celice lahko ohranijo svoje fiziološko delovanje. Torej celice preživijo elektropermeabilizacijo in ostanejo viabilne. To velja tudi za elektropermeabilizirane CHO celice (Teissié in Rols, 1986; Nickoloff, 1995; Djuzenova in sod., 1996; Lebar in sod., 1998; Miklavčič, 2003; Kandušer in sod., 2005; Kotnik in sod., 2005; Trontelj, 2005; Kandušer in Miklavčič, 2009).

#### 2.3.4 Vnos molekul z uporabo reverzibilne elektroporacije

Reverzibilna elektroporacija se v molekularni biologiji običajno uporablja kot način vnosa snovi v celico, za katere predstavlja celična membrana sicer nepremagljivo oviro. Z uporabo reverzibilne elektroporacije lahko majhne molekule velikosti do 4 kDa, ne glede na njihovo kemijsko naravo, na račun koncentracijskega gradienta difundirajo skozi permeabilizirano membrano. Reverzibilna elektroporacija je zato ena najbolj uspešnih metod uvajanja tujih molekul (zdravilnih učinkovin, oligonukleotidov, protiteles, plazmidov) v žive celice v *in vitro* pogojih. Dejanski transport molekul se odvija počasi med pulzom in dolgim časovnim intervalom po aplikaciji kratkega pulza. To časovno okno je odprto od faze nastanka prehodnih struktur do zaključenega okrevanja (celjenja) membrane. Torej je transport molekul v večini post-pulzni dogodek (Neumann in sod., 1982; Nickoloff, 1995; Lebar in sod., 1998; Neumann in sod., 1998; Lebar, 1999; Teissié in sod., 1999; Miklavčič, 2003; Teissié, 2003; Kotnik in sod., 2005; Miklavčič, 2005; Neumann, 2005; Teissié in sod., 2005; Pavlin in sod., 2006; Pavlin in Miklavčič, 2008; Pucihar in sod., 2008; Kandušer in Miklavčič, 2009; Tarek in Delemotte, 2009; Miklavčič in Towhidi, 2010).

Povečanje prepustnosti celične membrane z električnim poljem ms trajanja, je specifično za plazmalemo in ne prizadene membrane celičnih organelov. Povečanje prepustnosti celične membrane lahko dosežemo na pritrjenih celicah ali na celicah v suspenziji (Lebar in sod., 1998; Lebar, 1999). Pritrjene celice so za razliko od celic v suspenziji (sferična oblika, homogenost) bolj podobne celicam v tkivih (prava oblika) (Marjanovič in sod., 2010). Transport molekul po izpostavitvi električnim pulzom je pri fiksnih parametrih električnega polja počasnejši v pritrjene celice, kot v suspendirane (Pucihar in sod., 2008).

Obstajajo trije glavni mehanizmi transporta molekul skozi membrano pri uporabi elektroporaciji: difuzija, elektroforeza in elektroosmoza. Začasno električno polje znotraj prehodnih struktur deluje tudi kot lokalna sila za molekularni transport skozi njih. Med samim trajanjem pulza se torej transport odvija predvsem na račun elektroforeze in delno difuzije, medtem ko se transport po zaključenem pulzu odvija predvsem na račun difuzije (Nickoloff, 1995; Puc in sod., 2002; Pucihar in sod., 2008).

#### 2.3.5 Mehanizem elektroporacije

Elektroporacijo običajno preučujemo z merjenjem električnih in optičnih lastnosti celične membrane ali z opazovanjem pretoka ionov in molekul skozi njo. Neposredno opazovanje

sedaj še ni mogoče. Zato enega najbolj perečih problemov predstavlja ravno nepopolno poznavanje mehanizma elektroporacije. Elektroporacijo celic običajno kvantificiramo z vstopom sicer neprehodnih (tripan modro) ali fluorescentnih (propidijev jodid, kalcein) barvil ali z merjenjem uhajanja endogenih metabolitov (ATP) (Rols in Teissié, 1990; Neumann in sod., 1998; Teissié in sod., 1999; Lebar in Miklavčič, 2001; Teissié, 2003; Kotnik in sod., 2005; Rols, 2005; Trontelj, 2005; Kandušer in Miklavčič, 2009; Miklavčič in Towhidi, 2010).

Torej lahko posredno opazujemo pojav elektroporacije v *in vitro* pogojih s spremljanjem vnosa propidijevega jodida (PI) po poraciji celic. PI (660 Da) je vodotopno fluorescentno barvilo, ki v normalnih pogojih ne more prosto prehajati skozi membrano živih celic. Prehaja samo v elektroporirane celice, v celicah pa se nato hitro veže na DNK in jih tako označi. Z vezavo na DNK se njegova fluorescenca poveča za 20-30-krat in zato lahko njegov vnos spremljamo z merjenjem fluorescence. Nevezanega PI ni potrebno odstraniti, saj meritve s spektrofluorometrom ne moti. PI ima fluorescenčni ekscitacijski maksimum pri 535 nm in emisijski maksimum pri 617 nm valovne dolžine svetlobe (Lebar in Miklavčič, 2001; Mir, 2003; Kotnik in sod., 2005; Trontelj, 2005; Molecular Probes Inc., 2006).

Danes najbolj uveljavljena razlaga kinetike pojava elektroporacije pojasnjuje elektroporacijo kot 4-stopenjski proces.

1. Korak nastanka por

Ob izpostavitvi električnemu polju se pojavi vsiljena transmembranska napetost nad kritično vrednost in zato nastanejo strukturne spremembe v membrani. V dvosloju se spontano tvorijo hidrofobne majhne pore. Te vodijo v nastanek prehodnih nm hidrofilnih por. Zaradi vode in ionov v notranjosti teh por, se lipidi orientirajo tako, da s polarnimi glavami segajo v notranjost teh por. Hidrofilne pore obsegajo med 0,02 in 0,2 % celotne površine membrane, kar pa je odvisno od intenzivnosti elektroporacije.

2. Korak ekspanzije por

Strukturne spremembe celične membrane se med prisotnostjo zunanjega električnega polja večajo oziroma množijo. Tako nastanejo večje pore. Te spremembe so kratkotrajne (ns, µs, ms).

3. Korak stabilizacije por

Ta korak sovpada z izključitvijo zunanjega električnega polja. Kratkotrajne strukturne spremembe se preuredijo v osnovno (izhodiščno) stanje, ali pa v nekaj ms zavzamejo stabilno konfiguracijo.

#### 4. Korak okrevanja (celjenja) celične membrane

Če kratkotrajne strukturne spremembe po izključitvi zunanjega električnega polja zavzamejo stabilno konfiguracijo, govorimo o dolgotrajnih spremembah celične membrane (s, min, h). Plazmalema se nato počasi preuredi v izhodiščno stanje, torej počasi okreva oziroma se zaceli. Postopnost in počasnost okrevanja lahko razložimo tudi z znižanjem energije za nastanek hidrofilnih por, ki nastopi zaradi povišane membranske napetosti

(Glaser in sod., 1987; Neumann in sod., 1989; Rols in Teissié, 1990; Nickoloff, 1995; Lebar in sod., 1998; Teissié in Ramos, 1998; Golzio in sod., 1998; Lebar, 1999; Teissié in sod., 1999; Golzio in sod., 2000; Puc in sod., 2002; Teissié, 2003; Kotnik in sod., 2005; Neumann, 2005; Rols, 2005; Trontelj, 2005; Neumann, 2007; Kandušer in sod., 2008; Golzio in sod., 2009; Kandušer in Miklavčič, 2009; Tarek in Delemotte, 2009; Miklavčič in Towhidi, 2010).



Slika 1: Nastanek vodne pore po modelu elektroporacije. Od zgoraj navzdol: nedotaknjen dvosloj; tvorba hidrofobne pore; prehod v hidrofilno poro in omejeno povečanje polmera pore pri reverzibilni elektroporaciji; neomejeno povečanje polmera pore pri ireverzibilni elektroporaciji (Lebar in sod., 2008).

Elektroporacijo lahko na kratko opišemo z uporabo kemijskega modela kot strukturne prehode med neprepustnimi in prepustnimi stanji celične membrane (Neumann, 2005; Neumann, 2007; Miklavčič in Towhidi, 2010).

To razlago podpirajo tudi teoretični modeli in najnovejše simulacije molekularne dinamike lipidnih dvoslojev, vendar so le-te omejene na kratko ns skalo (Tieleman in sod., 2003).

#### 2.3.5.1 »Elektropore«

Čisti fosfolipidni vezikli imajo kratkoživo prepustnost, saj okrevajo takoj po razpadu, medtem ko je prepustnost naravnih celičnih membran dolgoživa (več s ali min) (Rols in Teissié, 1990; Nickoloff, 1995; Teissié in sod., 1999; Teissié, 2003; Kotnik in sod., 2005; Pavlin in sod., 2006; Pavlin in Miklavčič, 2008; Pucihar in sod., 2008).

Elektroporirane membrane CHO celic vsebujejo vsaj dva tipa »elektropor«.

1. Kratkožive »elektropore«

Življenjska doba kratkoživih por po aplikaciji pulzov je 1 do 5 ms. Torej, je relaksacija kratkoživih por zelo hitra, zato pade prevodnost membrane po vsakem pulzu na začetni nivo. Povprečni premer teh por je  $1,6\pm0,2$  nm. Njihovo število je odvisno od dolžine pulzov in jakosti električnega polja ter neodvisno od števila pulzov.

2. Dolgožive »elektropore«

Med vsakim pulzom se del kratkoživih por stabilizira in tvori nekaj dolgoživih por, ki so termodinamsko stabilne tudi po aplikaciji pulza. Možne razlage za stabilizacijo por so: zlitje manjših por v večje, stabilizacija zaradi membranskih struktur (proteini, citoskelet) ali tvorba dolgoživih por zaradi strukturne prekinitve na področju membranskih domen.

Življenjska doba dolgoživih por po aplikaciji pulzov je od 20 do 40 minut. Povprečni premer teh por je 2 nm ali več

(Glaser in sod., 1987; Neumann in sod., 1989; Rols in Teissié, 1990; Rols in Teissié, 1998; Raffy in Teissié, 1999; Teissié in sod., 1999; Neumann, 2007; Pavlin in Miklavčič, 2008).

Okrevanje membrane celic sovpada s celjenjem dolgoživih por (Pavlin in Miklavčič, 2008).

Pravimo, da je elektroporacija CHO celic dolgoživ proces (Teissié in Rols, 1986). Dolgoživost nekaj »elektropor« je razlog za transport snovi med počasnim okrevanjem membrane (Neumann, 2007; Pavlin in Miklavčič, 2008; Miklavčič in Towhidi, 2010).



Slika 2: Shematski prikaz odnosa med eksperimentalno izmerjenimi količinami (opažanji) in teoretsko interpretacijo (Pavlin in Miklavčič, 2008).

#### 2.4 UPORABA ELEKTROPORACIJE

Z uporabo elektroporacije celična membrana pridobi nove lastnosti: prepustnost za majhne in velike molekule, fuzogenost in sposobnost sprejema eksogenih membranskih proteinov. Pri uporabi drastičnih pogojev elektroporacije pa je možna tudi celična smrt. Posledica teh lastnosti je njena široka uporabnost za vse vrste celic, tako bakterijske in glivne kot tudi rastlinske in živalske celice. Zato jo lahko s pridom uporabljamo v biokemičnih in celičnih laboratorijih, biotehnologiji, farmaciji ter klinični medicini (Lebar in sod., 1998; Teissié, 2003; Neumann, 2005).

Uporaba reverzibilne elektroporacije je zelo zanimiva, saj ta omogoča ohranitev viabilnosti celic. Tako poznamo uporabo reverzibilne elektroporacije za vnos molekul (elektrotransfekcija; vnos DNK) in zdravil (elektrokemoterapija) v celice, za vstavljanje beljakovin v membrano in za fuzijo (zlivanje) celic (elektrofuzija) (Lebar in sod., 1998; Miklavčič, 2003; Kandušer in sod., 2005; Kotnik in sod., 2005; Miklavčič, 2005; Kandušer in Miklavčič, 2009; Trontelj in sod., 2010).



Slika 3: Izpostavitev celice električnemu polju lahko vodi v permeabilizacijo celične membrane ali njeno uničenje. Pri tem procesu igrajo ključno vlogo parametri električnega polja. Če so ti parametri znotraj določenega območja, je permeabilizacija reverzibilna; zato se lahko uporabi za vnos majhnih ali velikih molekul v citoplazmo, vstavitev proteinov v membrano ali celično fuzijo (Miklavčič, 2005).

Fuzogeno stanje celičnih membran, ki ga dosežemo z uporabo ustreznih pogojev, pomeni zlitje membran in posledično tudi zlitje celične vsebine različnih celic (Glaser in sod., 1987; Rols in Teissié, 1990; Rols in Teissié, 1998; Raffy in Teissié, 1999; Trontelj, 2005; Neumann, 2007). Ker mora biti za uspešno elektrofuzijo trajanje fuzogenega stanja krajše od trajanja okrevanja (celjenja) membrane, moramo dobro poznati vpliv parametrov vpletenih v celično elektrofuzijo in okrevanje membran (Teissié in Ramos, 1998; Trontelj, 2005; Kandušer in Miklavčič, 2009; Ušaj in sod., 2009; Ušaj in sod., 2010).

Elektrofuzija je odvisna od bioloških lastnosti različni tipov celic (Teissié in sod., 1999; Ušaj in sod., 2010). Prav tako je potek elektrofuzije odvisen od lastnosti uporabljenega pufra: ionske sestave, električne prevodnosti in osmolarnosti (Ušaj in sod., 2010).

Za elektrofuzijo lahko uporabimo izotonični ali hipotonični pufer, vendar inkubacija celic v primernem hipotoničnem pufru poveča učinkovitost elektrofuzije (Teissié in Rols, 1986). Hipotoničnost pufra poveča osmotski tlak v celici, kar povzroči razpad citoskeleta, poveča se gibljivost membranskih komponent in poveča se celična površina, s tem pa se zmanjšajo odbojne sile, kar vodi v boljši stik med celicami (Rols in Teissié, 1989; Ušaj in sod., 2009; Kandušer in Miklavčič, 2009; Ušaj in sod., 2010).

