

# Elektrotehnika v medicini in biologiji

*V prispevku predstavljamo raziskovalno dejavnost Laboratorija za biokibernetiko na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Med več področji, na katera segajo naše raziskave, se bomo tukaj osredotočili na tisto, ki je trenutno najaktualnejše. To je elektroporacija celične membrane (plazmaleme), s katero tako v in vitro kot v in vivo pogojih omogočimo vnos molekul, ki drugače ne morejo vstopiti v biološko celico zaradi selektivne prepustnosti njene membrane. Elektroporacija celic je sorazmerno nova metoda, ki se je hitro uveljavila v biokemičnih in celičnih laboratorijih, pričenjajo pa jo uporabljati tudi v medicinske namene. V onkologiji z elektroporacijo povečajo vnos nekaterih kemoterapevtikov in s tem povečajo učinkovitost zdravljenja raka (elektrokemoterapija tumorjev), v biotehnologiji jo uporabljajo za vnos DNK in s tem gensko spreminjanje celic, v zadnjem času pa skušajo z vnosom DNK v celice odpraviti tudi genetske okvare (genska terapija). Vidna vloga elektrotehnikov na tem področju bo koga morda presenetila, vendar je za učinkovito elektroporacijo potrebno rešiti vrsto inženirskih problemov. Ostale dejavnosti našega laboratorija si lahko ogledate na naši spletni strani <http://lbk.fe.uni-lj.si>.*

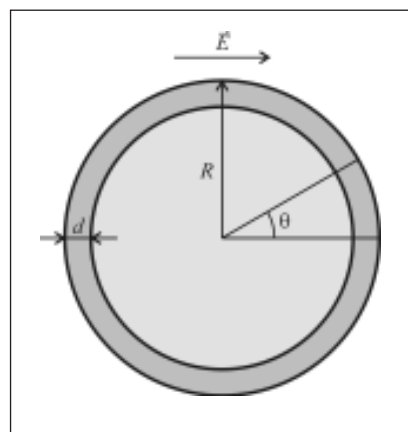
## 1. Elektroporacija in njena uporaba

Eden od pomembnih mejnikov v zgodovini nastanka življenja je bil nastanek plazmaleme — membrane, ki obdaja celico. Plazmalema tvori tanka, tekoča dvojna plast posebnih maščob, v kateri se nahajajo številne beljakovine, ki opravljajo najrazličnejše naloge. Med njimi so tudi takšne, ki skrbijo za prenos snovi prek membrane. Vsaka od teh beljakovin omogoča le prenos ene same snovi, zato je plazmalema selektivno prepustna, kar celici omogoča, da nadzira izmenjavo snovi med svojo notranjostjo in okolico. S tem celica v svoji notranjosti vzdržuje sorazmerno stabilne pogoje ne glede na spremembe v okolici, snovi, ki jih v naravi ne zasledimo, pa praktično ne morejo vstopiti. Poleg izredno nizke prepustnosti za tuje molekule ima plazmalema tudi zelo nizko električno prevodnost tako v primerjavi z notranjostjo celice kot z njeno okolico. Če na celico deluje električno polje, se plazmalema obnaša kot izolator, na njej pa nastane t.i. vsiljena transmembranska napetost, ki jo lahko v primeru, da je celica okrogla, opišemo z izrazom

$$\Delta\Phi_m(t) = \frac{3}{2} ER \cos \theta \left[ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right], \quad (1)$$

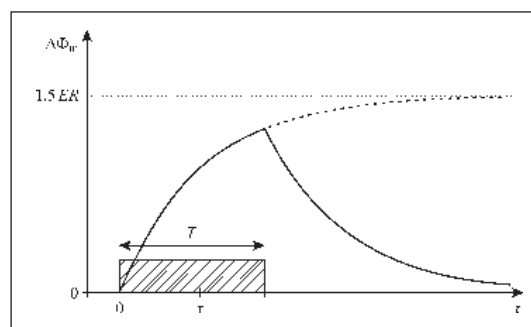
kjer je  $E$  jakost električnega polja,  $R$  polmer celice,  $\theta$  kot med smerjo vektorja jakosti električnega polja ter daljico, ki povezuje središče celice in obravnavano točko na membrani (slika 1),  $t$  čas od vklopa električnega polja,  $\tau$  pa časovna konstanta membrane. Slednja je odvisna od prevodnosti in kapacitivnosti membrane ter snovi, ki jo obdaja, znaša pa med nekaj desetink mikrosekunde in nekaj mikrosekund.

