

Vpliv elektroporacije z različnimi elektrodami na celično preživetje v inkubacijskem mediju

Tina Turk, Alenka Maček Lebar

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška c. 25, 1000 Ljubljana

E-pošta: tt3707@student.uni-lj.si, alenka.macek-lebar@fe.uni-lj.si

The impact of electroporation with different electrodes on cell viability in the incubation medium

Abstract. *In this study, the effects of incubation medium after high-voltage electroporation with iron- or aluminum-based electrodes on the survival of untreated cells were investigated using Chinese hamster ovary cells. In addition, the effects of 1 mM and 2 mM concentrations of iron ions Fe^{2+} in the electroporation medium on the cytotoxicity of the incubation medium were evaluated.*

The results revealed a strong contrast between the effects of using stainless steel and aluminum electrodes. Electroporation with stainless steel electrodes resulted in a cytotoxic incubation medium, whereas the use of aluminum electrodes showed no significant effect on cell survival in the incubation medium. Although iron ions are released in large amounts from the stainless-steel electrodes during electroporation, iron ions Fe^{2+} are not the main reason for the cytotoxicity of the incubation medium. These findings highlight the complexity and importance of considering various parameters when designing and performing electroporation procedures.

1 Uvod

Izpostavitev celic visokonapetostnim električnim pulzom vpliva na povečano prepustnost celične membrane, kar omogoča prehajanje ionov in molekul iz zunanjega okolja v celice in iz celične notranjosti v celično okolje. Pojav imenujemo elektroporacija, ker naj bi v lipidnem dvosloju celične membrane nastale prevodne poti v obliki por [1]. Celice (ali tkivo) izpostavimo visokonapetostnim električnim pulzom z uporabo elektrod, ki so večinoma narejene iz različnih kovin. Med izpostavitvijo celic visokonapetostnim električnim pulzom teče skozi biološki vzorec električni tok, ki ga omogočajo nabiti delci v biološkem vzorcu. Biološki vzorec se zaradi tega segreva, v njem in na stiku s kovinskimi elektrodami pa potekajo elektrokemijske reakcije [2]. Sprememba temperature biološkega vzorca in produkti elektrokemijskih reakcij vplivajo na proces nastajanja in popravljanja poškodb v celični membrani med in po elektroporaciji.

Pri poskusih na celičnih kulturah v pogojih *in vitro* so najpogosteje uporabljane elektrode iz aluminijevih in železovih zlitin. Opazili so, da rastni medij, ki je izpostavljen visokonapetostnim električnim pulzom med elektrodami iz nerjavečega jekla ali iz aluminijevih zlitin,

znatno vpliva na preživetje celic v tem mediju [2], pri čemer je bil medij, ki je bil visokonapetostnim električnim pulzom izpostavljen med elektrodami iz nerjavečega jekla, statistično značilno bolj citotoksičen.

Najpomembnejši gradnik elektrod iz nerjavečega jekla je železo in prav železovi ioni v obliki Fe^{2+} in Fe^{3+} se med aplikacijo visokonapetostnih električnih pulzov v znatni količini izločijo iz elektrod [3]. Povečana koncentracija železovih ionov v biološkem vzorcu vodi do dodatnih kemičnih reakcij, kar lahko spremeni kemično sestavo medija.

Povečana akumulacija železovih ionov v celici in lipidna peroksidacija vodita do posebne oblike celične smrti, ki ji pravimo ferroptozo. Za razliko od ostalih oblik celične smrti, se ferroptozo kot val širi v celični populaciji [4]. Celice lahko izločijo odvečne ione železa v zunajceličnih veziklih (eksosomih) in se tako izognejo ferroptози [5].

Zunajcelični vezikli so lipidne strukture, ki vsebujejo različne molekule in ione. Celice jih v okolico izločajo z eksocitozo ali odcepom od celične membrane in na ta način skrbijo za prenos snovi med celicami v telesu [6]. Elektroporacija povzroči strukturne spremembe celične membrane in v celici sproži procese, ki vplivajo povečano nastajanje in izločanje zunajceličnih veziklov, kar omogoča prehajanje snovi med celicami in medijem po elektroporaciji [7].

