

Elektroporacija celic v mediju z nižjim pH

Jaka Kramarič¹, Alenka Maček-Lebar²

¹Iskra Medical d.o.o., Stegne 23, 1000 Ljubljana, Slovenija

²Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška cesta 25, 1000 Ljubljana, Slovenija
Alenka.MacekLebar@fe.uni-lj.si

Abstract

In this paper we evaluated the effect of pH factor in cell medium on electroporation. We used acetic acid, to prepare mediums with pH values of 5.58, 6.02, 6.64, 6.87 and 7.48 (culture medium with no alterations). Before conducting experiments in the electric field, we assessed cell viability in different time spans and different culture mediums. As expected, the percentage of surviving cells, exposed to different mediums for a longer period of time, decreases with the decreasing pH value of the medium. For experiments with electroporation, we used 8 voltage pulses of amplitudes 180 V, 270 V, 360 V and 450 V, duration of 100 μ s and applied frequency of 1 Hz. There were no significant differences between different mediums at low or high amplitudes. However, at amplitudes in the middle, results show better cell viability in culture mediums with altered pH values. Furthermore, experiments with propidium iodide show, that the differences occur after electroporation, in time of cell membrane regeneration.

1 Uvod

Elektroporacija je pojav, do katerega pride, če celico izpostavimo dovolj visokemu električnemu polju, kar povzroči nastajanje por na celični membrani. Če je izpostavitve dovolj kratka in če jakost električnega polja ni prevelika, se celična membrana po izpostavitvi vrne v prvotno stanje.

Vrednost pH določa kislost ali alkalnost raztopine. Raztopine, ki imajo pH manjši od 7 so kisle, raztopine s pH vrednostjo enako 7 se smatrajo kot nevtralne in raztopine s pH vrednostjo nad 7 so baze [1].

pH ima pomembno vlogo pri optimizaciji celičnih procesov in njegove spremembe lahko hitro ovirajo celične reakcije. V živalski celici vpliva na celično rast, metabolizem in sintezo beljakovin. Ekstremne pH vrednosti lahko pripeljejo do denaturacije proteinov in destabilizacije DNA, hitrost encimskih reakcij pa se spremeni že z zelo majhno spremembo v pH vrednosti. Kot kažejo raziskave, sprememba pH vrednosti zaviralno vpliva tudi na glikolizacijo, kar pomeni zmanjšanje količine glikoproteinov, med katere sodijo encimi, večina hormonskih proteinov, protitelesa in številni membranski proteini. Optimalna pH vrednost za celično rast se razlikuje med posameznimi celičnimi linijami, vendar je v večini primerov med 7,0 in 7,7. V nekaterih primerih ima lahko že sprememba pH vrednosti za 0,2 velik vpliv na celične procese [2, 3].

Znano je, da je zunajcelični pH tumorjev in ran pogosto nižji, kot zunajcelični pH zdravega tkiva. Rane in tumorji namreč povzročajo hipoksičnost (pomanjkanje kisika), zaradi poškodb ali nepravilnih potekov ožilja. Posledica hipoksičnega okolja je anaerobni celični metabolizem, pri katerem nastaja mlečna kislina ($C_3H_6O_3$). pH vrednosti prizadetega tkiva niso enakomerne, kaže se namreč precejšen gradient tako v njihovem okolju, kot na meji z zdravim tkivom. pH gradienti naj bi imeli velik vpliv na migracijo celic v primeru tumorske rasti in celjenja ran [4].

Malo je narejenih raziskav vpliva pH vrednosti pri elektroporaciji. Izveden je bil poizkus na roženi plasti (stratum corneum) kože. Rožena plast je najbolj izpostavljena (zgornja) plast kože. Lipidi v njej sestavljajo večslojno strukturo, predstavljajo pa približno 30% njene suhe mase. Med drugim so v raziskavi opazovali transport glukoze preko rožene plasti s pomočjo elektroporacije pri pH vrednostih 5,0 in 7,5. Raziskava je pokazala, da med časom elektroporacije v transportu ni razlik med različnimi mediji. Razlika se je pojavila v transportu molekul po elektroporaciji. 15 min po končani izpostavitvi električnemu polju, je bil transport glukoze preko rožene plasti približno trikrat večji v mediju s pH vrednostjo 7,5 kot pri mediju s pH vrednostjo 5,0 [5]. Podobne rezultate so pokazali tudi poizkusi na celicah kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*), z razliko da so bili eksperimenti izvedeni pri pH vrednosti 4,0 in 7,0 [6].