Iz izraza (1) sledi, da je velikost vsiljene transmembranske napetosti sorazmerna z jakostjo električnega polja in z velikostjo celice, hkrati pa se spreminja tudi



Slika 1: Okrogla celica v električnem polju.

z lego opazovane točke na membrani (sorazmerno s kosinusom kota  $\theta$ ). Zaradi časovne konstante  $\tau$  vsiljena transmembranska napetost, ki jo ustvari stopničast napetostni pulz, ne nastane v trenutku, temveč svojo končno vrednost doseže v nekaj mikrosekundah, kot shematsko prikazuje slika 2. Zanimivo je, da kratkotrajna vsiljena transmembranska napetost do nekaj sto milivoltov ne povzroči opaznih posledic. Če pa ta napetost preseže neko kritično vrednost, ki znaša v različnih pogojih med 200 mV in 1 V, se prepustnost in prevodnost plazmaleme skorajda v trenutku močno povečata. Plazmalema prične takrat neselektivno prepuščati vse vrste molekul in ionov. Ta pojav, ki mu pravimo elektroporacija ali elektropermeabilizacija, nam omogoča, da v celico vnesemo snovi, ki jih plaz-

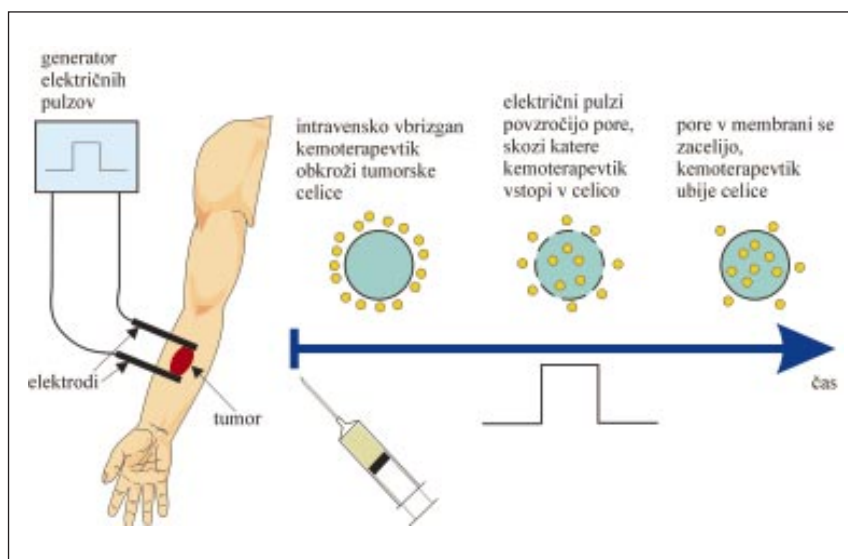


Slika 2: Zvezna črta prikazuje časovni potek vsiljene transmembranske napetosti  $\Delta\Phi_m$  pri  $\theta=0$  v primeru, ko celico izpostavimo napetostnemu pulzu trajanja  $T$  (shematsko ga prikazuje šrafirani pravokotnik). Črčkasto je prikazan še potek  $\Delta\Phi_m$  v primeru, ko pulza po času  $T$  ne bi izklopili.

malema sicer ne prepušča. Če amplituda in trajanje napetostnih pulzov nista prevelika, pride po končanem električnem pulzu do spontane zacelitve plazmaleme in ponovne vzpostavitve selektivne prepustnosti plazmaleme – govorimo o reverzibilni elektroporaciji, saj celica preživi. V kolikor uporabimo premočne ali predolge pulze, pa do zacelitve plazmaleme ne pride in celica odmre. V tem primeru govorimo o ireverzibilni elektroporaciji.