#### 2.5 OKREVANJE (CELJENJE) MEMBRANE CELIC PO ELEKTROPORACIJI

Proces okrevanja oziroma celjenja membrane predstavlja zadnji korak elektroporacije. Do procesa okrevanja membrane pride le, če električni pulzi, ki povzročajo elektropermeabilizacijo plazmaleme niso preveliki. V tem primeru je povečanje prepustnosti celične membrane prehodno in izzveni po določenem času. Relativno malo je znanega o kinetiki okrevanja membran. Predvideva se, da imajo celice, katerih membrana hitreje okreva, večjo verjetnost preživetja. Torej je celjenje membrane kritičen proces za preživetje celic (Teissié in Rols, 1993; Nickoloff, 1995; Teissié in Ramos, 1998; Kandušer in sod., 2005; Pucihar in sod., 2008).

Z »zakasnjenim dodajanjem« molekul za ugotavljanje integritete celičnih membran po elektroporaciji po različnih časih inkubacije lahko spremljamo okrevanje membran. Del celic še vedno lahko privzema molekule po elektroporaciji, kar pomeni, da imajo te celice zakasnjeno okrevanje membrane (Nickoloff, 1995).

Merjenje membranske prevodnosti na modelnih sistemih in eritrocitih je pokazalo, da se okrevanje membrane začne takoj po električnem pulzu (Gabriel in Teissié, 1995). Proces okrevanja celične membrane je relativno počasen in je sestavljen iz več faz: hitra faza celjenja (µs), ki ji sledi ena ali več počasnejših faz (Pucihar in sod., 2008). Tako čas okrevanja vpliva na količino vnesenega barvila (Djuzenova in sod., 1996).

Hitrost okrevanja opisuje konstanta hitrosti okrevanja ( $k_R$ ), ki je lahko velikostnega reda nekaj minut (Golzio in sod., 1998; Rols in Teissié, 1998; Teissié in sod., 1999; Golzio in sod., 2000; Teissié, 2003; Teissié in sod., 2005).

#### 2.6 VPLIV PARAMETROV NA ELEKTROPORACIJO IN OKREVANJE CELIČNIH MEMBRAN

Številni dejavniki (parametri) vplivajo na elektroporacijo (elektropermeabilizacijo), torej tudi na okrevanje membrane in preživetje celic. Če parametre pravilno izberemo, je elektroporacija reverzibilna in celice se povrnejo v normalno fiziološko stanje (Puc in sod., 2002; Kandušer in sod., 2005). Večinoma želimo doseči čim večji delež elektropermeabiliziranih celic, ki nato okrevajo. Hkrati pa je pogosto zaželen tudi čim večji vnos snovi v celice (Kotnik in sod., 2005).

Zato moramo optimizirati in analizirati parametre v *in vitro* pogojih. Te pa lahko kasneje uporabimo tudi pri *in vivo* poskusih (Marjanovič in sod., 2010).

Skozi več kot desetletje eksperimentalnega dela številnih skupin po svetu so nastala okvirna priporočila glede napetosti, trajanja in števila pulzov, pri katerih dosežemo optimalno razmerje med številom elektropermeabiliziranih in preživelih celic. V *in vitro* pogojih se tako za vnos manjših molekul (npr. PI) najpogosteje uporablja vlak 8 pravokotnih pulzov dolžine 100 µs s ponavljajočo se frekvenco 1 Hz. Optimalni pogoji za

vnos majhnih molekul pa se razlikujejo od optimalnih pogojev za vnos makromolekul. Tako se za vnos makromolekul običajno uporabljajo daljši pulzi dolžine 1 ms ali več (Rols in Teissié, 1998; Lebar in Miklavčič, 2001; Kotnik in sod., 2005; Pavlin in Miklavčič, 2008; Kandušer in Miklavčič, 2009).

Količina makromolekul, ki se pri elektroporaciji vnese v celico, je odvisna tudi od njihove molekularne teže oz. velikosti; v celico vstopi manj težjih molekul kot lažjih (Wolf in sod., 1994; Lebar in sod., 1998; Lebar in Miklavčič, 2001).

Parametri, ki vplivajo na elektroporacijo, so parametri, ki določajo električno polje: jakost električnega polja, dolžina posameznega pulza, število, oblika in frekvenca pulzov ter material in geometrija elektrod (Rols in Teissié, 1990; Lebar in sod., 1998; Teissié in Ramos, 1998; Vernhes in sod., 1998; Lebar in Miklavčič, 2001; Puc in sod., 2002; Lacković, 2003; Kandušer in sod., 2005; Marjanovič in sod., 2010). Ti parametri kontrolirajo življenjsko dobo elektropermeabiliziranega stanja celic (Rols in Teissié, 1990; Wolf in sod., 1994; Rols in Teissié, 1998). Na elektroporacijo vplivajo tudi številni fizikalni dejavniki: temperatura, prevodnost elektroporacijo vplivajo tudi številni fizikalni dejavniki: temperatura, prevodnost elektroporacijskega pufra, osmotski tlak in molekule za vnos (Rols in Teissié, 1990; Lebar in sod., 1998; Vernhes in sod., 1998; Lacković, 2003; Kandušer in sod., 2005; Miklavčič, 2005).

Prav tako, pa je uspešnost elektroporacije odvisna tudi od bioloških parametrov: tipa celic (velikost, oblika), narave membrane (mirovni membranski potencial, struktura in sestava membrane, fluidnost membrane), popolnosti citoskeleta, celične stene pri bakterijah, kvasovkah ali rastlinskih celicah) in rastnega stanja celic (Rols in Teissié, 1990; Wolf in sod., 1994; Vernhes in sod., 1998; Lebar in Miklavčič, 2001; Miklavčič, 2005; Kandušer in Miklavčič, 2009).

V primeru tkiv pa na električne lastnosti vplivajo še: anizotropija, vsebnost vode, lokalna raznolikost tkiva in tkivna patologija (tumorji) (Lacković, 2003).

#### 2.6.1 Parametri električnega polja

Elektropermeabilizacija celic je odvisna od parametrov električnega polja (Rols in Teissié, 1990). Parametri električnega polja pa so močno odvisni od biotehnološke oz. biomedicinske aplikacije (Miklavčič, 2005).

Geometrija elektrod skupaj z lastnostmi celic določajo potrebno izhodno moč in energijo generatorja električnih pulzov oziroma elektroporatorja. Ta energija je določena z napetostjo, tokom in trajanjem pulza ter številom pulzov (Miklavčič, 2005). Pri jakostih električnega polja nad prvo pražno vrednostjo opazimo prepustnost membrane celice na strani anode. Ta asimetrija ni odvisna od koncentracije ali narave barvila, ionske jakosti pufra ali trajanja pulza (Gabriel in Teissié, 1997; Teissié in sod., 1999). Čas okrevanja membrane celic sesalcev tudi ni odvisen od razdalje med elektrodama (Golzio in sod., 1998). Najpomembnejši parametri električnega polja so: amplituda oziroma jakost

električnega polja, dolžina, število in frekvenca pulzov (Rols in Teissié, 1990; Wolf in sod., 1994; Gabriel in Teissié, 1995; Vernhes in sod., 1999; Maček-Lebar in sod., 1998; Lebar in Miklavčič, 2001; Bilska in sod., 2000; Canatella in sod., 2001; Kandušer in Miklavčič, 2009).

V splošnem velja, da naj bi bila, za uspešno elektropermeabilizacijo, jakost električnega polja od 200 - 2000 V/cm in dolžina pulza od stotine us za majhne molekule ter od nekaj ms do nekaj deset ms za makromolekule (Miklavčič, 2005). Pri uporabi 10 pulzov dolžine 100 µs in jakosti električnega polja 1000 V/cm je prepustnost pritrjenih CHO celic 100 % (Teissié in Rols, 1993).

Najpomembnejši parameter za elektroporacijo je amplituda pulzov oziroma jakost električnega polja (Pavlin in sod., 2006). Višja jakost električnega polja pomeni uspešnejšo elektropermeabilizacijo, torej je elektropermeabiliziranih več celic, manjše pa je preživetje celic, saj je prisoten večji delež celic, katerih membrana ne okreva več popolnoma. Učinkovitost elektroporacije je višja predvsem zaradi večjega deleža elektropermeabiliziranih manjših celic in večjega elektropermeabiliziranega dela celične membrane, torej dela membrane, v katerem pride do strukturnih sprememb (delež dolgoživih por je večji). To pa posledično pomeni tudi večji vnos snovi (Gabriel in Teissié, 1995; Gabriel in Teissié, 1997; Teissié in sod., 1999; Lebar, 1999; Teissié, 2003). Hitrost okrevanja membrane je v veliki meri odvisna od uporabljenega polja, vendar kljub temu čas okrevanja membrane ni funkcija jakosti polja (Djuzenova in sod., 1996; Golzio in sod., 1998; Rols in Teissié, 1998; Teissié in sod., 1999; Golzio in sod., 2000; Teissié, 2003; Teissié in sod., 2005; Pavlin in sod., 2006; Pavlin in Miklavčič, 2008).

Delež permeabiliziranih celic je večji tudi pri uporabi daljših pulzov ali večjega števila pulzov, saj med življenjsko dobo in številom oziroma dolžino pulzov obstaja linearna povezava (Rols in Teissié, 1990; Wolf in sod., 1994; Gabriel in Teissié, 1995; Lebar in sod., 1998; Rols in Teissié, 1998; Lebar in Miklavčič, 2001; Teissié, 2003; Kotnik in sod., 2005; Pavlin in Miklavčič, 2008; Pucihar in sod., 2008; Kandušer in Miklavčič, 2009).

Dolžina posameznega pulza je kritičen parameter za vnos makromolekul v CHO celice. Vnos PI opazimo že pri uporabi pulzous dolžine (Rols in Teissié, 1998). Od dolžine pulzov pa je odvisno tudi okrevanje membrane celic. Ob uporabi daljših pulzov je čas okrevanja membran daljši (Rols in Teissié, 1990; Wolf in sod., 1994; Golzio in sod., 2000).

Dolgožive pore so tudi pod vplivom števila pulzov. Vsak naslednji pulz poveča verjetnost za tvorbo dolgoživih por, torej je elektroporacija bolj uspešna pri večjem številu pulzov (Pavlin in Miklavčič, 2008). Ravno tako je od števila pulzov odvisno okrevanje membrane. Ob uporabi večjega števila pulzov je konstanta hitrosti okrevanja manjša (Rols in Teissié, 1990; Golzio in sod., 2000).

Ob uporabi vlaka pulzov pa opazimo kumulativni učinek (Rols in Teissié, 1998). Kinetika okrevanja je podobna ne glede na dolžino pulza, če je skupna dolžina pulzov vedno enaka (Golzio in sod., 1998; Rols in Teissié, 1998; Vernhes in sod., 1998; Teissié in sod., 1999; Golzio in sod., 2000; Teissié, 2003; Teissié in sod., 2005).

Pri konstantnem številu in dolžini pulzov je vnos molekul močno pod vplivom časa med pulzi. Z večanjem frekvence se zmanjša učinkovitost elektropermeabilizacije za PI. Frekvenca vpliva tudi na preživetje celic (Rols in Teissié, 1998). Povečanje frekvence pomeni zmanjšanje preživetja celic, ker membrana ne uspe okrevati (Vernhes in sod., 1998; Rols in sod., 2009). Celično preživetje in učinkovitost elektroporacije sta optimalni v frekvenčnem razredu od 0,5 do 10 Hz (Vernhes in sod., 1999; Pucihar in sod., 2002; Pavlin in sod., 2005; Kandušer in Miklavčič, 2009).

#### 2.6.2 Fizikalni parametri

#### 2.6.2.1 Temperatura

Temperatura vpliva na fluidnost membrane in posledično ima tudi učinek na fiziologijo in metabolizem celic, ne vpliva pa na morfologijo ali velikost celic. Vpliva tudi na elektroporacijo, ki pa ni termalni pojav, torej ne spremeni temperature celic. Temperatura verjetno ne deluje na elektroporacijo s spremembo fluidnosti (Lebar in sod., 1998); (Lebar, 1999); (Kandušer in sod., 2008); (Kandušer in Miklavčič, 2009).

Reverzibilnost elektroporacije oziroma čas okrevanja je močno kontrolirana z inkubacijsko temperaturo po aplikaciji pulzov (Djuzenova in sod., 1996; Rols in Teissié, 1998; Teissié in Ramos, 1998; Teissié in sod., 1999; Teissié, 2003; Teissié in sod., 2005; Pavlin in sod., 2006).

Okrevanje membran elektroporiranih različnih vrst celic inkubiranih pri sobni temperaturi, se začne takoj po elektropermeabilizaciji, poteka zelo hitro in izgine spontano s časom (Rols in Teissié, 1990); (Djuzenova in sod., 1996). Pri 21°C in pri ustreznih parametrih električnega polja ostanejo CHO celice prepustne nekaj minut. Celice hitro okrevajo in postanejo znova neprepustne (Rols in Teissié, 1989). Tako krivulje okrevanja elektroporiranih celičnih membran kažejo 100 % okrevanje celic po 20 minutah inkubacije pri sobni temperaturi (Gabriel in Teissié, 1995; Teissié in Ramos, 1998).

Višje inkubacijske temperature pospešijo proces okrevanja, medtem ko nižje temperature upočasnjujejo ta proces, saj podaljšajo čas obstoja struktur v membrani, ki omogočajo zlivanje in omejijo učinke Joulove toplote (Neumann in sod., 1998; Neamtu in sod., 1999; Teissié in sod., 1999; Teissié, 2003; Trontelj, 2005).