Z raziskavo smo želeli preveriti, kako na celice iz sveže celične kulture vpliva inkubacijski medij, v katerem so okrevale celice po elektroporaciji z elektrodami iz nerjavečega jekla v primerjavi z elektrodami iz aluminija. Zanimalo nas je, ali celice po elektroporaciji z elektrodami iz nerjavečega jekla v inkubacijski medij izločijo odvečne železove ione Fe^{2+} in ali imajo ioni Fe^{2+} ključen citotoksičen vpliv na celice iz sveže celične kulture.

2 Materiali in metode

2.1 Celice

Za vse poskuse smo uporabili celice CHO, celično linijo, pridobljeno iz ovarijev kitajskega hrčka. Celice smo 2–4 dni gojili v posodicah s površino 25–150 mm² (TPP, Švica) v inkubatorju (Kambič, Slovenija) pri 37°C, in atmosferi s 5 % CO₂. Rastni medij, HAM F-12 (Ham's Nutrient Mixtures) (PAA, Avstrija), smo obogatili z 10 % govejim serumom (Sigma Aldrich, Nemčija), L-glutaminom (StemCell, Kanada) in antibiotikoma penicilinom/streptomycinom (PAA, Avstrija) in gentamicinom (Sigma Aldrich, Nemčija). Za poskuse

smo celice tripsinizirali v eksponentni fazi rasti (5 g tripsina/2 g EDTA v 0,9 % NaCl (Sigma Aldrich, Nemčija), 10-krat razredčen v Hankovi solni raztopini (Sigma Aldrich, Nemčija). Tripsin in rastni medij smo iz celične suspenzije odstranili s centrifugiranjem (200 g, 5 min pri sobni temperaturi) (Sigma 3–15 K, Združeno kraljestvo). Celično usedlino smo resuspendirali v rastnem mediju, da smo dobili koncentracijo 10^7 celic/ml.

2.2 Elektroporacija celic

100 μ l celične suspenzije smo odmerili med dve vzporedni ploščati elektrodi iz nerjavečega jekla 304 z razdaljo med notranjima robovoma elektrod nastavljeno na 4 mm ali v elektroporacijsko kiveto iz aluminija z razdaljo med elektrodama 4 mm (VWR International, Belgija). Monopolarne pravokotne pulze trajanja 5 ms smo generirali z laboratorijskim prototipnim pulznim generatorjem (LBK, Univerza v Ljubljani). Generirali smo 8 pulzov z amplitudo 300 V (jakost električnega polja: 0,75 kV/cm), ki so si sledili s frekvenco 1 Hz. Aplikacijo električnih pulzov smo spremljali z ustreznim osciloskopom (Wavesurfer 422, 200 MHz, LeCroy, ZDA). Vrednost toka smo merili s tokovno sondo CP030 (LeCroy, ZDA).

Ustrezno napetost smo določili na podlagi rezultatov raziskave o preživetju celic pri različnih napetostih in dolžinah pulzov [8]. Izbrali smo amplitudo, pri kateri je celično preživetje približno 20 %.

2.3 Preživetje celic v inkubacijskem mediju

Štiri vzorce elektroporiranih celic smo združili in s centrifugiranjem (200 g, 5 min pri sobni temperaturi) (Sigma 3–15 K, Združeno kraljestvo) ločili celice od medija v katerem je bila izvedena elektroporacija. Elektroporacijski medij smo odstranili, celični usedlini dodali 1 ml ravnega medija, ki je namesto običajnega govejega seruma vseboval 10 % govejega seruma brez eksosomov (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.) in jo inkubirali 2 uri v inkubatorju (Kambič, Slovenija) pri 37°C in atmosferi s 5 % CO₂. Po inkubaciji smo inkubacijski medij filtrirali skozi filter s porami velikosti 0,8 μ m (VWR International), s čimer smo iz inkubacijskega medija odstranili celice in večje vezikle.

Kontrolni vzorec smo pripravili tako, da smo celično suspenzijo odpipetirali med elektrode, a je nismo elektroporirali. Nato je sledil enak postopek kot pri vzorcih elektroporiranih celic. Pri vsakem poskusu smo pripravili tri vzorce in eno kontrolo za obe vrsti elektrod.

Na mikrotitrsko ploščo s 96 posodicami smo v 300 μ l inkubacijskega medija nasadili $2 \cdot 10^3$ sveže tripsiniziranih celic. Preživetje celic smo 72 ur po nasaditvi določili s kalorimetričnim testom MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) (Promega, ZDA). Absorbanco vzorcev smo izmerili s spektrofotometrom Tecan Infinite M200 (Tecan, Švica) pri valovni dolžini 490 nm. Absorbanca je večja, če je v vzorcu proizvedene več obarvane snovi formazan, ki jo iz ene od komponent dodanega testa proizvedejo metabolno aktivne celice.