In zakaj bi želeli v celico vnesti snovi, ki jih plazmalema ne prepušča? Trenutno je v ospredju vnos tuje DNK, torej tujega dednega zapisa. V biotehnologiji ta proces uporabljajo pod imenom genska transfekcija, z veliko nestrpnostjo pa pričakujemo tudi njegovo uporabo v zdravstvu – gensko terapijo. Elektroporacija ni edini možni način vnosa DNK v celico, vendar pa ima kar nekaj prednosti pred ostalimi načini vnosa. Tako je vnos DNK prek okužbe celic z virusi, pri katerih je preostali dedni zapis delno onesposobljen, še pred kratkim veljal za najobetavnejšo tovrstno metodo, lani pa je v javnosti močno odjeknila tragična zgodba Jesseja Gelsingerja, ameriškega najstnika, ki je podlegel stranskim učinkom takšne terapije.

Drugo pomembno področje, kjer uporabljamo elektroporacijo za vnos tujih molekul, je onkologija. Eden od standardnih načinov zdravljenja raka je kemoterapija, ki se poleg kirurgije in obsevanja najpogosteje uporablja. Med kemoterapevtiki so tudi takšni, ki tumorske celice ubijejo med njihovo delitvijo. Takšnim kemoterapevtikom pravimo citostatiki. Nekateri med njimi so sicer v notranjosti celice zelo učinkoviti, vendar jih plazmalema skorajda ne prepušča v celico. Učinkovitost takšnih kemoterapevtikov lahko zato zelo izboljšamo, če njihov vnos v organizem kombiniramo z elektroporacijo. Tak pristop, ki ga imenujemo elektrokemoterapija (slika 3), skupaj s strokovnjaki iz Onkološkega inštituta že uporabljamo tudi v kliničnem okolju in smo pri uvajanju te nove metode zdravljenja raka med vodilnimi v svetu. Elektroporacija znatno poveša učinkovitost delovanja kemoterapevtika, zato uspešno zdravljenje dosežemo s precej nižjimi količinami kemoterapevtika, s tem pa tudi zmanjšamo neželene stranske učinke zdravljenja.



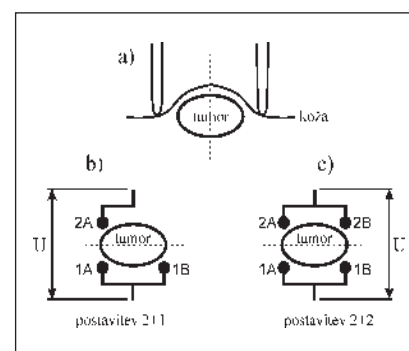
Slika 3: Elektrokemoterapija

## 2. Elektrode in izračun električnega polja v tkivu

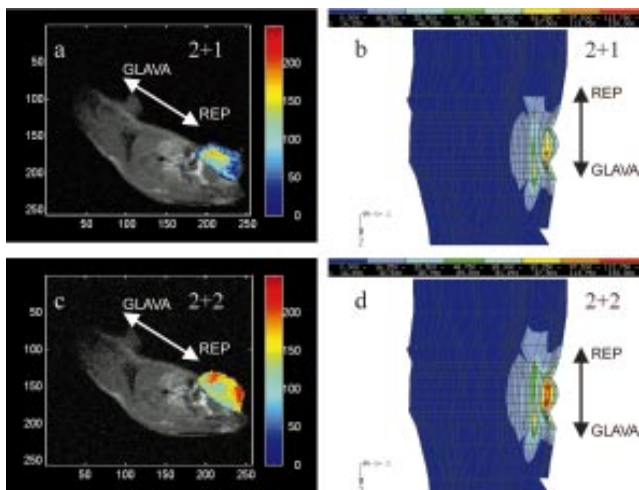
Povedali smo, da je elektroporacija pojav, ki poveča prepustnost plazmaleme in omogoči vnos molekul, ki drugače zelo počasi prehajajo skozi njo, do tega pojava pa pride zaradi izpostavitve celice dovolj velikemu električnemu polju. In kako celice izpostavimo električnemu polju? Celice, ki se nahajajo v suspenziji (plavajo v elektrolitski raztopini), postavimo med dve elektrodi, na kateri privedemo napetost. Če sta elektrodi ploščati in dovolj veliki glede na njuno medsebojno razdaljo, je električno polje, v katerem se nahajajo celice, skoraj homogeno. Njegova jakost je približno enaka razmerju med napetostjo na elektrodah in razdaljo med elektrodama. Če poznamo še velikost in obliko celic, lahko z uporabo izraza (1) ocenimo tudi transmembransko napetost, ki jo bomo s takšno izpostavitvijo vsilili.