Vnos snovi v celico je najboljši, če so celice pred izpostavitvijo električnemu polju pri temperaturi mešanice vode in ledu (4°C), saj lahko permeabilizirano stanje celic pri tej temperaturi ohranimo nekaj ur. Kljub temu, pa je po aplikaciji električnih pulzov

najprimernejša inkubacijska temperatura fiziološka temperatura (37°C), saj sta uspešnost elektropermeabilizacije in preživetje celic pri tej temperaturi največja (Djuzenova in sod., 1996; Lebar in sod., 1998; Lebar, 1999; Teissié in sod., 1999; Pavlin in sod., 2006; Kandušer in sod., 2008; Pavlin in Miklavčič, 2008; Kandušer in Miklavčič, 2009).

#### 2.6.2.2 Prevodnost in ionska jakost elektroporacijskega pufra

Ionska jakost elektroporacijskega pufra vpliva na uspešnost elektroporacije (Rols in Teissié, 1989; Djuzenova in sod., 1996; Pucihar in sod., 2001). Tako lahko npr. povečanje ionske jakosti pufra vodi v elektropermeabilizacijo membrane pri nižjih jakostih električnega polja (Rols in Teissié, 1989; Kandušer in Miklavčič, 2009). Ionska jakost vpliva na prepustnost membrane med samo uporabo pulzov, medtem ko med korakom inkubacije, torej po uporabi pulzov, ne vpliva na prepustnost membrane pritrjenih CHO celic (Rols in Teissié, 1989).

Sprememba ionske koncentracije v mediju lahko vpliva na preurejanje lipidnega dvosloja, kar lahko nato vodi v povečan vnos molekul kot je propidijev jodid (Cambrea in sod., 2007; Haberl in sod., 2010).

Stranski učinek električnih pulzov je tudi lokalizirano segrevanje membrane, ki je večje v visokoprevodnih kot nizkoprevodnih medijih. (Vernhes in sod., 1998; Lebar, 1999; Teissié in sod., 1999; Miklavčič, 2005; Kandušer in Miklavčič, 2009) Zato je v visokoprevodnih medijih poškodovanih več celic. Torej, sprememba prevodnosti medija vpliva na preživetje celic, ne vpliva pa na samo permeabilizacijo celic (Pucihar in sod., 2001; Trontelj, 2005; Kandušer in Miklavčič, 2009).

Če je električno polje prisotno v kratkih časovnih intervalih, se temperatura visokoprevodnih medijev dvigne približno za 1°C, temperatura nizkoprevodnih medijev pa še manj. Elektroporacija torej ni termalni pojav (Vernhes in sod., 1998; Lebar, 1999; Teissié in sod., 1999; Miklavčič, 2005; Kandušer in Miklavčič, 2009).

Pri celicah elektroporiranih pri enakih pogojih električnega polja in različnih ionskih jakostih ni razlike v kinetiki okrevanja membrane (Golzio in sod., 1998; Rols in Teissié, 1998; Teissié in sod., 1999; Golzio in sod., 2000; Teissié, 2003; Teissié in sod., 2005).

Okrevanje membran pritrjenih CHO celic po elektroporaciji z enakimi električnimi pogoji (10 pulzov dolžine 100s) in ob uporabi različnih ionskih jakosti se po 5 minutah inkubacije pri 21°C še ne zaključi, vendar pa se popolnoma zaključi v naslednjih 60 minutah (Rols in Teissié, 1989).

#### 2.6.2.3 Osmotski tlak

CHO celice v suspenziji imajo povprečni premer 12, $\mu$ m , ki je pod vplivom sprememb osmotskega tlaka pufra. Celice v izotoničnem pufru ne spremenijo svoje velikosti. Z

znižanjem osmolarnosti pufra pa se prostornina CHO celic poveča (premer 15,4 μm) oziroma celice nabreknejo, s povečanjem osmolarnosti pufra (hipertonični pufer) pa se leta zmanjša. Do teh sprememb pride v nekaj s po spremembi osmotskega tlaka. CHO celice v hipotoničnem pufru dosežejo njihovo maksimalno velikost po približno 2 minutah inkubacije (Golzio in sod., 1998; Teissié, 2003; Trontelj, 2005; Ušaj in sod., 2009).

Celice imajo regulatorni mehanizem s katerim uravnavajo spremembo prostornine pri različnih osmotskih pogojih. Če v pufru uporabimo kot glavni osmolit disaharid, se celice odzoveo regulatorno z zmanjšanjem prostornine, medtem ko je to ob uporabi monosaharidov inhibirano. Celice v hipotoničnem mediju se sčasoma povrnejo v prvotno stanje ne glede na še vedno prisoten hipotonični medij. Na ta način lahko CHO celice hitro (10-20 minut) zmanjšajo svojo prostornino (Golzio in sod., 1998; Ušaj in sod., 2009).

Elektroporacija pa to regulatorno zmanjšanje prostornine popolnoma inhibira. Elektroporacija sama po sebi povzroči tudi nabrekanje celic, zaradi vdora vode v celice. Celični premer se v primeru elektroporacije poveča enako (za 30 %) v hipoosmolarnih in izoosmolarnih pogojih (Golzio in sod., 1998; Teissié, 2003; Trontelj, 2005).

Nižji osmotski tlak oziroma hipotoničnost pufra pomeni zmanjšanje nagubanosti membrane in zmanjšanje potrebne jakosti električnega polja za elektroporacijo, kar vodi v učinkovitejšo elektropermeabilizacijo. Tako je npr. vnos  $\beta$ -galaktozidaze povečan v hipoosmolarnem pufru. Osmotski tlak močno vpliva na pragovno vrednost jakosti zunanjega električnega polja pritrjenih celic, saj je ta vrednost bistveno večja pri višjem osmotskem tlaku. Nižji je osmotski tlak, učinkovitejša je elektropermeabilizacija pritrjenih celic. Učinkovitost permeabilizacije pritrjenih celic je odvisna samo od osmotskega tlaka med aplikacijo električnih pulzov in ne od osmotskega tlaka pred aplikacijo ali po njej. Na celice v suspenziji ima osmotski tlak podoben vpliv, le nadpražna vrednost jakosti zunanjega električnega polja naj bi bila neodvisna od osmotskega tlaka (Rols in Teissié, 1990; Lebar in sod., 1998; Golzio in sod., 1998; Lebar, 1999; Golzio in sod., 2000; Kandušer in Miklavčič, 2009; Ušaj in sod., 2010).

Korak okrevanja pa je odvisen od osmolarnosti, saj je okrevanje v hipoosmolarnem pufru počasnejše kot v izoosmolarnem (Djuzenova in sod., 1996; Teissié in sod., 1999; Pavlin in sod., 2006; Pucihar in sod., 2007; Pavlin in Miklavčič, 2008; Kandušer in Miklavčič, 2009).

Prav tako je preživetje celic v močno hipoosmolarnih medijih zelo slabo (Trontelj, 2005). Saj hipotonični pufer povzroči izgubo ionov in organskih osmolitov, produkcijo reaktivnih kisikovih spojin (ROS), reorganizacijo citoskeleta in spremembe encimske aktivnosti (Lambert, 2007; Ušaj in sod., 2010).

#### 2.6.3 Biološki parametri

Ob uporabi enakih parametrov električnega polja se različne celične linije različno odzivajo. Posledica teh bioloških razlik med celičnimi linijami so tudi časovne razlike v okrevanju membran celic (Kandušer in sod., 2005).

Okrevanje membrane celic v celični suspenziji je odvisno od gostote celic v suspenziji. Celice v bolj gostih suspenzijah okrevajo počasneje (Pucihar in sod., 2007).

#### 2.6.3.1 Fluidnost membrane

Fluidnost celične membrane je fizikalna značilnost, ki se spreminja s temperaturo in sestavo membrane (različni tipi membranskih domen). Spremembe fluidnosti in strukture domen vplivajo na elektroporacijo celic, vendar fluidnost nima velike vloge pri reverzibilni elektroporaciji, torej ne vpliva na fazo okrevanja. Z nižanjem temperature narašča urejenost domen in se zmanjšuje povprečna fluidnost, ravno tako se zmanjšuje tudi učinkovitost elektropermeabilizacije. Z manjšo urejenostjo domen ali večjo fluidnostjo membrane pa se učinkovitost elektropermeabilizacije povečuje (Golzio in sod., 1998; Golzio in sod., 2000; Kandušer in sod., 2005; Kandušer in sod., 2008; Kandušer in Miklavčič, 2009).

Holesterol tudi nadzoruje prepustnost membrane in sicer z induciranjem konformacijskega reda lipidnih verig. Če so lipidi v fluidnem stanju, holesterol ne vpliva na elektroporacijo, če pa so lipidi v gel stanju, ima holesterol od doze odvisen učinek (Raffy in Teissié, 1999).

#### 2.6.3.2 Citoskelet

Prepustnost celične membrane po elektroporaciji naj bi se povečala predvsem zaradi preurejanja lipidov. Vendar, stabilnost elektroporacije in dejstvo, da se prehodne prepustne strukture širijo s časom, govorijo o tem, da so v proces okrevanja membrane poleg lipidov vključene še druge membranske strukture, kot so membranski proteini in citoskelet. Tako so pokazali tudi rezultati <sup>31</sup>P NMR (jedrska magnetna resonanca; *angl. nuclear magnetic resonance*) spektroskopije (Rols in Teissié, 1990; Gabriel in Teissié, 1995; Golzio in sod., 1998; Rols in Teissié, 1998; Vernhes in sod., 1998; Teissié in Ramos, 1998; Neamtu in sod., 1999; Teissié in sod., 1999; Golzio in sod., 2000; Teissié, 2003; Teissié in sod., 2005; Kandušer in Miklavčič, 2009).

Celični citoskelet je zelo dinamična struktura. Sestavljen je iz aktinskih filamentov, mikrotubulov in intermediarnih filamentov. Odgovoren je za ohranjanje oblike celice in gibljivost. Čeprav elektroporacija igra vlogo pri organizaciji citoskeletnih filamentov, ne vodi v degradacijo citoskeletnih proteinov (Lipowsky in Sackmann, 1995; Doherty in McMahon, 2008; Kandušer in Miklavčič, 2009).

Tubulin (mikrotubuli) igra pomembno vlogo pri elektroporaciji in elektrofuziji. Tako npr. kolhicin in citohalazin B, ki inhibirata polimerizacijo mikrotubulov in mikrofilamentov, povzročita pomembne spremembe predvsem v koraku okrevanja por (Neamtu in sod., 1999). Koraka nastanka por in ekspanzije nista pod vplivom integritete citoskeleta, medtem ko je korak okrevanja pod vplivom integritete citoskeleta. Do razpada citoskeleta pride takoj po elektroporaciji in okrevanje citoskeleta nato poteka 1 uro (Blangero in sod., 1989; Rols in Teissié, 1992; Kanthou in sod., 2006; Kandušer in Miklavčič, 2009). V pufrih s podobno ionsko sestavo kot jo ima citoplazma, pa je razpad citoskeleta celo preprečen (Harkin in Hay, 1996).

Okrevanje membran pri celicah, katerih citoskelet je poškodovan, je veliko hitrejše (Harkin in Hay, 1996). Če poškodujemo celični skelet, bodisi kemično ali s temperaturnim šokom, postanejo dolgožive spremembe v strukturi membrane nestabilne. Posledica temperaturnega šoka je dvig praga električne poljske jakosti za elektroporacijo in nastanek le kratkoživih strukturnih sprememb v celični membrani. Snovi, ki poškodujejo mrežo spektrina in aktina, imajo na elektroporacijo podoben učinek, saj dolgožive strukturne spremembe izginejo prej kot v minuti. Torej termalna denaturacija spektrina, glavne komponente eritrocitnega citoskeleta, igra pomembno vlogo pri okrevanju por elektroporiranih eritrocitnih membran, saj pospeši okrevanje membrane (Lebar, 1999; Neamtu in sod., 1999).

Odziv pritrjenih celic na določene parametre električnega polja je lahko drugačen kot odziv celic v suspenziji, ravno zaradi citoskeleta, ki igra vlogo pri okrevanju membrane (Marjanovič in sod., 2010).

#### 2.6.3.3 Vpliv ATP

Proces okrevanja membrane celic (dolgoživih por) je kompleksen in aktiven biološki proces in je odvisen od metabolizma celic, torej od koncentracije ATP (Djuzenova in sod., 1996; Teissié in sod., 1999; Teissié, 2003; Pavlin in sod., 2006; Pavlin in Miklavčič, 2008; Golzio in sod., 2009).

Še en dokaz celične aktivnosti med procesom okrevanja je produkcija reaktivnih kisikovih spojin (ROS) na prepustnem delu membrane, saj so te prisotne samo med procesom okrevanja. Produkcija ROS je pod vplivom trajanja in števila pulzov za dano jakost polja in doseže vrh v nekaj s po pulzu ter se nato zmanjša. Kinetika zmanjšanja je podobna okrevanju membrane. ROS lahko vplivajo tudi na preživetje celic, saj poškodujejo membrano (peroksidacija membrane). Peroksidi inducirajo nagubanje membrane, kar je lahko izvor zavihkov membrane pri procesu elektroporacije (Gabriel in Teissié, 1995; Teissié in sod., 1999; Teissié, 2003; Teissié in sod., 2005).

Okrevanje membrane celic je kompleksen proces in je pod vplivom nivoja celičnega ATP (Teissié in sod., 1999; Teissié, 2003). Npr. povečanje števila ali dolžine pulzov lahko

povzročita povečano sproščanje molekul ATP iz celic (Rols in Teissié, 1990). Zato membrana CHO celic brez dostopnega celičnega ATP ne okreva in celice ostanejo prepustne za barvilo tripan modro še 30 minut po elektroporaciji (Teissié in sod., 1999).

Če pa elektropermeabiliziramo celice v pufru, ki vsebuje molekule ATP, se močno poveča gostota in dolžina mikrovilov, torej površina celice. To lahko verjetno pripišemo reorganizaciji dvosloja in ne biosintezi novih membranskih komponent (Teissié in sod., 1999).