Večje kot je število metabolno aktivnih celic, večja je obarvanost in s tem absorbanca vzorca.

2.4 Citotoksičnost ionov Fe²⁺

Pripravili smo 0,1 M raztopino FeCl₂ (Sigma Aldrich, Nemčija) v fiziološki raztopini (0,9 % NaCl) (B. Braun). Za študijo vpliva železovih ionov Fe²⁺ na proces elektroporacije in preživetje celic smo pripravili še 0,05, 0,1, 0,5, 1 in 5 mM redčitve osnovne raztopine FeCl₂ v rastnem mediju. Preživetje celic v rastnem mediju z različnimi koncentracijami FeCl₂ smo določili s testom klonogenosti. Na plošče s 6 vdolbincami smo v 2 ml ustreznega medija nasadili 100 celic ter jih pustili rasti v inkubatorju (Kambič, Slovenija) pri 37°C in atmosferi s 5 % CO₂ 6 dni. Po 6 dneh smo medij odstranili ter kolonije fiksirali in obarvali z 1 ml raztopine 0,2 % barvila kristal vijolično (Sigma Aldrich, Nemčija) v 80 % etanola (Sigma Aldrich, Nemčija). Po 10 min smo posodice sprali z vodo in jih osušili.

Krivuljo za prikaz vpliva koncentracije ionov Fe²⁺ na celično preživetje smo opisali z enačbo

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + ([Fe^{2+}]/EC_{50})^{-s}}, \quad (1)$$

kjer V_{\max} predstavlja največjo vrednost celičnega preživetja, $[Fe^{2+}]$ koncentracijo železovih ionov Fe²⁺, EC_{50} točko krivulje na polovici med V_{\max} in 0 in s naklon krivulje, ki definira strmino pri $[Fe^{2+}] = EC_{50}$. Parametre smo določili z metodo najmanjših kvadratov.

Elektroporacijo ob prisotnosti ionov Fe²⁺ in študijo preživetja celic v inkubacijskem mediju smo izvedli po postopkih, ki so opisani v podpoglavjih 2.2 in 2.3.

2.5 Statistične metode

Za analizo smo uporabili programski paket MatLab R2023a. Rezultate smo prikazali s škatelnimi diagrami, pri katerih smo upoštevali mediano ter prvi in tretji kvartil treh oziroma štirih ponovitev poskusa.

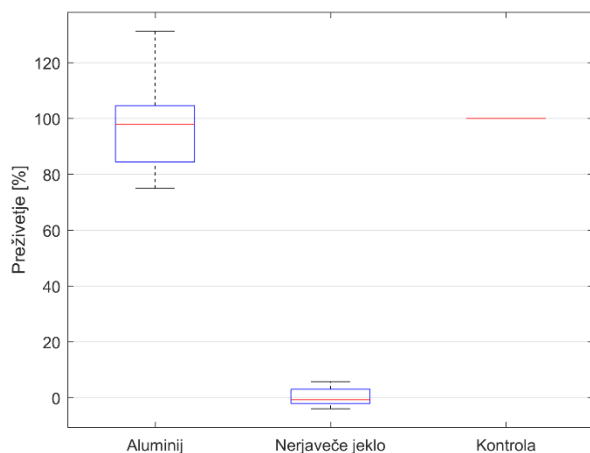
Pri poskusu preživetja celic v inkubacijskem mediju celic iz sveže celične kulture po elektroporaciji z elektrodami iz aluminija v primerjavi z elektrodami iz nerjavečega jekla, smo imeli ločene kontrolne vzorce za vsako vrsto elektrod. Z uporabo studentovega t-testa smo s p-vrednostjo 0,4 določili, da med kontrolama ni statistično značilnih razlik in ju združili za namen analize.

Za analizo rezultatov testov preživetja smo uporabili statistični test ANOVA, ki mu je v primeru statistično značilnih razlik sledila Tukeyeva posteriori analiza.