Elektroporacijo lahko uporabimo tudi na celicah v tkivu. V tem primeru napetost privedemo na želeni del tkiva tako, da elektrodi pritisnemo ob kožo nad tkivom, ali pa uporabimo elektrode v obliki igel, ki jih vbodemo skozi kožo. Ne glede na to, kateri pristop uporabimo, porazdelitev električnega polja v tkivu in njegovi okolici ponavadi ni homogena, temveč jo določajo oblika elektrod, njihova medsebojna razdalja in električne lastnosti tkiva. Pri določitvi porazdelitve električnega polja si pomagamo z numeričnim modeliranjem na računalniku. V eni izmed mnogih študij smo tako primerjali porazdelitev polja pri dveh

različnih postavitvah točkovnih elektrod, ki ju podaja slika 4. Vzporedno smo izvedli še eksperimentalno študijo, v kateri smo primerjali učinkovitost elektrokemoterapije podkožnih tumorjev na miših, ki jo dosežemo s takšnimi postavitvama. Rezultati študije, ki jih povzema slika 5, so pokazali, da jakost električnega polja močno vpliva na učinkovitost elektrokemoterapije v tumorju. Podobne izračune smo naredili za vrsto drugih elektrod, ki so jih za elektrokemoterapijo uporabili naši kolegi, raziskovalci iz Univerze South Florida v ZDA. Tudi analiza teh rezultatov je potrdila, da je učinkovitost elektroporacije celic v tkivu, s tem pa tudi elektrokemoterapije, odvisna od porazdelitve električnega polja v tkivu. Omenjeni izračuni in poskusi dokazujejo, da lahko z oblikovanjem in namestitvijo elektrod določimo prostornino tkiva, ki ga želimo elektroporirati, z ustrežno izbiro položaja elektrod pa nam je dostopno takorekoč katerokoli tkivo oziroma organ v telesu.



Slika 4: Shematski prikaz dveh različnih postavitvev elektrod: (a) stranski ris obeh postavitvev, (b) tloris postavitve "2+1" in (c) tloris postavitve "2+2".



Slika 5: Gostota električnega toka, ki jo v tkivu dosežemo s postavitvama "2+1" in "2+2". Levo so prikazani rezultati meritev z metodo magnetne resonance, desno pa napovedi numeričnega modela.

### 3. Električni pulzi in generatorji (elektroporatorji)

Pri prvih poskusih elektroporacije celic tako v suspenziji kot tudi v tkivu so napetostne pulze generirali kar tako, da so prek celic v suspenziji oziroma tkiva izpraznili velik kondenzator (slika 6). Pri teh elektroporatorjih je napetost pulza eksponentno upadala s časom, časovna konstanta tega upadanja pa je bila seveda odvisna od prevodnosti suspenzije oziroma tkiva. Kasneje so se na tržišču pojavili generatorji enosmernih pravokotnih pulzov, pri katerih sta bili amplituda in trajanje pulzov že jasno določeni, moč pa ju je bilo tudi spreminjati. Nekateri so omogočali še izbiro števila pulzov, v določenem območju pa tudi njihovo ponavljalno frekvenco. Raziskave so se nadaljevale in kar nekaj skupin je poskušalo določiti tisto amplitudo, trajanje in število pulzov, pri katerih bi bila elektroporacija kar najbolj učinkovita. Izkazalo se je, da so daljši eksponentno upadajoči pulzi učinkovitejši pri vnosu velikih električno nabitih molekul, npr. DNK, krajši pravokotni pulzi v vlaklu pa so primernejši za vnos manjših molekul, npr. nekaterih kemoterapevtikov. Na trgu je trenutno več elektroporatorjev obeh vrst pulzov za delo na celičnih suspenzijah, ponudba naprav za delo na tkivih, predvsem v kliničnem okolju, pa je še precej šibka, tako da je razvoj elektroporatorjev trenutno v polnem teku.