2.6.3.4 Druge molekule in ioni

Pospešeno okrevanje membrane ali vsaj ponovno vzpostavitev barierne funkcije membrane lahko omogoči tudi prisotnost določenih površinsko aktivnih snovi (surfaktantov) (Nickoloff, 1995). Okrevanje močno pospešuje tudi kolhicin, saj polovica celic postane neprepustna za barvilo tripan modro v 2 minutah (Teissié in sod., 1999). PC (fosfatidilholin) in P188 (poloksamer 188) pa lahko pospešita okrevanje membrane kožnih celic (Burgess in sod., 2006).

Okrevanje celične membrane pa je inhibirano z obsevanjem z elektroni (Neamtu in sod., 1999).

Narava monovalentnih ionov Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> in Li<sup>+</sup> ne vpliva na samo elektroporacijo, saj npr. večji del izmenjave K<sup>+</sup> ionov poteka tudi v odsotnosti električnega polja. Medtem, ko prisotnost dvovalentnih Ca<sup>2+</sup> ionov v mediju vodi v celično lizo in smrt (Rols in Teissié, 1989; Kandušer in Miklavčič, 2009). Elektroporacija povzroči hiter vdor Ca<sup>2+</sup> v celice in s tem dvig njegove znotrajcelične koncentracije. Prisotnost Ca<sup>2+</sup> v celici je lahko toksična, zaradi prekinitve transportov vezanih na Ca<sup>2+</sup>, vendar je ta toksičnost neodvisna od same elektroporacije. Prisotnost Ca<sup>2+</sup> v mediju med elektroporacijo povzroča poškodbe različnih delov celic, zaradi nekontrolirane aktivacije od Ca<sup>2+</sup> odvisnih katabolnih encimov, razpada citoskeleta in fragmentacije DNK ter posledično celično lizo in smrt. Preživetje celic se zmanjša (Orrenius in sod., 1989; Lebar in Miklavčič, 2001; Kandušer in Miklavčič, 2009).

Okrevanje membrane pri sobni temperaturi poteka takoj po elektropermeabilizaciji in poteka razmeroma hitro, zlasti v prisotnosti nizkih koncentracij  $Ca^{2+}$  ionov. V prisotnosti  $Ca^{2+}$  ionov je končna vrednost vsebnosti propidijevega jodida v celicah nižja in dosežena veliko hitreje, kot če  $Ca^{2+}$  ioni v mediju niso prisotni, ravno zaradi hitrejšega okrevanja membrane celic (Djuzenova in sod., 1996; Golzio in sod., 2009).

Pomembno vlogo pri elektropermeabilizaciji igrajo tudi  $Mg^{2+}$  ioni. Višja koncentracija  $Mg^{2+}$  pomeni boljšo elektropermeabilizacijo za propidijev jodid in večje preživetje celic, vendar znižuje učinkovitost genske elektrotransfekcije (Golzio in sod., 2009; Haberl in sod., 2010).

#### **3** MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Kemikalije, raztopine in ostalo

- 70 % etanol (Pharmachem, Slovenija)
- antibiotik benzilpenicilin (Crystacillin, Pliva d.d., Hrvaška)
- antibiotik gentamicin sulfat (Gentamicin, Lek d.d., Slovenija)
- fetalni telečji serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- fiziološka raztopina 0,9% NaCl (B. Braun, Nemčija)
- gojišče F-12 HAM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) brez kalcija in magnezija (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- hipotonični elektroporacijski kalijev fosfatni pufer (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM saharoze, pH 7.2, 93 mOsm)
- izotonični elektroporacijski natrijev fosfatni pufer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM saharoze, pH 7.4, 260 mOsm)
- ovarijske celice kitajskega hrčka (European Collection of Cell Cultures, Velika Britanija)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- propidijev jodid Ex/Em: 535/617 nm (Invitrogen<sup>™</sup>, Velika Britanija)
- Trypsin-EDTA (5 g porcine tripsin / 2 g EDTA v 0,9 % NaCl Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)

#### 3.1.1 Laboratorijska oprema in aparature

- avtomatske pipete Research 20, 200, 1000 μl (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga Sigma 3K15 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Nemčija)
- centrifugirke 15, 50 ml (TPP, Švica)
- elektroporacijske kivete s 4 mm razmakom med Pt/Ir elektrodama (Eppendorf, Nemčija)
- mikro epruvete (Eppendorf, Nemčija)
- epT.I.P.S. tipsi za avtomatske pipete 2-200 μl in 50-1000 μl (Eppendorf, Nemčija)
- generator električnih pulzov Cliniporator (Igea, Italija)
- inkubator (WTB Binder, Nemčija)
- invertni mikroskop (Leica DM IL, ZDA)
- kivete s 4 mm razmakom med aluminijevima elektrodama
- laminarna vertikalna komora LFVP 9 (Iskra Pio d.o.o., Slovenija)
- mikrotiterske ploščice TC-test plates 24, 96 well (TPP, Švica)
- Neubauer hemocitometer

- orbitalni stresalnik Vibromix 114 (Tehtnica, Slovenija)
- petrijevke Ø150×20 mm (TPP, Švica)
- prenosni vakuumski aspirator EXAVAC (Vacutech d.o.o., Slovenija)
- Pt/Ir elektrode s 4 mm razmakom
- računalniški program i-control™ za uporabo spektrofluorometra (Tecan, Švica)
- računalniški program za obdelavo podatkov Microsoft Office Excel 2007
- rokavice PFE: Powder-Free Latex Exam Gloves (Kimberly-Clark, ZDA)
- rokavice Purple Nitrile: Powder-Free Nitrile Exam Gloves (Kimtech Science, Kimberly-Clark, ZDA)
- spektrofluorometer Infinite<sup>®</sup> M200 (Tecan, Avstrija)
- steklene pipete (5, 10, 25, 50 ml)
- vodna kopel Aqualine AL 2 (LAUDA, Nemčija)
- vpojne gaze 0,2 m<sup>2</sup> (Tosama d.d., Slovenija)

#### 3.2 METODE

Ker so bili vsi naši poizkusi osnovani na CHO celicah, smo morali vseskozi delati aseptično, saj smo s tem preprečili okužbe celic. Zato smo pred in tudi med samim delom razkužili delovno površino s 70 % etanolom.

#### 3.2.1 Priprava celične kulture

Za poizkuse smo uporabili celično linijo ovarijskih celic kitajskega hrčka (CHO; Chinese hamster ovary). Celice CHO smo gojili v petrijevkah z gojiščem F-12 HAM. Gojišču smo dodali 10 % fetalnega telečjega seruma, antibiotik benzilpenicilin in gentamicin sulfat ter 0,5 % L-glutamina. Celično linijo smo inkubirali v inkubatorju s 5 % CO<sub>2</sub> atmosfero in temperaturo 37°C.

Po 3 do 4 dneh, ko so celice dosegle logaritemsko fazo rasti, smo pred nadaljnjim delom, preverili pravilno rast celic z invertnim mikroskopom (4-kratna povečava). 15 minut pred uporabo tripsina smo dali le-tega iz hladilnika v vodno kopel na 37°C, da so encimi lahko začeli delovati. Med tem smo celice pripravili za tripsinizacijo. Odstranili smo gojišče s sterilno pipeto in prenosnim vakuumskim aspiratorjem ter sprali celice s fiziološko raztopino.

Nato smo vzeli pripravljen Trypsin-EDTA 10-krat redčen v HBSS in ga dodali k celicam. Prostornina tripsina je bila enaka polovici prostornine prvotnega gojišča. Po približno 1 do 3 minutah, ko je tripsin začel delovati, so se celice začele odlepljati s podlage. Da so se celice res odlepile od podlage, smo zagotovili z opazovanjem pod mikroskopom. Ko so se celice odlepile od podlage smo delovanje tripsina ustavili z dodatkom enake količine gojišča. Celice smo nato s pipeto spirali z dna petrijevke. Pazili smo, da smo pri tem ustvarili čim manj zračnih mehurčkov, saj smo se želeli izogniti skupkom celic. Iz petrijevke smo odpipetirali 10  $\mu$ l v hemocitometer in celice p**št**eli pod mikroskopom pri 10-kratni povečavi. Iz štirih kvadratkov smo izračunali povprečje preštetih celic. Tega smo nato pomnožili z 10<sup>4</sup> celic/ml. Tako smo dobili koncentracijo celic/ml v naši petrijevki.

Po naslednji enačbi smo izračunali še prostornino celic za prenos v centrifugirko, da smo dobili želeno koncentracijo celic:

$$V_{celic} = \frac{\check{st.}\check{z}elenih celic}{\check{st.} pre\check{s}tetih celic} \dots (2)$$

Pripravljene celice smo prenesli v primerno centrifugirko.

#### 3.2.2 Poizkus s pritrjenimi CHO celicami

V centrifugirko smo prenesli izračunano prostornino celic (enačba 2) in dodali manjkajočo prostornino gojišča, tako da smo na koncu dobili 25 ml celične suspenzije s koncentracijo 10<sup>5</sup> celic/ml.

Pred nasaditvijo celic v mikrotitersko ploščico s 24 razdelki, smo celice še dobro premešali z uporabo orbitalnega stresalnika. V vsak razdelek smo nato odpipetirali po 1 ml pripravljene celične suspenzije. Tako smo na mikrotiterski ploščici dobili 24 razdelkov s koncentracijo 10<sup>5</sup> celic/ml. Mikrotitersko ploščico smo nato 24 ur inkubirali v inkubatorju pri 37°C in atmosferi 5 % CO<sub>2</sub>, da so se celice lahko uspešno pritrdile na podlago.

Preden smo nato vzeli celice iz inkubatorja, smo si z uporabo orbitalnega stresalnika pripravili mešanico izotoničnega elektroporacijskega natrijevega fosfatnega pufra in propidijevega jodida (PI) v razmerju 10:1 za vseh 24 razdelkov. Pri delu s PI smo zaradi njegove kancerogenosti vedno uporabljali močnejše Purple Nitrile rokavice, ki so nam nudile dodatno zaščito. Prav tako smo PI zaradi njegove hlapnosti uporabljali le v laminariju.

Mikrotitersko ploščico s pritrjenimi celicami smo potem vzeli iz inkubatorja in nadaljevali s poizkusom. Iz vsakega razdelka smo s sterilno pipeto in prenosnim vakuumskim aspiratorjem odstranili gojišče ter dodali po 150 µl izotoničnega elektroporacijskega pufra. Po dodatku pufra smo celice v posameznem razdelku elektroporirali.

Elektroporacijo smo izvajali s pomočjo Pt/Ir elektrod s 4 mm razmakom med elektrodama in Cliniporator-jem, to je napravo za generiranje električnih pulzov. Uporabili smo naslednje parametre električnih pulzov: vlak 8 pulzov, dolžine 100 µs in napetosti 400 V (jakost električnega polja 1000 V/cm) ter ponavljajočo frekvenco pulzov 1 Hz.



Slika 4: Cliniporator - generator električnih pulzov.

Po elektroporaciji smo celice inkubirali pri sobni temperaturi (21 - 24°C) 5, 10, 20 in 30 minut. Po vsakem od naštetih časovnih intervalov smo izotonični elektroporacijski pufer v razdelkih zamenjali s 165  $\mu$ l prej omenjene **šan**ice izotoničnega elektroporacijskega pufra in barvila PI. Po dodatku barvila smo celice inkubirali pri sobni temperaturi še dodatne 3 minute, da je barvilo lahko prešlo skozi pore v membrani celic v celice, kjer se je vezalo na celično DNK in da so membrane lahko okrevale. Po 3 minutah smo zamenjali mešanico barvila in izotoničnega elektroporacijskega pufra z 1 ml izotoničnega elektroporacijskega pufra.

Sledilo je merjenje intenzitete fluorescence PI s pomočjo spektrofluorometra in računalniškega programa i-control<sup>™</sup>. Ekscitacijska valovna dolžina barvila PI je 535 nm, emisijska valovna dolžina pa 617 nm, zato smo meritve opravili pri teh dveh valovnih dolžinah.

Za vsak poizkus smo opravili tudi negativno (NK) in pozitivno kontrolo (PK). Negativno kontrolo smo izvedli po prej opisanem postopku, le da celic nismo elektroporirali in inkubirali pri sobni temperaturi. Torej smo le dodali mešanico z barvilom PI in počakali 3 minute ter nato izmerili fluorescenco. Pri negativni kontroli se viabilne celice niso obarvale, saj barvilo PI ne more prosto prehajati skozi celično membrano živih celic. Pozitivno kontrolo pa smo tudi opravili na prej opisan način, tako da smo celice

elektropermeabilizirali ( $8 \times 100 \ \mu$ s, 400 V, 1 Hz), a jih nismo dodatno inkubirali pri sobni temperaturi v prej omenjenih časovnih intervalih. Pozitivna kontrola nam je predstavljala obarvanje vseh celic (viabilnih in neviabilnih).

Odstotek permeabilizacije smo izračunali tako, da smo od intezitete fluorescence elektroporiranih celic odšteli intenziteto fluorescence negativne kontrole (NK) in to delili z razliko med intezitetama fluorescence pozitivne (PK) ter negativne kontrole (NK). Dobljeni rezultat smo nato pretvorili v odstotek permeabiliziranih celic (enačba 3). Rezultat odstotka celic katerih membrane je okrevala pa smo nato dobili, če smo od 100 % odšteli odstotek permeabiliziranih celic (enačba 4).

permeabilizacija [%] = 
$$\frac{(\text{fluor. elektroporiranih celic}) - (\text{fluor. NK})}{(\text{fluor. PK}) - (\text{fluor. NK})} \times 100$$
 ...(3)

Vsako meritev smo opravili v 4 paralelnih razdelkih in vsak poizkus smo ponovili trikrat ob različnih dnevih. S spremljanjem privzema PI, smo torej lahko določili okrevanje membrane pritrjenih CHO celic pri sobni temperaturi, tako da smo iz pridobljenih podatkov izračunali delež CHO celic, katerih membrana je okrevala po elektroporaciji. Rezultate pa smo nato predstavili kot povprečne vrednosti teh poizkusov  $\pm$  standardni odklon.