Omeniti je potrebno, da tudi med samo elektroporacijo pride do spreminjanja pH vrednosti elektroporiranega območja. Zaradi elektrolize se namreč od pozitivne katode širi bazna pH fronta, od negativne anode pa kislina pH fronta. Hitrost in velikost fronte je odvisna od dolžine električnih pulzov in njihove jakosti. Spremembi, ki nastaneta ob elektrodah, sta lahko znatni in pripeljeta do poškodb [7, 8].

2 Materiali in metode

Poizkuse smo izvajali na celični liniji CHO (Chinese hamster ovary), pridobljeni iz tkiva jajčnikov kitajskih hrčkov (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK). Celice smo gojili v posodah za gojenje celic (TPP, Švica) s 150 cm^2 veliko površino, namenjenim rasti celične kulture in priporočljivim volumnom gojišča 15 ml - 30 ml. Uporabili smo gojišče HAM-F12 (Ham's Nutrient Mixtures).

Za pripravo kislega medija smo uporabili očetno (etanojsko) kislino. Očetna kislina je organska kislina s

formulo CH_3COOH . V stekleno čašo smo odmerili 10 ml gojišča HAM-F12 in s pH metrom SevenGo-SG2 (Mettler-Toledo) ter merilno elektrodo Inlab Routine Pro (Mettler-Toledo) izmerili vrednost. Nato smo s pipeto dodajali po 0,6 μl ocetne kisline, dokler nismo dobili željenih vrednosti pH. Količine dodane kisline v 10 ml gojišča za željeno kislost medija so podane v tabeli 1.

Tabela 1: Količine ocetne kisline dodane v 10 ml gojišča za doseg željenega pH.

Raztopina [pH]	Dodatek kisline [μl]
7,48	0
6,87	2,1
6,64	3,3
6,02	4,2
5,58	6,6

Delež živih celic smo določili s pomočjo spektrofotometričnega testa CellTiter 96 AQueous One Solution Assay (MTS). Za MTS test smo uporabili celične testne plošče s 96 vdolbinami (TPP, Švica). V vsako vdolbino smo nasadili 100 μl celične suspenzije, v kateri je bilo 10^5 celic. Celično suspenzijo smo pustili v inkubatorju 24 ur, ji nato dodali 20 μl barvila MTS tetrazol in celice inkubirali še dodatni 2 uri. Delež preživelih celic smo izračunali po enačbi (1):

$$x = \frac{ABS_V - ABS_{OZ}}{ABS_K - ABS_{OZ}} * 100\% \quad (1)$$

kjer je x delež preživelih celic vzorca, ABS_V absorpcijska vrednost vzorca, ABS_K absorpcijska vrednost kontrole in ABS_{OZ} absorpcijska vrednost ozadja.

Elektroporacijo smo izvajali z elektroporatorjem (Cliniporator, IGEA, Italija), pri napetostih 180 V, 270 V, 360 V in 450 V. Uporabili smo 8 pravokotnih pulzov dolžine 100 μs in frekvence 1 Hz. Nanj smo priklopili ploščate elektrode razmaka 1,5 mm. Elektroporirali smo celično suspenzijo volumna 50 μl s $5 * 10^5$ celic.

Prehajanje propidijevega jodida preko membrane po elektroporaciji smo opazovali v primeru medija s pH vrednostjo 5,58 in nespremenjenega medija. Propidijev jodid smo dodali celični suspenziji takoj po elektroporaciji in po 10 min zajeli slike z mikroskopom Axiovert 200 (Carl Zeiss, Nemčija).

Hitrost okrevanja celične membrane smo opazovali z dodanim propidijevim jodidom celični suspenziji v časovnem zamiku. Tako smo propidijev jodid dodali suspenziji 10 min, 15 min in 20 min po elektroporaciji.