In kaj je tako posebnega pri elektroporatorjih? Kot smo že omenili, elektroporacija nastopi, če transmembranska napetost pre-

seže vrednost med 200 in 1000 mV, izraz (1) pa pove, da za vsilitev tolikšne napetosti pri tipičnem polmeru celice 10 μm potrebujemo električno polje jakosti med 400 in 2000 V/cm. Če v ta namen uporabimo elektrodi z medsebojno razdaljo 1 cm, ki sta razmeroma veliki glede na to razdaljo, moramo na elektrodi priključiti napetost med 400 in 2000V. Pri tem dose-

bej pri zdravljenju z igelnimi elektrodami, kjer prebodemo kožo, ki sicer služi kot naravna zaščita.

Varnostne zahteve za medicinske naprave so določene s standardoma IEC-601-1 in IEC-601-23, ki glede na vrsto zaščite delita te naprave v razrede, glede na stopnjo zaščite pa na tipe. Glede na vrsto zaščite sodi klinični elektroporator v II. razred, kar pomeni, da je zaščiten z dvojno ali ojačeno izolacijo. Glede na stopnjo zaščite ga uvrščamo v tip CF, kar pomeni, da ozemljitveni tok ne sme preseči 500 μA, okrovni tok ne sme preseči 100 μA brez okvare in 500 μA pri enojni okvari, patientski tok pa ne sme preseči 10 μA brez okvare in 50 μA pri enojni okvari. Ozemljitveni, okrovni in patientski tok prikazuje slika 7.

### 4. Vnos snovi z elektroporacijo

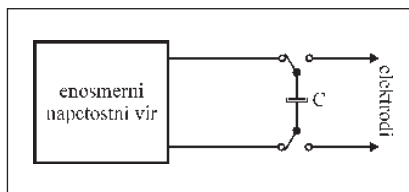
Kot pove izraz (1), je vsiljena transmembranska napetost na različnih delih membrane različna, kritična vrednost, ki privede do elektroporacije, pa je najprej presežena na polih celice v smeri proti elektrodama (na področjih okoli  $\theta = 0^\circ$  in  $\theta = 180^\circ$ ). Tako lahko pri znani kritični vrednosti vsiljene transmembranske napetosti in jakosti električnega polja določimo površino tistega dela membrane, ki bo elektroporirana in preko katere bo potekal transport. Ker poteka transport ionov in manjših molekul preko membrane predvsem z difuzijo, lahko z vidika posamezne celice suspenzijo ponazorimo z dvema prostoroma - notranjostjo in zunanostjo celice, kot je prikazano na sliki 8.

Transport snovi preko membrane tedaj opišemo z enačbama

$$\frac{dC_i(t)}{dt} = -k_{oi} \cdot C_o(t) + k_{io} \cdot \frac{V_o}{V_i} \cdot C_i(t)$$

$$\frac{dC_o(t)}{dt} = k_{oi} \cdot \frac{V_i}{V_o} \cdot C_o(t) + k_{io} \cdot C_i(t)$$

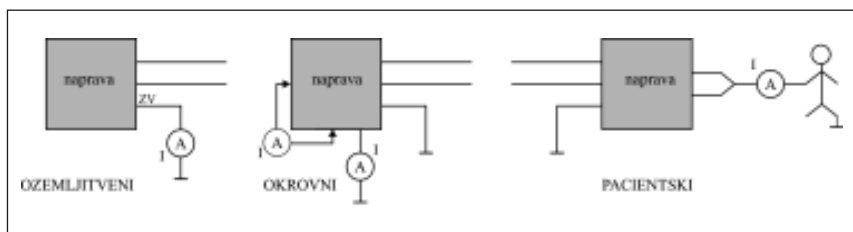
kjer sta  $C_i$  in  $C_o$  koncentraciji snovi v celični notranjosti in zunanosti,  $V_i$  in  $V_o$  pro-



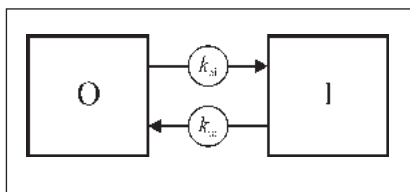
Slika 6: Prvi elektroporatorji so napetostne pulze generirali tako, da so prek celic v suspenziji oziroma prek tkiva izpraznili kondenzator s kapacitivnostjo nekaj sto μF ali celo nekaj mF.