Celoten poizkus je trajal približno uro in pol, kar pri sobni temperaturi še zagotavlja preživetje celic. Spremljanje negativne kontrole pa nam je omogočilo tudi spremljanje preživetja celic.

#### 3.2.3 Poizkus s celicami v suspenziji

Podoben postopek smo uporabili tudi pri CHO celicah v suspenziji. S pomočjo že prej opisane enačbe 2 smo v centrifugirki pripravili suspenzijo CHO celic, le da smo v tem primeru uporabili koncentracijo  $5 \times 10^6$  celic/ml.

Celično suspenzijo iz centrifugirke smo enakomerno razdelili v mikro epruvete, ki smo jih nato centrifugirali 5 minut pri 4°C in 1225 obratih/min. Tako smo celice ločili od gojišča in tripsina. Ohlajene mikro epruvete s celicami smo med poizkusom hranili pri 4°C.

Posamezni mikro epruveti s celicami smo nato odstranili supernatant, z avtomatsko pipeto dodali 270  $\mu$ l ektroporacijskega pufra in resuspendirali usedlino celic. Ker smo želeli opazovati okrevanje membrane suspendiranih CHO celic v odvisnosti od toničnosti pufra (izotonični in hipotonični pufer), smo kot izotonični medij uporabili že prej omenjen natrijev fosfatni pufer, kot hipotonični medij pa kalijev fosfatni elektroporacijski pufer. Posledica uporabe hipotoničnega pufra je povečan vstop vode v celice in nabrekanje celic.

Resuspendirane celice smo nato prenesli iz mikro epruvete v elektroporacijsko kiveto s 4 mm razmakom med aluminijevima elektrodama in jih s pomočjo Cliniporator-ja elektroporirali.

Ker so CHO celice v suspenziji manjše (manjši radij) od pritrjenih CHO celic smo ob upoštevanju Schwanove enačbe (enačba 1), za uspešno elektropermeabilizacijo celic, uporabili večji amplitudi električnih pulzov (560 in 640 V) oziroma jakosti električnega polja 1400 V/cm in 1600 V/cm. Ostali parametri električnih pulzov so ostali enaki kot pri elektroporaciji pritrjenih celic (8×100 µs, 1 Hz).

Elektroporirane celice smo nato inkubirali pri sobni temperaturi (21 - 24°C) 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 in 30 minut. Po končani inkubaciji smo dodali še 30  $\mu$ l PI (razmerje celične suspenzije in PI je 10:1), dobro premešali in inkubirali še 3 minute. Na mikrotitersko ploščico s 96 razdelki smo razdelili po 50  $\mu$ l mešanice na razdelek. Po 3 minutah inkubacije s PI smo izmerili intenziteto fluorescence PI s pomočjo spektrofluorometra in programa i-control<sup>TM</sup>.

Na enak način kot pri poizkusu na pritrjenih CHO celicah, smo tudi za suspendirane CHO celice opravili negativno in pozitivno kontrolo.

Vse meritve smo opravili v 4 paralelnih razdelkih in vsak poizkus smo ponovili trikrat ob različnih dnevih. S spremljanjem privzema PI in izračunom deleža CHO celic, katerih membrana je okrevala (na enak način kot pri pritrjenih celicah), smo lahko določili okrevanje membrane CHO celic v suspenziji pri sobni temperaturi v izotoničnem in hipotoničnem mediju pri dveh različnih jakostih električnega polja (1400 in 1600 V/cm). Vse rezultate smo nato predstavili kot povprečne vrednosti teh poizkusov  $\pm$  standardni odklon.

#### **4 REZULTATI**

Vsi rezultati so bili pridobljeni v Infrastrukturnem centru MRIC Laboratorija za biokibernetiko na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani.

#### 4.1 OKREVANJE MEMBRANE PRITRJENIH CHO CELIC

Okrevanje (celjenje) membrane elektroporiranih pritrjenih CHO celic v izotoničnem pufru (parametri električnega polja: 8×100µs, 1 Hz, 400 V oz. jakost elek**čn**ega polja 1000 V/cm) smo spremljali po 5, 10, 20 in 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi. Na podlagi treh ponovitev poizkusa smo izračunali povprečni delež celic, katerih membrana je okrevala, skupaj s pripadajočim standardnim odklonom. Za primerjavo povprečnih vrednosti deleža zaceljenih celic smo uporabili statistični Studentov t-test . Rezultate primerjav smo podali v obliki vrednosti percentilnega ranga Studentovega t-testa s 95 % intervalom zaupanja.



Slika 5: Graf prikazuje okrevanje membrane pritrjenih CHO celic po elektroporaciji pri sobni temperaturi v izotoničnem pufru pri parametrih električnega polja:  $8 \times 100 \,\mu$ s, 1 Hz, 400 V (1000 V/cm). Vsaka točka na sliki predstavlja srednjo vrednost treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija.

Iz Slike 5 je razvidno, da je po elektroporaciji in 5 minutah inkubacije pri sobni temperaturi, membrana okrevala že pri približno 70 % pritrjenih CHO celic. Podobno opazimo tudi po 10 minutah inkubacije. Odstotek zaceljenih celic pa je po 20 minutah

inkubacije pri sobni temperaturi nižji in znaša približno 65 %. Po 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi pa so okrevale že skoraj vse celice, saj je delež celic, katerih membrana je popolnoma okrevala, približno 90 %.

Po statistični primerjavi rezultatov deležev zaceljenih celic po 20 in 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi ugotovimo statistično značilno razliko (P<0,1). Ostali rezultati ne kažejo statistično značilnih razlik (P>0,1).

#### 4.2 OKREVANJE MEMBRANE CHO CELIC V SUSPENZIJI

Okrevanje membrane elektroporiranih CHO celic v suspenziji smo spremljali po 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 in 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi v izotoničnem in hipotoničnem pufru in pri dveh amplitudah električnih pulzov (560 in 640 V) oziroma dveh jakostih električnega polja (1400 in 1600 V/cm) (8×100  $\mu$ s, 1 Hz). Povprečni delež celic z zaceljeno membrano, skupaj s pripadajočim standardnim odklonom, smo izračunali na podlagi treh ponovitev poizkusa. Za primerjavo povprečnih vrednosti deleža zaceljenih celic smo uporabili statistični Studentov t-test . Rezultate primerjav smo podali v obliki vrednosti percentilnega ranga Studentovega t-testa s 95 % intervalom zaupanja.

# 4.2.1 Okrevanje membrane pritrjenih in suspendiranih CHO celic v izotoničnem mediju

Na Sliki 6 je prikazana primerjava okrevanja (celjenja) membran elektroporiranih pritrjenih in suspendiranih CHO celic inkubiranih po 5, 10, 20 in 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi v izotoničnem pufru.



Zupančič Č. Okrevanje membrane CHO celic po elektroporaciji pri sobni temperaturi ... pufru. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

Slika 6: Graf prikazuje okrevanje membrane pritrjenih in suspendiranih CHO celic po elektroporaciji pri sobni temperaturi v izotoničnem pufru. Parametri električnih pulzov:  $8 \times 100 \mu$ s, 1 Hz in 1000 V/cm za pritrjene celice (•) ter 1400 (•) in 1600 V/cm (▲) za suspendirane celice. Vsaka točka na sliki predstavlja srednjo vrednost treh poizkusov ± standardna deviacija.

Na Sliki 6 vidimo, da je po 5 minutah inkubacije pri sobni temperaturi membrana okrevala pri približno 70 % pritrjenih CHO celic in pri več kot 80 % suspendiranih celic. Po 10 minutah inkubacije se je razlika med odstotkom zaceljenih pritrjenih in suspendiranih celic povečala, saj je membrana okrevala pri približno 70 % pritrjenih CHO celic in pri približno 95 % suspendiranih CHO celic. Ta razlika je statistično značilna (P<0,1). Po 20 minutah rezultat ni bistveno drugačen (P<0,1). Po 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi, pa se je ta razlika zmanjšala, saj je membrana okrevala pri približno 90 % pritrjenih CHO celic, medtem ko se delež zaceljenih CHO celic v suspenziji ni bistveno spremenil (P>0,1).

### 4.2.2 Okrevanje membrane suspendiranih CHO celic v izotoničnem in hipotoničnem pufru

Želeli smo preveriti vpliv toničnosti elektroporacijskega pufra na okrevanje membrane elektroporiranih CHO celic v suspenziji po 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 in 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi v izotoničnem in hipotoničnem elektroporacijskem pufru. Povprečni delež celic, katerih membrana je okrevala, skupaj s pripadajočim standardnim odklonom, smo izračunali na podlagi treh ponovitev poizkusa. Za primerjavo povprečnih vrednosti deleža zaceljenih celic smo uporabili statistični Studentov t-test. Rezultate primerjav smo

podali v obliki vrednosti percentilnega ranga Studentovega t-testa s 95 % intervalom zaupanja.

Na Sliki 7 so prikazani rezultati okrevanja membrane suspendiranih CHO celic v izotoničnem in hipotoničnem pufru po elektroporaciji z električnim poljem jakosti 1400 V/cm ( $8 \times 100 \ \mu s$ , 1 Hz).



Slika 7: Graf prikazuje okrevanje membrane CHO celic v suspenziji po elektroporaciji 1400 V/cm ( $8 \times 100 \ \mu$ s, 1 Hz) pri sobni temperaturi v izotoničnem in hipotoničnem pufru. Vsaka točka na sliki predstavlja srednjo vrednost treh poizkusov ± standardna deviacija.

Na Sliki 7 vidimo, da je po 1 minutni inkubaciji pri sobni temperaturi delež celic, katerih membrana je okrevala, v obeh medijih približno 45 %. Po 2 minutah inkubacije se je ta delež v obeh pufrih povečal na približno 60 %. Po 3 minutah inkubacije opazimo, da je membrana popolnoma okrevala pri približno 70 % celic, ne glede na vrsto uporabljenega pufra. Ta delež se po 4 minutah inkubacije še poveča za nekaj odstotkov in znaša približno 75 %. Po 5 minutah je zaceljenih že približno 80 % celic v izotoničnem in hipotoničnem elektroporacijskem pufru. Razlike v okrevanju celic v izotoničnem in hipotoničnem pufru po 5 minutah inkubacije ne opazimo (P>0,1).

Po 10 minutah inkubacije pri sobni temperaturi je membrana okrevala že skoraj pri vseh celicah v obeh medijih, saj je delež teh celic približno 95 %. Rezultat ni bistveno drugačen

po 20 in 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi, saj vidimo, da odstotek vseskozi ostaja približno enak, torej je membrana okrevala že skoraj pri vseh celicah, ne glede na vrsto uporabljenega pufra.

Po statistični primerjavi vseh rezultatov, ki smo jih dobili po elektroporaciji s poljem jakosti 1400 V/cm pri obeh pufrih ugotovimo, da se rezultati med seboj statistično ne razlikujejo (P>0,1).

Na Sliki 8 imamo prikaz rezultatov okrevanja membrane suspendiranih CHO celic v izotoničnem in hipotoničnem pufru po elektroporaciji z električnim poljem jakosti 1600 V/cm ( $8 \times 100 \ \mu s$ , 1 Hz).



Slika 8: Graf prikazuje okrevanje membrane CHO celic v suspenziji po elektroporaciji 1600 V/cm ( $8 \times 100 \mu$ s, 1 Hz) pri sobni temperaturi v izotoničnem in hipotoničnem pufru. Vsaka točka na sliki predstavlja srednjo vrednost treh poizkusov ± standardna deviacija.

Iz Slike 8 je razvidno, da je po 1 minutni inkubaciji pri sobni temperaturi odstotek celic, katerih membrana je okrevala, po elektroporaciji z električnim poljem jakosti 1600 V/cm, v obeh pufrih približno 40 %. Za celice v izotoničnem pufru je ta odstotek še rahlo višji in znaša skoraj 45 %. Po 2 minutah opazimo, da je ta odstotek približno 50 %, ne glede na toničnost uporabljenega pufra. Delež celic katerih membrana je popolnoma okrevala se vztrajno dviguje s časom inkubacije pri sobni temperaturi. Tako lahko vidimo, da je

odstotek le-teh po 3 minutah še višji, in sicer približno 60 % za celice v obeh pufrih, po 4 minutah pa je odstotek zaceljenih celic inkubiranih v hipotoničnem pufru približno 65 % in približno 75 % v izotoničnem pufru. Po 5 minutah inkubacije v hipotoničnem pufru, delež celic katerih membrana je popolnoma okrevala, doseže približno 75 % in delež celic v izotoničnem pufru približno 80 %.

Po 10 minutah inkubacije pri sobni temperaturi je membrana okrevala že skoraj pri vseh celicah v obeh medijih, saj je delež teh celic višji od 90 %. Rezultat ni bistveno drugačen po 20 in 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi, saj vidimo, da odstotek ostaja približno enak, torej je membrana okrevala že skoraj pri vseh celicah, ne glede na vrsto uporabljenega pufra.

Po statistični primerjavi vseh rezultatov, ki smo jih dobili po elektroporaciji s poljem jakosti 1600 V/cm pri obeh pufrih ugotovimo, da se rezultati med seboj statistično ne razlikujejo (P>0,1).

Pri obeh jakostih električnega polja (1400 V/cm in 1600 V/cm) opazimo popolno okrevanje membrane celic po elektroporaciji že po 10 minutah inkubacije pri sobni temperaturi, ne glede na uporabljeno toničnost elektroporacijskega pufra (Slika 7 in 8). Po 20 in 30 minutah inkubacije se rezultat bistveno ne spremeni, saj je delež zaceljenih celic v obeh primerih, približno 95 %.