3 Rezultati in razprava

Vpliv nižjega pH v mediju na celično preživetje po elektroporaciji, smo preverili pri napetostih 180 V, 270 V, 360 V in 450 V. Vsak poizkus, pri določeni vrednosti pH, iz katerega smo potem izračunali povprečno vrednost absorpcije MTS barvila, standardno deviacijo absorpcije MTS barvila in procent preživetja, glede na referenčno oziroma kontrolno skupino, ki ni bila izpostavljena elektroporaciji, vendar je šla skozi enak protokol, je bil ponovljen štirikrat. Referenčni skupini z

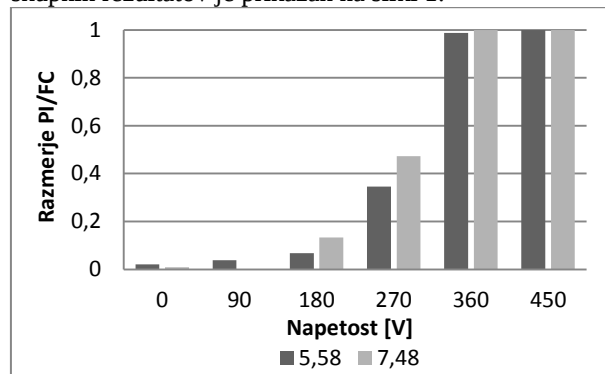
nespremenjenim HAM-F12 medijem sta dve, narejeni pred in po poizkusih. Vse povprečne vrednosti preživetja so skupaj prikazane v tabeli 2.

Tabela 2: Povprečne vrednosti preživetja celic po elektroporaciji v različnih medijih. Ref predstavlja referenčno vrednost za izbrani medij, oziroma procent preživetja v izbranem mediju brez izpostavitve električnemu polju.

Vrednost pH	0 V (Ref)	180 V	270 V	360 V	450 V
5,58	93,4	93,1	73,3	43,3	3,4
6,02	102,9	94,4	87,3	50,4	6,6
6,64	94,6	91,8	85,9	57,9	6,3
6,87	97,6	93,2	87,6	45,7	5,1
7,48	100,0	97,7	59,5	12,6	1,5

Pri dovolj nizki napetosti, kjer so celice v reverzibilnem delu elektroporacije, ni opazne razlike v procentu preživetja med različnimi mediji. Prav tako pri zelo visoki napetosti, ko smo preko praga ireverzibilne elektroporacije, ni vidne razlike v procentu preživetja, saj so napetostni pulzi tako veliki, da večina celic ni zmožna popraviti škode, ki jo je elektroporacija povzročila in odmrejo. Zanimive razlike pa smo opazili pri vmesnih napetostih. Celice v mediju z nižjo pH vrednostjo imajo namreč večji odstotek preživetja, kot celice v običajnem HAM-F12 gojišču. Največje odstopanje je zapaziti pri napetosti 360 V, kjer je razlika med največjim odstotkom preživetja (pH 6,64) in odstotkom preživetja v običajnem gojišču enaka 45,3 %. Razlika med najmanjšim odstotkom preživetja v spremenjenem mediju (pH 5,58) in odstotkom preživetja v nespremenjenem je enaka 30,7 %.

S pomočjo propidijevega jodida smo pogledali, ali ima spremenjen medij vpliv na število elektroporiranih celic. Poizkus smo izvedli v HAM-F12 gojišču brez vpliva na njegovo pH vrednost in v gojišču s pH vrednostjo 5,58. PI smo dodali celični suspenziji takoj po elektroporaciji in po desetih minutah zajeli slike faznega kontrasta (FC) in fluorescence (PI). Graf skupnih rezultatov je prikazan na sliki 1.

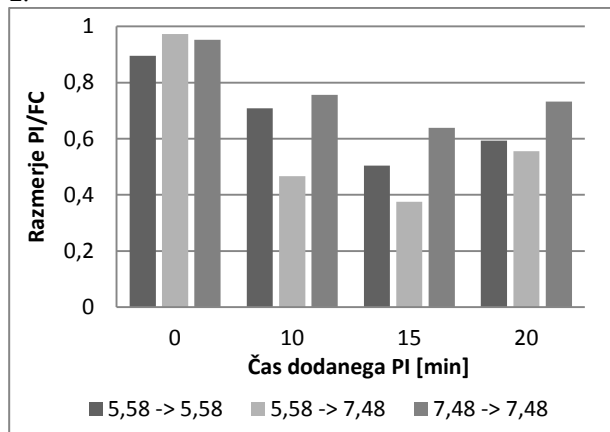


Slika 1: Razmerje prešteti celic faznega kontrasta (FC) in celic z vgrajenim PI v odvisnosti od različnih napetosti, pri različnih medijih.

Rezultati ne kažejo vidne spremembe pri prehajanju propidijevega jodida preko membrane med različnimi medijema.

Razlike prehajanja PI preko membrane celic smo preverili v štirih časovnih obdobjih. PI smo celični

suspenziji dodali takoj po elektroporaciji, ter 10 min, 15 min in 20 min po elektroporaciji. Izbrana medija sta bila ponovno HAM-F12 brez dodane očetne kisline in HAM-F12 z dodano kislino, tako da je bila pH vrednost 5,58. Po 10 min smo zajeli slike faznega kontrasta (FC) in fluorescence (PI). Skupni rezultati so podani na sliki 2.