že tok, ki steče preko elektrod in tkiva, tudi vrednosti do 15 A. Hkrati pravokotni pulzi, ki se običajno uporabljajo, trajajo le od nekaj deset μs do nekaj ms, zato zahtevajo kratke dvižne čase. Ko vse to združimo, dobimo zahteve, ki predstavljajo resen izziv za vsakega elektronika.

Poleg zahtev po zmogljivosti morajo generatorji, namenjeni elektroporaciji v kliničnem okolju, zadoščati tudi strogim varnostnim zahtevam, ki veljajo za medicinske naprave. Namen teh je zaščititi pred električnim udarom pacienta, zdravnika, ki upravlja z napravo, pa tudi druge osebe, ki lahko pridejo v stik z njo. Veliki tokovi, ki jih uporabljamo pri elektrokemoterapiji, so lahko v primeru nepravilne uporabe ali napake pri obratovanju zelo nevarni, še pose-



Slika 7: Shematski prikaz ozemljitvenega, okrovnega in patientskega toka.



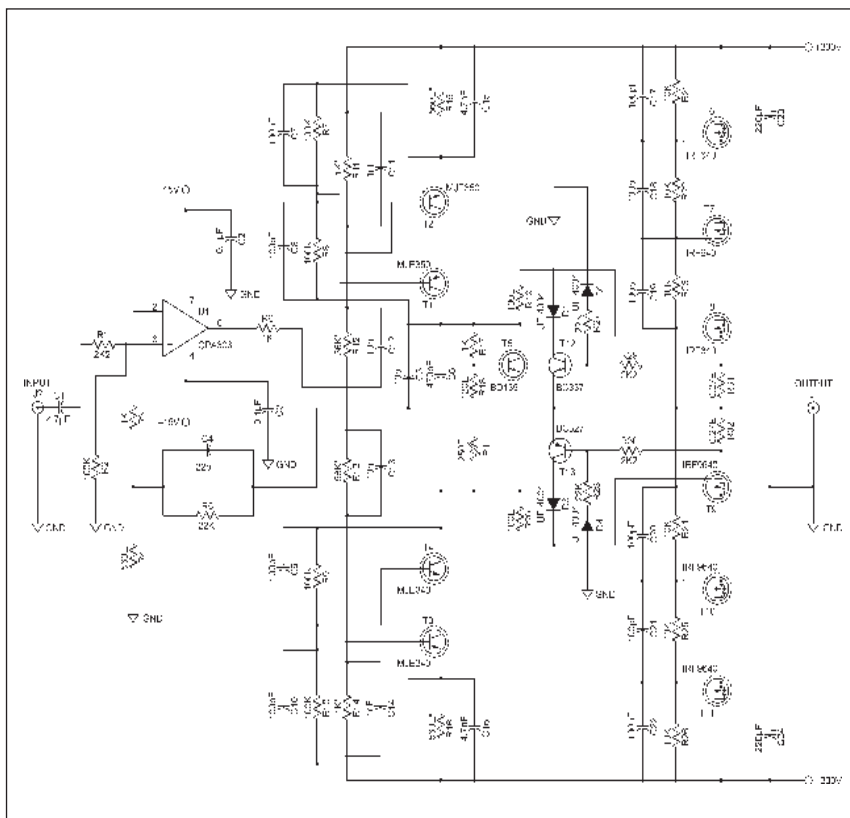
Slika 8: Pretok snovi preko elektroporirane membrane lahko preučujemo z dvoprostornim modelom. Prostor O ponazarja zunanost celice, prostor I pa njeno notranjost.

stornini teh dveh področij,  $k_{oi}$  in  $k_{io}$  pa koeficienta, ki določata hitrost pretoka v smeri iz notranjosti v zunanost in iz zunanosti v notranjost celice.