# 4.2.3 Okrevanje membrane suspendiranih CHO celic po elektroporaciji z jakostima električnega polja 1400 in 1600 V/cm

Želeli smo preveriti še vpliv dveh različnih amplitud električnih pulzov (560 in 640 V) oziroma dveh jakosti električnega polja (1400 in 1600 V/cm) na okrevanje membrane elektroporiranih CHO celic v suspenziji po 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 in 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi v izotoničnem in hipotoničnem elektroporacijskem pufru. Povprečni delež celic, katerih membrana je okrevala, skupaj s pripadajočim standardnim odklonom, smo izračunali na podlagi treh ponovitev poizkusa. Za primerjavo povprečnih vrednosti deleža zaceljenih celic smo uporabili statistični Studentov t-test . Rezultate primerjav smo podali v obliki vrednosti percentilnega ranga Studentovega t-testa s 95 % intervalom zaupanja.

Slika 9 prikazuje okrevanje membrane suspendiranih CHO celic v izotoničnem pufru.



Slika 9: Graf prikazuje okrevanje membrane CHO celic v suspenziji po elektroporaciji 1400 in 1600 V/cm (8×100  $\mu$ s, 1 Hz) pri sobni temperaturi v izotoničnem pufru. Vsaka točka na sliki predstavlja srednjo vrednost treh poizkusov ± standardna deviacija.

Na Sliki 9 vidimo, da je po 1 minutni inkubaciji pri sobni temperaturi v izotoničnem pufru, delež celic katerih membrana je okrevala, pri obeh jakostih električnega polja približno 45 %. Pri celicah elektroporiranih z električnim poljem jakosti 1400 V/cm je ta odstotek rahlo višji in znaša približno 50 %. Po 2 minutah inkubacije se je ta delež povečal na 50 % pri uporabljeni jakosti električnega polja 1600 V/cm in približno na 60 % za celice elektroporirane s poljem jakosti 1400 V/cm. Po 3 minutah opazimo, da je membrana popolnoma okrevala kar pri 60 % celic pri jakosti električnega polja 1600 V/cm in približno pri 70 % celic elektroporiranih s poljem jakosti 1400 V/cm. V prvih 3 minutah vidimo razliko med celicami elektroporiranimi pri dveh različnih jakostih električnega polja. Ta razlika je statistično značilna (P<0,1). Delež celic, katerih membrana je okrevala, je višji po elektroporaciji z električnim poljem jakosti 1400 V/cm.

Delež celic, katerih membrana je popolnoma okrevala, se po 4 minutah še poveča za nekaj dodatnih odstotkov in znaša približno 75 %. Po 5 minutah se ta delež ustavi pri približno 80 %. Večje razlike med celicami pri obeh jakostih električnega polja po 4 in 5 minutah inkubacije ne opazimo (P>0,1).

Po 10 minutah inkubacije pri sobni temperaturi je membrana okrevala že skoraj pri vseh celicah pri obeh uporabljenih jakostih, saj je delež teh celic približno 95 %. Rezultat ni

bistveno drugačen po 20 in 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi, saj vidimo, da se ta delež giblje okoli 95 % (P>0,1).



Slika 10 prikazuje rezultate okrevanje CHO suspendiranih celic v hipotoničnem pufru.

Slika 10: Graf prikazuje okrevanje membrane CHO celic v suspenziji po elektroporaciji 1400 in 1600 V/cm (8×100  $\mu$ s, 1 Hz) pri sobni temperaturi v hipotoničnem pufru. Vsaka točka na sliki predstavlja srednjo vrednost treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija.

Po 1 minuti inkubacije pri sobni temperaturi je delež celic katerih membrana je okrevala po elektroporaciji v hipotoničnem pufru pri obeh jakostih električnega polja približno 40 %. Za celice v elektroporirane pri jakosti polja 1400 V/cm, je ta odstotek še rahlo višji in znaša približno 45 %. Po 2 minutah opazimo, da se ta odstotek povzpne na približno 50 % za celice pri jakosti polja 1600 V/cm in na približno 60 % za celice pri jakosti polja 1400 V/cm. Delež celic katerih membrana je popolnoma okrevala se vztrajno dviguje s časom inkubacije pri sobni temperaturi. Tako lahko vidimo, da je odstotek le-teh po 3 minutah še višji, in sicer približno 60 % za celice pri jakosti električnega polja 1600 V/cm in približno 70 % za celice pri jakosti električnega polja 1400 V/cm. Po 4 minutah pa je delež celic pri jakosti polja 1400 V/cm. Po 5 minutah inkubacije po uporabljeni jakosti polja 1600 V/cm je delež celic, katerih membrana je popolnoma okrevala, približno 75 % in približno 80 % za celice pri

jakosti polja 1400 V/cm. Razlike pri uporabi polja jakosti 1400 ali 1600 V/cm po prvih 5 minut inkubacije v hipotoničnem pufru niso statistično značilne (P>0,1).

Na Sliki 10 vidimo, da prvih 10 minut inkubacije v hipotoničnem pufru celice hitreje okrevajo pri uporabljenem električnem polju jakosti 1400 V/cm. Po 10 minutah inkubacije pri sobni temperaturi, opazimo popolno okrevanje membrane celic po elektroporaciji pri obeh jakostih električnega polja, pri več kot 90 % celic. Delež pri jakosti polja 1400 V/cm je rahlo višji kot pri jakosti polja 1600 V/cm in znaša približno 95 %. Po 20 in 30 minutah inkubacije so deleži, ne glede na uporabljeno jakost električnega polja, približno 95 % in se bistveno ne razlikujejo glede na uporabljeno jakost električnega polja.

Po statistični primerjavi vseh rezultatov, ki smo jih dobili po elektroporaciji s poljem jakosti 1400 ali 1600 V/cm in inkubaciji v hipotoničnem pufru ugotovimo, da se rezultati statistično med seboj ne razlikujejo (P>0,1).

#### 5 RAZPRAVA

Z našo nalogo smo želeli pridobiti podatke o okrevanju (celjenju) membrane CHO celic po elektroporaciji pri sobni temperaturi. Sobno temperaturo smo izbrali zaradi lažjega opazovanja celjenja membrane in celic pri tej temperaturi. Proces okrevanja se začne takoj po prenehanju delovanja zunanjega električnega polja in je zanimiv predvsem za elektrofuzijo in gensko transfekcijo, saj je v obeh primerih pomembno, da se membrane zacelijo in da celice ostanejo viabilne.

Za preučevanje procesa okrevanja membrane in celic smo izbrali optimalne parametre električnega polja za vnos manjših molekul, kot npr. propidijev jodid. Ti parametri pa so primerni tudi za uspešno elektrofuzijo.

Pri elektroporacijskih poizkusih na pritrjenih CHO celicah sta pogosto v uporabi jakost električnega polja 1000 V/cm in izotonični medij, zato smo se v uvodnih poizkusih osredotočili na okrevanje plazemske membrane pritrjenih CHO celic pri že omenjenih parametrih električnega polja ( $8 \times 100 \ \mu s$ , 1 Hz).

V nadaljnjih poizkusih pa smo več pozornosti namenili CHO celicam v suspenziji v izotoničnem in hipotoničnem pufru, saj osmolarnost oziroma toničnost elektroporacijskega pufra igra pomembno vlogo pri elektrofuziji. Zaradi povečanega osmotskega tlaka v celicah pri uporabi hipotoničnega elektroporacijskega pufra je uspešnost elektrofuzije večja, preživetje pa naj bi bilo manjše.

Da smo zagotovili enako stopnjo permeabilizacije CHO celic v suspenziji in pritrjenih CHO celic, smo za CHO celice v suspenziji uporabili višji amplitudi električnih pulzov (560 in 640 V) oziroma višji jakosti električnega polja (1400 in 1600 V/cm). Delež permeabiliziranih celic za propidijev jodid je bil tako v obeh primerih enak. Ostalih parametrov električnega polja (8×100  $\mu$ s, 1 Hz) nismo spreminjali.

Želeli smo torej določiti okrevanje plazemske membrane pritrjenih in CHO celic v suspenziji, po elektroporaciji pri sobni temperaturi ter določiti vpliv dveh amplitud električnih pulzov in toničnosti elektroporacijskega pufra na proces okrevanja membrane CHO celic v suspenziji.

#### 5.1 OKREVANJE MEMBRANE PRITRJENIH CHO CELIC

Ker so pritrjene CHO celice dober model za uporabo pri študijah reverzibilne elektroporacije, npr. pri elektrofuziji in genski transfekciji, je bl naš namen ugotoviti hitrost okrevanja membrane pritrjenih elektroporiranih CHO celic v izotoničnem pufru pri sobni temperaturi pri parametrih električnih pulzov:  $8 \times 100 \ \mu s$ , 1 Hz, 400 V (jakost električnega polja 1000 V/cm). Ti parametri električnega polja so optimalni za elektropermeabilizacijo pritrjenih celic, saj zagotavljajo visok odstotek permeabilizacije in

obenem visok odstotek preživetja celic. Meritve smo opravili po 5, 10, 20 in 30 minutni inkubaciji pri sobni temperaturi.

Iz rezultatov (Slika 5) lahko sklepamo, da je okrevanje membrane pritrjenih CHO celic relativno hitro in da se skoraj popolnoma zaključi po petih minutah, saj je membrana po petih minutah inkubacije pri sobni temperaturi okrevala pri približno 70 % pritrjenih CHO celic. Podobne rezultate smo dobili tudi po 10, 20 in 30 minutah inkubacije.

Delež celic, katerih membrana je okrevala, je po 20 minutah inkubacije pri sobni temperaturi v izotoničnem mediju, nižji od deležev po 5 ali 10 minutni inkubaciji, saj znaša približno 65 %, kar verjetno lahko pripišemo eksperimentalni napaki. Vendar ta razlika ni statistično značilna (P>0,1).

Opazili smo, da odstotek zaceljenih celic narašča s časom inkubacije, saj se na koncu našega poizkusa, torej po 30 minutah, ta delež približa 90 %. To smo tudi pričakovali, saj v literaturi (Neumann, 2007) zasledimo, da sta dolgoživost por in okrevanje membrane pritrjenih CHO celic pri sobni temperaturi v minutnem razredu (20-40 minut), kar sovpada z našimi rezultati.

Vsekakor pa bi na tem mestu prišli prav podatki o okrevanju membrane pritrjenih CHO celic v prvih petih minutah inkubacije pri sobni temperaturi.

#### 5.2 OKREVANJE MEMBRANE CHO CELIC V SUSPENZIJI

# 5.2.1 Primerjava okrevanja membrane pritrjenih CHO celic in CHO celic v suspenziji v izotoničnem mediju

Poleg pritrjenih CHO celic se za elektrofuzijo in gensko transfekcijo pogosto uporabljajo tudi CHO celice v suspenziji. Zato nas je zanimala primerjava okrevanja membrane pritrjenih CHO celic in suspendiranih CHO celic v izotoničnem pufru pri sobni temperaturi.

Primerjali smo rezultate okrevanja membran elektroporiranih pritrjenih in suspendiranih CHO celic po 5, 10, 20 in 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi v izotoničnem pufru.

Parametri električnega polja so bili v obeh primerih enaki:  $8 \times 100 \ \mu$ s, 1 Hz. Iz Schwanove enačbe (1) sledi, da je uporabljena jakost električnega polja odvisna od velikosti (radija) celic. Velikost pritrjenih CHO celic in CHO celic v suspenziji je različna. Suspendirane celice so manjše in zato je za uspešno elektropermeabilizacijo CHO celic v suspenziji potrebna višja jakost električnega polja (E) (Teissié, 2003).

Zato smo za pritrjene celice, ki so večje in bolj občutljive na zunanje električno polje, uporabili manjšo amplitudo pulzov (400 V oz. jakost električnega polja 1000 V/cm), za suspendirane celice pa smo uporabili večji amplitudi pulzov (560 in 640 V oz. jakosti

električnega polja 1400 in 1600 V/cm). S tem smo uspeli zagotoviti enako stopnjo permeabilizacije za propidijev jodid pri pritrjenih CHO celicah in CHO celicah v suspenziji.

Ugotovili smo, da membrane hitro okrevajo, ne glede na to ali so CHO celice pritrjene ali v suspenziji. V obeh primerih je po 5 minutah inkubacije v izotoničnem pufru zaceljenih več kot 70 % celic (Slika 6).

Vendar je okrevanje membran suspendiranih CHO celic hitrejše, ravno tako pa okreva večji odstotek suspendiranih celic kot pritrjenih. Po 5 minutah je membrana popolnoma okrevala pri več kot 70 % pritrjenih celic, kar se ni spremenilo vse do konca poizkusa, ko se je delež teh celic povečal na 90 %. Pri celicah v suspenziji pa je po 5 minutah inkubacije pri sobni temperaturi membrana okrevala že pri več kot 80 % celic. Delež le-teh se je proti koncu poizkusa še povečal in je po 30 minutah znašal približno 94 %.

Znano je, da je odziv pritrjenih celic na določene parametre električnega polja lahko drugačen kot odziv celic v suspenziji. Tako je transport molekul po izpostavitvi zunanjemu električnemu polju, pri fiksnih parametrih električnega polja, počasnejši v pritrjene celice kot v celice v suspenziji. Predvidevamo lahko, da je ta razlika ravno zaradi hitrosti okrevanja celic, kar pa verjetno lahko pripišemo citoskeletu, saj ta igra vlogo pri okrevanju membrane (Rols in Teissié, 1992; Pucihar in sod., 2008; Marjanovič in sod., 2010).

# 5.2.2 Primerjava vpliva toničnosti pufra na okrevanje membrane CHO celic v suspenziji

Osmolarnost oziroma toničnost elektroporacijskega pufra igra pomembno vlogo pri inkubaciji po pulziranju (Golzio in sod., 1998). Tako npr. hipotonični tretma pospešuje genski elektrotransfer v sesalčjih celicah (Wolf in sod., 1994) in uspešnost elektrofuzije (Rols in Teissié, 1990). Zato nas je zanimal vpliv toničnosti elektroporacijskega pufra na okrevanje CHO celic v suspenziji.