3 Rezultati

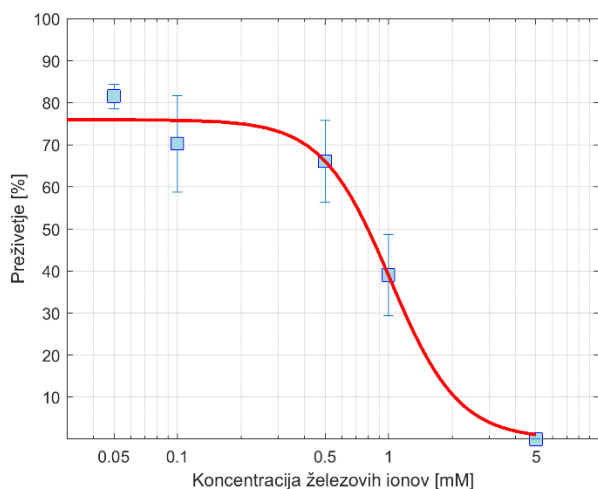
Slika 1 prikazuje celično preživetje celic iz sveže celične kulture nasajenih v inkubacijski medij, tj. medij, v katerem so bile celice po elektroporaciji z osmimi 5 ms pulzi napetosti 300 V in frekvenco 1 Hz, inkubirane 2 uri. Rezultati so normirani na kontrolo, tj. količino metabolno aktivnih celic, ki so bile nasajene v inkubacijski medij kontrolnih vzorcev, po 72 urah.

Rezultati kažejo, da je preživetje celic iz sveže celične kulture nasajenih v inkubacijski medij, v katerem so okrevale celice po elektroporaciji z elektrodami iz aluminija, $97 \pm 18 \%$. V inkubacijskem mediju po elektroporaciji z elektrodami iz nerjavečega jekla, pa so odmrle vse celice iz sveže celične kulture. S stopnjo značilnosti 0,05 lahko trdimo, da so razlike med razredi statistično značilne – material elektrod statistično značilno vpliva na preživetje celic iz sveže celične kulture v inkubacijskem mediju po elektroporaciji.



Slika 1. Primerjava preživetja celic iz sveže celične kulture v inkubacijskem mediju po elektroporaciji z elektrodami iz aluminija in elektrodami iz nerjavečega jekla

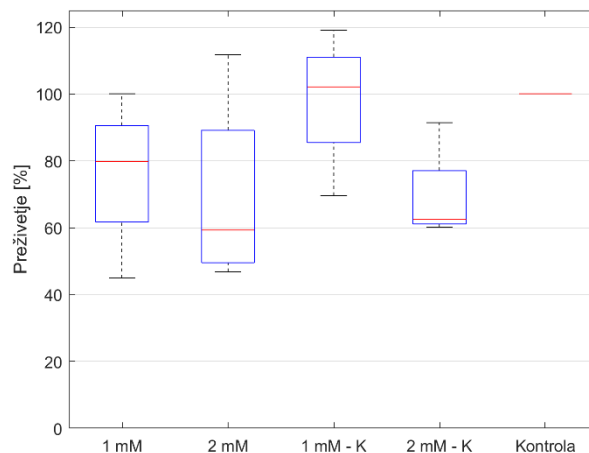
Rezultati testa klonogenosti, s katerim smo določili celično preživetje po 6-dnevni izpostavitvi različnim koncentracijam raztopine FeCl_2 , so prikazani na sliki 2. S povečevanjem koncentracije ionov Fe^{2+} se celično preživetje skokovito zmanjšuje. Pri 1 mM raztopini FeCl_2 v rastnem mediju je preživetje celic približno 40 %. Pri 5 mM koncentraciji odmrjejo vse celice. S prilagoditvijo krivulje (1) smo določili, da že pri 2 mM koncentraciji FeCl_2 v rastnem mediju, preživetje celic pade na približno 10 %.



Slika 2. Vpliv koncentracije železovih ionov Fe^{2+} (logaritemska skala) na celično preživetje

Slika 3 prikazuje celično preživetje celic iz sveže celične kulture v inkubacijskem mediju, v katerem so

okrevale celice po elektroporaciji z elektrodami iz aluminija ob prisotnosti 1 mM ali 2 mM koncentracije ionov Fe^{2+} , pri čemer kontrolo predstavljajo celice iz sveže celične kulture, nasajene v običajen rastni medij.