Slika 2: Razmerje celic z vgrajenim PI proti vsem celicam v različnih časovnih obdobjih dodanega propidijevega jodida in za različne kombinacije medijev.

Dodan propidijev jodid takoj po elektroporaciji ne prinese večjih sprememb k razmerju števila celic (PI/FC) med različnimi mediji. Razliko opazimo, če propidijev jodid dodamo celični suspenziji z nekaj zakasnitve. Naše meritve so pokazale najboljše okrevanje celic, ki so bile električnemu polju izpostavljene v kislem mediju, potem pa so bile za čas okrevanja predstavljene v nespremenjen medij. Nekoliko slabša je bila rehabilitacija celic, ki so bile elektroporirane v kislem mediju in v takem mediju tudi ostale za čas okrevanja. Kot medij z najslabšim vplivom na rehabilitacijo, se je izkazal nespremenjeni HAM-F12, s pH vrednostjo 7,48. Enake rezultate kaže tudi poizkus pri napetosti 270 V in 15 min zakasnitvi.

4 Zaključek

Velik vpliv na učinke elektroporacije ima okolje, v katerem se celice nahajajo. Le to se med posameznimi primeri zelo spreminja. Za okolje celic tumorjev in ran je značilna nižja pH vrednost.

Izkazalo se je, da pri elektroporaciji z visoko in nizko napetostjo, praktično ne pride do razlik v preživetju med različno kislimi mediji. Razlike se pojavijo pri vmesnih napetostih, kjer večji odstotek preživetja kažejo celice, ki so bile med elektroporacijo v kislem mediju.

Razlike so tudi opazne pri prehajanju propidijevega jodida preko celične membrane. Propidijev jodid dodan celični suspenziji v časovnem zamiku je slabše prehajal pri celicah, ki so bile elektroporirane v mediju z nižjo pH vrednostjo. To namiguje, da so membrane le teh celic hitreje okrevale, kot membrane celic, ki so bile elektroporirane v nespremenjenem gojišču.

Vsi dobljeni rezultati kažejo, da pH ima vlogo pri elektroporaciji. Zakaj do razlik pride v tej točki še ni znano, vendar je jasno, da ima pozitiven vpliv na celično

preživetje, oziroma na obnovo celične membrane po elektroporaciji. Tega se je potrebno zavedati, saj se s podobnimi primeri pogosto srečamo tudi v klinični praksi, kot na primer pri elektrokemoterapiji, kjer si celice tumorjev same ustvarijo bolj kislo okolje.

5 Zahvala

Raziskava je bila izvedena v okvirju mednarodnega raziskovalnega laboratorija LEA EBAM, ter bila delno financirana s strani Evropske unije iz Evropskega socialnega sklada.

Literatura

- [1] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren in P. Wothers, Organic Chemistry, New York: Oxford University Press, 2005, pp. 181-185.
- [2] S. Ozturk in W.-S. Hu, Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, New York: Taylor & Francis Group, 2006, p. 316.
- [3] E. Hagrot, *Development of a culture system for modeling of pH effects in CHO cells*, Stockholm, 2011.
- [4] R. K. Paradise, M. J. Whitfield, D. A. Lauffenburger in K. J. Van Vliet, „Directional cell migration in an extracellular pH gradient: A model study with an engineered cell line and primary microvascular endothelial cells,“ *Experimental Cell Research*, Izv. 319, pp. 487-497, 2013.
- [5] S. N. Murthy, A. Sen, Y.-L. Zhao in S. W. Hui, „pH influences the postpulse permeability state of skin after electroporation,“ *Journal of Controlled Release*, Izv. 93, pp. 49-57, 2003.
- [6] B. Rubinsky, Irreversible Electroporation, Berkeley, Kalifornija: University of California, 2009, p. 288.
- [7] P. Turjanski, N. Olaiz, F. Maglietti, S. Michinski, C. Suarez, F. V. Molina in G. Marshall, „The Role of pH Fronts in Reversible Electroporation,“ *Plos One*, 2011.
- [8] F. Maglietti, S. Michinski, N. Olaiz, M. Castro, C. Suarez in G. Marshall, „The Role of Ph Fronts in Tissue Electroporation Based Treatments,“ *Plos One*, 2013.