Poizkus smo opravili, tako da smo celice v suspenziji inkubirali pri sobni temperaturi v enakih časovnih intervalih kot pri pritrjenih celicah (5, 10, 20, 30 minut), vključno s časi inkubacije 1, 2, 3 in 4 minute.

Za primerjavo vpliva toničnosti pufra na hitrost okrevanja membrane elektroporiranih CHO celic v suspenziji pri sobni temperaturi, smo uporabili izotonični in hipotonični pufer. Okrevanje membrane CHO suspendiranih celic nas je zanimalo predvsem zato, ker je korak okrevanja odvisen od osmolarnosti. Poleg tega naj bi bilo okrevanje v hipotoničnem pufru počasnejše kot v izotoničnem pufru.

Medtem, ko se velikost celic pri uporabi izotoničnega pufra ne spremeni, pa se z znižanjem osmolarnosti, torej z uporabo hipotoničnega pufra, prostornina CHO celic poveča oziroma z drugimi besedami, celice zaradi vdora vode nabreknejo.

Okrevanje CHO celic v suspenziji pri uporabi jakosti električnega polja 1400 V/cm (Slika 7) je relativno hitro in odstotek zaceljenih celic se, do 10 minut inkubacije pri sobni temperaturi, povečuje s časom inkubacije. Krivulji se ne glede na uporabljeno toničnost pufra, torej izotoničnega ali hipotoničnega pufra, skoraj ne razlikujeta. Okrevanje pa se skoraj popolnoma zaključi po 10 minutah inkubacije pri sobni temperaturi, ko je zaceljenih že 95 % celic in je dosežen plato celjenja. Do konca poizkusa ta rezultat ostaja približno enak.

Po podatkih iz članka avtorjev Gabriel in Teissié (1995) kinetika okrevanja membrane CHO celic v suspenziji v izotoničnem pufru in jakosti električnega polja 1.4 kV/cm ( $10 \times 100 \ \mu$ s, 1 Hz) kaže 60 % okrevanje po 15 minutah inkubacije pri 21°C.

Ker je čas okrevanja močno pogojen s temperaturo po dovajanju električnih pulzov, lahko verjetno razliko med podatki iz članka avtorjev Gabriel in Teissié (1995) in našimi podatki, pripišemo višji temperaturi naših poizkusov, saj se je ta gibala v temperaturnem območju od 21-24°C.

Podoben rezultat kot pri jakosti električnega polja 1400 V/cm, smo dobili tudi pri uporabi višje jakosti električnega polja, to je 1600 V/cm (Slika 8). Tudi tu je okrevanje CHO celic v suspenziji relativno hitro in brez opaznejših razlik med uporabo izotoničnega in hipotoničnega pufra, krivulji pa imata podoben potek. Le prvih 10 minut inkubacije je okrevanje rahlo počasnejše pri uporabi hipotoničnega pufra, kar je pričakovano, saj naj bi bilo okrevanje v hipotoničnem pufru počasnejše. Tako kot pri prejšnji jakosti električnega polja, se okrevanje membran skoraj popolnoma zaključi že po 10 minutah inkubacije pri sobni temperaturi, temu pa sledi plato faza oziroma faza, ko so zaceljene že vse celice.

Ob uporabi jakosti električnega polja 1600 V/cm (8×100µs, 1 Hz) in hipotončnega pufra je permeabilizacija 100% in preživetje celic po 24 h je 60 % (Ušaj in sod., 2010).

Torej se pri obeh jakostih električnega polja, okrevanje membrane CHO celic v suspenziji zaključi po 10 minutah inkubacije pri sobni temperaturi, ne glede na uporabljeno toničnost pufra.

Naši rezultati le deloma potrjujejo našo hipotezo, ki pravi, da toničnost pufra vpliva na okrevanje membrane CHO celic po elektroporaciji pri sobni temperaturi, saj razliko opazimo le v prvih 10 minutah inkubacije pri uporabi jakosti električnega polja 1600 V/cm (Slika 8). Iz Slike 7 in 8 torej ne moremo posplošiti, da je korak okrevanja suspendiranih CHO celic odvisen od osmolarnosti oziroma toničnosti uporabljenega elektroporacijskega pufra in da je okrevanje v hipotoničnem pufru počasnejše kot v izotoničnem pufru.

Iz pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je pri naših eksperimentalnih pogojih, okrevanje celic v suspenziji v izotoničnem in hipotoničnem pufru relativno hitro in da toničnost elektroporacijskega pufra ne igra vloge pri hitrosti okrevanja membrane CHO

celic v suspenziji ter da okrevanje membran v hipotoničnem pufru ni počasnejše kot v izotoničnem pufru.

# 5.2.3 Primerjava vpliva jakosti električnega polja na okrevanje membrane CHO celic v suspenziji

Ker se pri poizkusih uporabljene jakosti električnega polja pogosto razlikujejo in ker je ta parameter zelo pomemben pri elektroporaciji celic, smo preučevali tudi vpliv dveh različnih amplitud električnih pulzov (560 in 640 V) oziroma dveh jakosti električnega polja (1400 in 1600 V/cm) na okrevanje membrane CHO celic v supenziji. Poizkuse smo izvedli v izotoničnem in hipotoničnem elektroporacijskem pufru.

Naša hipoteza je bila, da uporabljeni amplitudi električnih pulzov vplivata na okrevanje plazemske membrane suspendiranih CHO celic.

V splošnem velja, da večja kot je jakost električnega polja, učinkovitejša je elektroporacija, torej je elektropermeabiliziranih več celic, preživetje celic pa je nižje, saj je prisoten večji odstotek celic, katerih membrana ne okreva popolnoma. Hitrost okrevanja membrane pa naj bi bila v veliki meri odvisna od jakosti uporabljenega električnega polja, vendar kljub temu čas okrevanja membrane naj ne bi bil funkcija jakosti električnega polja (Djuzenova in sod., 1996; Golzio in sod., 1998; Rols in Teissié, 1998; Teissié in sod., 1999; Golzio in sod., 2000; Teissié, 2003; Teissié in sod., 2005; Pavlin in sod., 2006; Pavlin in Miklavčič, 2008).

V izotoničnem pufru so vse CHO celice v suspenziji permeabilizirane pri intenziteti polja nad 1,5 kV/cm (Teissié in Rols, 1986; Rols in Teissié, 1989).

Pri uporabi izotoničnega pufra (Slika 9) smo ugotovili, da je okrevanje membrane CHO celic v suspenziji relativno hitro in strmo narašča prvih 10 minut inkubacije pri sobni temperaturi. Pri prvih 10 minutah inkubacije opazimo, da je okrevanje rahlo hitrejše za uporabljeno jakost električnega polja 1400 V/cm. To verjetno lahko pripišemo temu, da je pri nižji amplitudi pulzov permeabiliziranih manj celic oziroma manjši del membrane celic, oziroma da se je tvorilo manj dolgoživih por. Po 10 minutah inkubacije pa je dosežen plato okrevanja in krivulji se ne razlikujeta, saj so okrevale že skoraj vse celice. To se ne spreminja več do konca poizkusa. Vpliva uporabljenih jakosti električnega polja na hitrost okrevanja membrane pri tem nismo opazili, saj sta si krivulji za uporabljeni jakosti 1400 V/cm in 1600 V/cm zelo podobni. Izkazalo se je, da pri uporabi izotoničnega pufra velja, da hitrost okrevanja membrane ni funkcija uporabljenih jakosti električnega polja.

Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi po elektroporaciji CHO suspendiranih celic v hipotoničnem pufru (Slika 10). Tudi tu smo ugotovili, da je okrevanje membrane CHO suspendiranih celic relativno hitro in da prvih 10 minut narašča s časom inkubacije. Okrevanje je tudi tu prvih 10 minut inkubacije hitrejše pri jakosti polja 1400 V/cm. Po 10 minutah pa je dosežen plato okrevanja, torej okrevajo skoraj vse celice. Bistvenega vpliva

uporabljenih jakosti električnega polja tudi pri uporabi hipotoničnega pufra nismo opazili, saj sta si krivulji za uporabljeni jakosti 1400 V/cm in 1600 V/cm podobni. Tudi v tem primeru hitrost okrevanja membrane ni funkcija uporabljenih jakosti električnega polja.

Torej, je membrana okrevala skoraj pri vseh celicah že po 10 minutah inkubacije, ne glede na uporabljeno jakost električnega polja. Po 30 minutah inkubacije pa lahko govorimo o popolnem okrevanju membrane vseh celic, ne glede na uporabljeno jakost električnega polja.

Iz naših ugotovitev lahko sklepamo, da uporabljeni amplitudi električnih pulzov (560 in 640 V) oziroma jakosti električnega polja (1400 in 1600 V/cm) v izotoničnem ali hipotoničnem pufru ne vplivata na proces okrevanja elektroporirane membrane suspendiranih CHO celic pri sobni temperaturi. S tem smo ovrgli našo hipotezo, ki pravi, da amplitudi električnih pulzov (560 in 640 V) vplivata na okrevanje plazemske membrane suspendiranih CHO celic.

Za potrditev vpliva amplitude električnih pulzov oziroma jakosti električnega polja na okrevanje membrane CHO celic v suspenziji, bi morali ponoviti poizkuse še za druge amplitude električnih pulzov.

#### 6 SKLEPI

Ker je proces okrevanja (celjenja) membrane CHO celic izredno pomemben za preživetje celic po elektroporaciji, smo v tej nalogi preučevali okrevanje membrane CHO celic po elektroporaciji pri sobni temperaturi (21-24°C) v izotoničnem pufru in v odvisnosti od stanja celic (pritrjene, suspendirane celice). Zanimal nas je tudi vpliv toničnosti (izotonični, hipotonični) pufra in vpliv dveh jakosti električnega polja (1400, 1600 V/cm) na okrevanje membran suspendiranih CHO celic.

Okrevanje membrane pritrjenih CHO celic v izotoničnem pufru je relativno hitro in se skoraj popolnoma zaključi po 5 minutah inkubacije pri sobni temperaturi. Po 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi v izotoničnem mediju pa so popolnoma okrevale skoraj vse celice, kar se sklada s podatki iz literature (Neumann, 2007), kjer se okrevanje membran zaključi v 20-40 minutah.

Primerjali smo tudi okrevanje membran elektroporiranih pritrjenih in suspendiranih CHO celic, inkubiranih pri sobni temperaturi v izotoničnem pufru. Membrane v obeh primerih relativno hitro okrevajo, saj je po 5 minutah inkubacije zaceljenih več kot 70 % celic. Vendar smo opazili hitrejše okrevanje membran suspendiranih CHO celic. Ne glede na stanje celic, pa so proti koncu poizkusa okrevale že skoraj vse celice.

Naši rezultati ne kažejo večje razlike v hitrosti procesa okrevanja pri uporabi izotoničnega ali hipotoničnega elektroporacijskega pufra (260 mOsm, 93 mOsm), saj se okrevanje membrane CHO celic v suspenziji zaključi relativno hitro, to je po 10 minutah inkubacije pri sobni temperaturi. Glede na naše rezultate, toničnost elektroporacijskega pufra ne igra vloge pri hitrosti okrevanja membrane CHO celic v suspenziji in okrevanje membran v hipotoničnem pufru ni počasnejše kot v izotoničnem pufru.

Pri CHO celicah v suspenziji nismo opazili večje razlike v procesu okrevanja pri uporabi dveh jakosti električnega polja (1400 in 1600 V/cm). Okrevanje celic v suspenziji je za obe jakosti relativno hitro in se skoraj popolnoma zaključi po 10 minutah inkubacije pri sobni temperaturi. Torej okrevanje membrane CHO celic v suspenziji pri naših eksperimentalnih pogojih ni odvisno od uporabljenih amplitud električnih pulzov (560 in 640 V) oziroma uporabljenih jakosti električnega polja (1400 in 1600 V/cm).

#### 7 VIRI

#### 7.1 TISKANI VIRI

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4<sup>th</sup> ed. New York. Garland Science. 1502-1591.
- Atwood H. L. in Mackay W. A. 1989. Essentials of Neurophysiology. Toronto. BC Decker: 231 str.
- Bilska A. O., DeBruin K. A., Krassowska W. 2000. Theoretical modeling of the effects of shock duration, frequency and strength on the degree of electroporation. Bioelectrochemistry, 51: 133–143.
- Blangero C., Rols M. P., Teissié J. 1989. Cytoskeletal reorganization during electric field induced fusion of Chinese hamster ovary cells grown in monolayers. Biochimica et Biophysica Acta, 981: 295–302.
- Burgess S. E., Zhao Y., Sen A., Hui S. 2006. Resealing of electroporation of porcine epidermis using phospholipids and poloxamers. International Journal of Pharmaceutics, 8, 336: 269–275.
- Cambrea L. R., Haque F., Schieler J. L., Rochet J.-C., Hovisin J. S. 2007. Effect of ions on the organization of phosphatidylcholine/phosphatidic acid bilayers. Biophysical Journal, 93: 1630–1638.
- Canatella P. J., Karr J. F., Petros J. A., Prausnitz M. R. 2001. Quantitative study of electroporation-mediated molecular uptake and cell viability. Biophysical Journal, 80: 755–764.
- Cole K. S. Membranes, Ions and Impulses. 1972. 1. izd. Berkeley, University of California Press: 569 str.
- Djuzenova C. S., Zimmermann U., Frank H., Sukhorukov V. L., Richter E., Fuhr G. 1996. Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electropermeabilized myeloma cells. Biochimica et Biophysica Acta, 1284: 143-152.
- Doherty G. J., McMahon H. T. 2008. Mediation, Modulation, and Consequences of Membrane-Cytoskeleton Interactions. Annual Review of Biophysics, 37: 65-95.
- Gabriel B., Teissié J. 1995. Control by electrical parameters of short- and long-term cell death resulting from electropermeabilization of Chinese hamster ovary cells. Biochimica et Biophysica Acta, 1266: 171-178.

Gabriel B, Teissié J. 1997. Direct Observation in the Millisecond Time Range of

Fluorescent Molecule Asymmetrical Interaction with the Electropermeabilized Cell Membrane. Biophysical Journal, 73 (5): 2630-2637.