### 5. Trenutne raziskave in razvoj

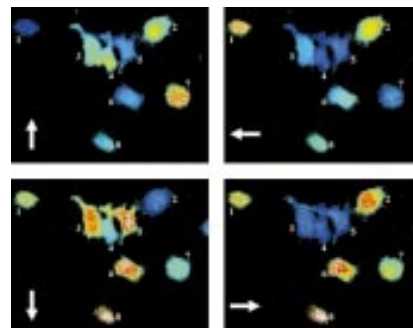
Raziskave, ki smo jih v zadnjem času opravili v našem laboratoriju, nekatere sami, nekatere pa v tesnem sodelovanju z nekaterimi najboljšimi tujimi skupinami na tem področju, so pripeljale do vrste pomembnih rezultatov, hkrati pa v našem laboratoriju intenzivno poteka tudi razvoj novih elektroporatorjev. Tako smo razvili hitri ojačevalni sistem, katerega vezje je prikazano na sliki 9. S tem vezjem ojačimo signal s programabilnega funkcijskega generatorja in tako omogočimo elektroporacijo z napetostnimi pulzi poljubne oblike. V prvi študiji smo ta sistem uporabili za primerjavo učinkovitosti elektroporacije celic v suspenziji z običajnimi unipolarnimi pravokotnimi pulzi ter s simetričnimi bipolarnimi pulzi enakega trajanja in amplitude. Pokazali smo, da je elektroporacija z bipolarnimi pulzi učinkovitejša, obenem pa je raztapljanje kovine z elektrod, ki je celicam v suspenziji lahko škodljivo, tako pri jeklenih kot pri aluminijastih elektrodah ob uporabi bipolarnih pulzov precej manj izrazito kot pri unipolarnih pulzih.

Višjo učinkovitost eksponentno upadajočih pulzov pri vnosu DNK v primerjavi s pravokotnimi lahko na osnovi teoretičnih dognanj in nekaterih poskusov pripišemo dolgotrajnosti eksponentno upadajočega pulza, saj se ta ne izklopi nenadoma, temveč le polagoma upada. Na električno nabite molekule, kakršna je DNK, v električnem polju namreč deluje sila, zaradi katere se prično molekule gibati. Višja učinkovitost eksponentno upadajočih pulzov pri vnosu DNK kaže, da v primeru velikih molekul to gibanje znatno pripomore k vstopu v notranjost celice. Takšni predpostavki v prid pričajo tudi rezultati poskusa, v



Slika 9: Vezje hitrega ojačevalnega sistema, ki skupaj s programabilnim funkcijskim generatorjem omogoča elektroporacijo s pulzi poljubne oblike (amplituda do  $\pm 280$  V).

celica	pulz	↑	←	↓	→	skupno
1		×	✓	✓	✓	✓
2		✓	✓	×	✓	✓
3		✓	×	✓	×	✓
4		✓	×	×	×	✓
5		×	×	✓	×	✓
6		×	×	✓	✓	✓
7		✓	×	×	✓	✓
8		×	×	✓	✓	✓



Slika 10: Elektroporacija osmih celic s štirimi različno usmerjenimi pulzi (puščica kaže od pozitivne elektrode proti negativni). Celice, ki s posameznim pulzom niso bile elektroporirane, so obarvane temno modro, elektroporirane celice pa svetleje (količina vnešene snovi narašča od svetlo modre proti rdeči). Tabela povzema uspešnost poskusa elektroporacije vsake od celic pri posamezni usmeritvi pulza, v zadnjem stolpcu pa še skupno uspešnost vseh štirih pulzov.

katerem so namesto eksponentno upadajočega pulza uporabili kratek visokonapetostni pravokotni pulz, ki mu je takoj sledil daljši pravokotni pulz nižje napetosti. Tudi s takšno kombinacijo pulzov so dosegli bistveno večji vnos DNK kot s samim visokonapetostnim pulzom.

Ker celice v tkivu niso okrogle, smo preučevali tudi možnosti izboljšave učinkovitosti elektroporacije v tkivu z dovajanjem električnih pulzov v različnih smereh. Poskusi, v katerih smo elektroporirali celice

različnih oblik, so pokazali, da z dovajanjem pulzov v različnih smereh znatno povečamo učinkovitost elektroporacije v tkivu (slika 10). V ta namen uporabimo več elektrod, ki jih izmenoma vključujemo, vsaka usmeritev pulza pa elektroporira določen delež celic v tkivu. Uporaba različnih usmeritev hkrati omogoča, da za učinkovito elektroporacijo tkiva uporabimo nižje napetosti, kot v primeru, ko bi tkivo elektroporirali z eno samo usmeritvijo pulza.

Avtor: Damijan Miklavčič