Slika 3. Preživetje celic iz sveže celične kulture v inkubacijskem mediju po elektroporaciji ob prisotnosti 1 mM in 2 mM koncentracije ionov Fe^{2+} in v kontrolnih vzorcih

Preživetje celic iz sveže celične kulture nasajenih v inkubacijski medij, v katerem so okrevale celice po elektroporaciji ob prisotnosti 1 mM koncentracije ionov Fe^{2+} , je $81 \pm 15 \%$. V inkubacijskem mediju, v katerem so okrevale celice po elektroporaciji ob prisotnosti 2 mM raztopine FeCl_2 , je preživetje celic iz sveže celične kulture $69 \pm 29 \%$. Preživetje celic iz sveže celične kulture v kontrolnem inkubacijskem mediju celic, ki niso bile elektroporirane, temveč le 5 min izpostavljene 1 mM ali 2 mM koncentraciji FeCl_2 (1 mM – K, 2 mM – K), je $98 \pm 21 \%$ oziroma $69 \pm 15 \%$. Rezultati niso pokazali statistično značilnih razlik (p-vrednost = 0,1) pri stopnji značilnosti 0,05.

4 Razprava

Porušena selektivna prepustnost celične membrane je en izmed najbolj raziskanih vzrokov za celično smrt po elektroporaciji, vendar rezultati študij kažejo, da na preživetje celic v mediju po elektroporaciji vplivajo tudi drugi dejavniki, npr. naboj, ki med elektroporacijo steče skozi vzorec in sprememba sestave tretirane celične suspenzije, ki je posledica elektrokemijskih reakcij na površini elektrod in v celični suspenziji [2], [9].

Med mehanizme poškodb celic spadajo poškodbe membrane, iztekanje ATP in drugih energetsko bogatih molekul iz celic, poškodbe molekul DNK in proteinov v notranjosti celic itd. Celična smrt po elektroporaciji je lahko odvisna od posameznega mehanizma ali kombinacije različnih mehanizmov celičnih poškodb, na kar lahko vpliva material elektrod, različne amplitude, frekvenca in trajanje elektroporacijskih pulzov, zaradi česar je težko natančno opredeliti vzrok za nastajanje in popraviljanje poškodb celic po elektroporaciji in posledično njihov vpliv na preživetje celic iz sveže celične kulture v inkubacijskem mediju [1].

V naši raziskavi smo preučevali, ali celice po elektroporaciji z različnimi elektrodami izločajo v inkubacijski medij snovi, ki vplivajo na preživetje celic iz sveže celične kulture. Izkazalo se je, da po elektroporaciji z elektrodami iz nerjavečega jekla, inkubacijski medij postane citotoksičen in povzroči smrt celotne celične populacije, po elektroporaciji z elektrodami iz aluminija pri enakih pogojih, pa ne.

Preizkusili smo, kako na preživetje celic iz sveže celične kulture v inkubacijskem mediju vpliva prisotnost ionov Fe^{2+} v celični suspenziji med elektroporacijo z elektrodami iz aluminija. Zanimalo nas je, če je tudi tak inkubacijski medij citotoksičen in na celice iz sveže celične kulture vpliva podobno kot inkubacijski medij po elektroporaciji z elektrodami iz nerjavečega jekla, kar bi pomenilo, da je glavni vzrok za celično smrt celic iz sveže celične kulture v inkubacijskem mediju v primeru uporabe elektrod iz nerjavečega jekla, povečana koncentracija ionov Fe^{2+} . Splošna ocena citotoksičnosti raztopine FeCl_2 s slike 2 kaže, da 1 mM koncentracija FeCl_2 v rastnem mediju zmanjša preživetje celic na približno 40 %, pri 2 mM koncentraciji FeCl_2 v rastnem mediju, pa je preživetje celic le še okoli 10 %. Pri teh dveh koncentracijah smo izvedli elektroporacijo celic z elektrodami iz aluminija, poracijski medij po 5 minutah odstranili in pustili celice 2 uri okrevati v svežem rastnem mediju brez eksosomov. Tako smo dobili inkubacijski medij, v katerega smo nasadili celice iz sveže celične kulture in tri dni opazovali njihovo rast.

Glede na preživetje celic iz sveže celične kulture v inkubacijskem mediju po elektroporaciji z elektrodami iz aluminija ob prisotnosti 1 mM in 2 mM koncentracije ionov Fe^{2+} , smo ugotovili, da preizkušeni koncentraciji še ne povzročita citotoksičnosti inkubacijskega medija.