- Gabriel B., Teissié J. 1995. Spatial compartmentation and time resolution of photooxidation of a cell membrane probe in electropermeabilized Chinese hamster ovary cells. European Journal of Biochemistry, 228: 710–718.
- Glaser R. W., Leikin S. L., Chernomordik L. V., Pastushenko V. F., Sokirko A. I. 1987. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. Biochimica et Biophysica Acta, 940: 275-287.
- Golzio M., Mora M. P., Raynaud C., Delteil C., Teissié J., Rols M. P. 1998. Control by Osmotic Pressure of Voltage-Induced Permeabilization and Gene Transfer in Mammalian Cells. Biophysical Journal, 74: 3015–3022.
- Golzio M., Teissié J., Rols. M. P. 2000. Control by membrane order of voltage-induced permeabilization, loading and gene transfer in mammalian cells. Bioelectrochemistry, 53: 25–34.
- Golzio M., Ciobanu F., Kovacs E., Teissié J. 2009. Control by Calcium of mammalian cell membrane electropermeabilization. Biophysical Journal, 96: 361a.
- Haberl S., Miklavčič D., Pavlin M. 2010. Effect of Mg ions on efficiency of gene electrotransfer and on cell electropermeabilization. Bioelectrochemistry, 79: 265-271.
- Harkin D. G., Hay E. D. 1996. Effects of electroporation on the tubulin cytoskeleton and direct migration of corneal fibroblasts cultured within collagen matrices. Cell Motility and the Cytoskeleton, 35: 345–357.
- Kakorin S. 2005. Analysis of Electroporative Transport: Ionic Conductivity of Membrane Electropores. Electroporation based technologies and treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course. Ljubljana, Založba FE in FRI: 24-28.
- Kandušer M., Šentjurc M., Miklavčič D. 2008. The temperature effect during pulse application on cell membrane fluidity and permeabilization. Bioelectrochemistry, 74: 52–57.
- Kandušer M., Šentjurc M., Miklavčič D. 2005. Cell membrane fluidity related to electroporation and resealing. European Biophysics Journal, 35: 196–204.
- Kanthou C., Kranjc S., Serša G., Tozer G., Zupanič A., Čemažar M. 2006. The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies. Molecular Cancer Therapeutics, 5: 3145–3152.
- Kotnik T. 2003. Biological Cells in Electric Fields. Electroporation based Technologies

and Treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course. Ljubljana, Založba FE in FRI: 7-11.

- Kotnik T., Maček Lebar A., Kandušer M., Pucihar G., Pavlin M., Valič B., Miklavčič D. 2005. Elektroporacija celične membrane: teorija ter poizkusi in vitro. Medicinski razgledi, 44: 81-90.
- Lacković I. 2003. Biological Tissues in Static and Dynamic Electric Fields. Electroporation based technologies and treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course. Ljubljana, Založba FE in FRI: 12-17.
- Lambert I. H. 2007. Activation and inactivation of the volumesensitive taurine leak pathway in NIH3T3 fibroblasts and Ehrlich Lettre ascites cells. American Journal Physiology, Cell Physiology, 293: C390–C400.
- Lebar A., Miklavčič D. 2001. Cell electropermeabilization to small molecules in vitro: control by pulse parameters. Radiologica Oncology, 35(3): 193-202.
- Lebar A., Pavlin M., Kotnik T., Miklavčič D., Kramar P. 2008. Electroporation of Planar Lipid Bilayers and Membranes. Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes. Elsevier, 6: 165-226.
- Lebar A., Serša G., Čemažar M., Miklavčič D. 1998. Elektroporacija. Medicinski razgledi, 37: 339-354.
- Lebar A. 1999. Vpliv električnih parametrov na elektroporacijo plazmaleme v in vitro pogojih. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko.
- Lipowsky R., Sackmann E. 1995. Structure and Dynamics of Membranes. Elsevier, 805– 849.
- Maček-Lebar A., Kopitar N. A., Ihan A., Serša G., Miklavčič D. 1998. Significance of treatment energy in cell electropermeabilization. Electro. Magnetobiology, 17: 253–260.
- Marjanovič I., Haberl S., Miklavčič D., Kandušer M., Pavlin M. 2010. Analysis and Comparison of Electrical Pulse Parameters for Gene Electrotransfer of Two Different Cell Lines. Journal Membrane Biology, 236: 97-105.
- Miklavčič D. 2005. Development of devices and electrodes. Electroporation based technologies and treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course. Ljubljana, Založba FE in FRI: 36-41.

Miklavčič D. 2003. Electrodes and corresponding electric field distribution for effective in

vivo electroporation. Electroporation based technologies and treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course. Ljubljana, Založba FE in FRI: 27-31.

- Miklavčič D., Towhidi L. 2010. Numerical study of the electroporation pulse shape effect on molecular uptake of biological cells. Radiology and Oncology, 44 (1): 34-41.
- Mir L. M. 2003. Electroporation of cells in tissues: Methods for detecting cell electropermeabilisation in vivo. Electroporation based technologies and treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course. Ljubljana, Založba FE in FRI: 23-26.
- Neamtu S., Morariu V. V., Turcu I., Popescu A. H., Copaescu L. I. 1999. Pore resealing inactivation in electroporated erythrocyte membrane irradiated with electrons. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 48: 441–445.
- Neumann E., Toensing K., Kakorin S., Budde P., Frey J. 1998. Mechanism of Electroporative Dye Uptake by Mouse B Cells. Biophysical Journal, 74: 98-108.
- Neumann E., Jordan C. A., Sowers A. E. 1989. Electroporation and electrofusion in cell biology. New York, Plenum Press, 460 str.
- Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. The EMBO Journal, 1 (7): 841-845.
- Neumann E. 2005. Physical Chemistry of Membrane Electroporation: Towards Mechanisms for Electroporative Transport Phenomena. Electroporation based technologies and treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course. Ljubljana, Založba FE in FRI: 19-23.
- Neumann E. 2007. Theory of Membrane Electroporation (Part I) and Mechanisms of Transport Processes (Part II) for Medical Electroporation Treatments. Electroporation based technologies and treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course. Ljubljana, Založba FE in FRI: 19-28.
- Nickoloff J. A. 1995. Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols (Methods in Molecular Biology). Totowa, Humana Press Inc.: 48.
- Orrenius S., McConkey D. J., Bellomo G., Nicotera P. 1989. Role of Ca2+ in toxic cell kiling. TiPS, 10: 281-5.
- Pavlin M., Miklavčič D. 2008. Theoretical and experimental analysis of conductivity, ion diffusion and molecular transport during cell electroporation - Relation between short-lived and long-lived pores. Bioelectrochemistry, 74: 38–46.

Pavlin M., Leben V., Miklavčič D. 2006. Electroporation in dense cell suspension -

Theoretical and experimental analysis of ion diffusion and cell permeabilization. Biochimica et Biophysica Acta, 1770: 12–23.

- Pavlin M., Kandušer M., Reberšek M., Pucihar G., Hart F. X., Magjarevićcacute R., Miklavčič D. 2005. Effect of cell electroporation on the conductivity of a cell suspension. Biophysical Journal, 88: 4378–4390.
- Puc M., Kotnik T., Mir L. M., Miklavčič D. 2002. Quantitative model of small molecules uptake after in vitro cell electropermeabilization. Bioelectrochemistry, 60: 1– 10.
- Pucihar G., Kotnik T., Kandušer M., Miklavčič D. 2001. The influence of medium conductivity on electropermeabilization and survival of cells in vitro. Bioelectrochemistry, 54: 107–115.
- Pucihar G., Mir L. M., Miklavčič D. 2002. The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electropermeabilized cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy. Bioelectrochemistry, 57: 167–172.
- Pucihar G., Kotnik T., Miklavčič D., Teissié J. 2008. Kinetics of Transmembrane Transport of Small Molecules into Electropermeabilized Cells. Biophysical Journal, 95: 2837–2848.
- Pucihar G., Kotnik T., Teissié J., Miklavčič D. 2007. Electropermeabilization of dense cell suspensions. European Biophysics Journal, 36: 173–185.
- Raffy S., Teissié J. 1999. Control of Lipid Membrane Stability by Cholesterol Content. Biophysical Journal, 76: 2072–2080.
- Rols M. P., Faurie C., Reberšek M., Golzio M., Kandušer M., Escoffre J. M., Pavlin M., Teissié J., Miklavčič D. 2009. Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation. The Journal of Gene Medicine, 12: 117–125.
- Rols M. P., Teissié J. 1989. Ionic-strength modulation of electrically induced permeabilization and associated fusion of mammalian cells. European Journal of Biochemistry, 179: 109-115.
- Rols M. P., Teissié J. 1990. Modulation of electrically induced permeabilization and fusion of Chinese hamster ovary cells by osmotic pressure. Biochemistry, 29: 4561-7.
- Rols M. P., Teissié J. 1990. Electropermeabilization of mammalian cells: Quantitative analysis of the phenomenon. Biophysical Journal, 58: 1089-1098.
- Rols M. P., Teissié J. 1992. Experimental evidence for the involvement of the cytoskeleton in mammalian cell electropermeabilization. Biochimica et Biophysica Acta, 1111: 45–50.

- Rols M. P., Teissié J. 1998. Electropermeabilization of Mammalian Cells to Macromolecules: Control by Pulse Duration. Biophysical Journal, 75: 1415–1423.
- Rols M. P. 2005. In vitro gene transfection: what can we learn from cell imaging? Electroporation based technologies and treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course. Ljubljana, Založba FE in FRI: 49-52.
- Schmeer M., Seipp T., Pliquett U., Kakorin S., Neumann E. 2004. Mechanism for the conductivity changes caused by membrane electroporation of CHO cellpellets. Physical Chemistry. Chemical Physics, 6: 5564-5574.
- Singer S. J., Nicolson G. L. 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. Science, 175: 720-731.
- Tarek M., Delemotte L. 2009. Molecular Dynamics Simulations of Lipid Membrane Electroporation. Electroporation based technologies and treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course. Ljubljana, Založba FE in FRI: 29-36.
- Teissié J., Ramos C. 1998. Correlation between Electric Field Pulse Induced Long-Lived Permeabilization and Fusogenicity in Cell Membranes. Biophysical Journal, 74: 1889-1898.
- Teissié J., Rols M. P. 1986. Fusion of mammalian cells in culture is obtained by creating the contact between cells after their electropermeabilization. Biochemical and biophysical research communications, 140 (1): 258-266.
- Teissié J., Rols M. P. 1993. An Experimental Evaluation of the Critical Potential Difference Inducing Cell Membrane Electropermeabilization. Biophysical Journal, 65: 409-413.
- Teissié J., Eynard N., Gabriel B., Rols M. P. 1999. Electropermeabilization of cell membranes. Advanced Drug Delivery Reviews, 35: 3–19.
- Teissié J. Golzio M., Rols M. P. 2005. Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. Biochimica et Byophysica Acta, 1724: 270-280.
- Teissié J. 2003. In vitro Cell Electropermeabilization. Electroporation based technologies and treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course. Ljubljana, Založba FE in FRI: 20-22.
- Teissié J. 2003. In vitro electric field mediated gene transfer and expression. Electroporation based technologies and treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course. Ljubljana, Založba FE in FRI: 37-40.

Tieleman D. P., Leontiadou H., Mark A. E., Marrink S. J. 2003. Simulation of pore

formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields. Journal of American Chemical Society, 125: 6282–6383.

- Trontelj K., Ušaj M., Miklavčič D. 2010. Cell Electrofusion Visualized with Fluorescence Microscopy. Journal of Visualized Experiments, 41.
- Trontelj K. 2005. Optimizacija elektrofuzije celic sesalcev v pogojih in vitro. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
- Ušaj M., Trontelj K., Miklavčič D., Kandušer M. 2010. Cell–Cell Electrofusion: Optimization of Electric Field Amplitude and Hypotonic Treatment for Mouse Melanoma (B16-F1) and Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. Journal Membrane Biology, 236: 107-116.
- Ušaj M., Trontelj K., Hudej R., Kandušer M., Miklavčič D. 2009. Cell size dynamics and viability of cells exposed to hypotonic treatment and electroporation for electrofusion optimization. Radiology and Oncology, 43 (2): 108-119.
- Vernhes M. C., Cabanes P. A., Teissié J. 1998. Chinese hamster ovary cells sensitivity to localized electrical stresses. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 48: 17–25.
- Wolf H., Rols M. P., Boldt E., Neumann E., Teissié J. 1994. Control by Pulse Parameters of Electric Field-Mediated Gene Transfer in Mammalian Cells. Biophysical Journal, 66: 524-531.

#### 7.2 ELEKTRONSKI VIRI

- Kandušer M., Miklavčič D. 2009. Electroporation in Biological Cell and Tissue: An Overview. http://lbk.fe.uni-lj.si/pdfs/eefp2008.pdf (7. sep. 2010)
- Molecular Probes Inc. 2006. Propidium Iodide Nucleic Acid Stain. http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01304.pdf (10. avg. 2010)

#### ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Damijanu Miklavčiču, da me je sprejel v Laboratorij za biokibernetiko in me kot mentor vodil tekom nastajanja diplomskega dela ter dr. Maši Kandušer za usmerjanje, potrpežljivost in strokovno pomoč pri delu v laboratoriju.

Zahvaljujem se vsem iz Laboratorija za biokibernetiko na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, ki so mi bili vedno pripravljeni svetovati in pomagati, še posebej hvala Marku Ušaju.

Hvala tudi recenzentu, prof. dr. Petru Mačku za hitro in natančno recenzijo diplomskega dela in Zdenki Repanšek za vse administrativne napotke tekom mojega študija biologije.

Nenazadnje hvala Urški, očetu Mavriciju, mami Pavli ter vsem prijateljem, ki so me skozi »dolga« študijska leta spremljali in spodbujali pri doseganju lastnih ciljev.