V našem primeru je vrednost naboja C , ki steče skozi vzorec med elektroporacijo 125 mC. Naboj smo izračunali z enačbo

$$C = U \cdot N \cdot t_{\text{imp}} / R, \quad (2)$$

kjer U predstavlja napetost, s katero smo dovajali električne pulze, N število pulzov, t_{imp} njihovo trajanje in R upornost vzorca, ki smo jo izračunali na podlagi izmerjenih vrednosti toka med elektroporacijo. Gostoto naboja smo izračunali glede na količino elektroporirane celične suspenzije in dobili vrednost 1250 C/l. Na podlagi raziskave iz članka [2], smo ocenili, da je bila ob elektroporaciji z elektrodami iz nerjavečega jekla koncentracija železovih ionov (bodisi Fe^{2+} bodisi Fe^{3+}) v celični suspenziji 3,2 mM.

Ugotovili smo, da elektroporacija z elektrodami iz nerjavečega jekla povzroči izločanje citotoksičnih snovi v inkubacijski medij, v katerem celice iz sveže celične kulture odmrejo, medtem ko prisotnost sicer citotoksične koncentracije ionov Fe^{2+} v celični suspenziji med elektroporacijo z elektrodami iz aluminija ni statistično značilno vplivala na preživetje celic iz sveže celične kulture v inkubacijskem mediju. V prihodnje bi bilo smiselno preizkusiti še vpliv inkubacijskega medija po elektroporaciji ob prisotnosti 3,2 mM koncentracije

ionov Fe^{2+} . Glede na dosedanje rezultate sklepamo, da povečana koncentracija ionov Fe^{2+} v celični suspenziji po elektroporaciji z elektrodami iz nerjavečega jekla ni edini razlog za nizko preživetje celic iz sveže celične kulture v inkubacijskem mediju. Te ugotovitve kažejo na kompleksnost učinkov elektroporacije in pomena upoštevanja različnih parametrov pri načrtovanju in izvedbi elektroporacijskih postopkov.

Literatura

- [1] T. Batista Napotnik, T. Polajžer, and D. Miklavčič, "Cell death due to electroporation - A review," *Bioelectrochemistry Amst. Neth.*, vol. 141, p. 107871, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.bioelechem.2021.107871.
- [2] G. Saulis, R. Rodaitė-Riševičienė, and R. Saulė, "Cytotoxicity of a Cell Culture Medium Treated with a High-Voltage Pulse Using Stainless Steel Electrodes and the Role of Iron Ions," *Membranes*, vol. 12, no. 2, p. 184, Feb. 2022, doi: 10.3390/membranes12020184.
- [3] R.-R. Raminta, R. Saulė, V. Snitka, and G. Saulis, "Release of Iron Ions From the Stainless Steel Anode Occurring During High-Voltage Pulses and Its Consequences for Cell Electroporation Technology," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 42, pp. 249–254, Jan. 2014, doi: 10.1109/TPS.2013.2287499.
- [4] D. Y and G. Z, "Recent progress in ferroptosis: inducers and inhibitors," *Cell Death Discov.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41420-022-01297-7.
- [5] C. W. Brown and A. M. Mercurio, "Ferroptosis resistance mediated by exosomal release of iron," *Mol. Cell. Oncol.*, vol. 7, no. 3, p. 1730144, Mar. 2020, doi: 10.1080/23723556.2020.1730144.
- [6] A. G. Yates *et al.*, "In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo: Part I: Health and Normal Physiology: Part I: Health and Normal Physiology," *J. Extracell. Vesicles*, vol. 11, no. 1, p. e12151, Jan. 2022, doi: 10.1002/jev2.12151.
- [7] A. J. Lennaárd, D. R. Mamand, R. J. Wiklander, S. EL Andaloussi, and O. P. B. Wiklander, "Optimised Electroporation for Loading of Extracellular Vesicles with Doxorubicin," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 1, p. 38, Dec. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics14010038.
- [8] T. Potočnik, D. Miklavčič, and A. Maček Lebar, "Gene transfer by electroporation with high frequency bipolar pulses in vitro," *Bioelectrochemistry*, vol. 140, p. 107803, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.bioelechem.2021.107803.
- [9] A. Vižintin, J. Vidmar, J. Ščančar, and D. Miklavčič, "Effect of interphase and interpulse delay in high-frequency irreversible electroporation pulses on cell survival, membrane permeabilization and electrode material release," *Bioelectrochemistry*, vol. 134, p. 107523, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107523.