

Izpostavitev ravninskih lipidnih dvoslojev električnemu polju nanosekundnih pulzev

Peter Kramar^{1,2}, Matej Reberšek¹, Damijan Miklavčič¹, P. Thomas Vernier²

¹University of Ljubljana, Faculty of Electrical Engineering, Ljubljana, Slovenia

²Frank Reidy Research Center for Bioelectrics, Old Dominion University, Norfolk (VA), USA

E-pošta: peter.kramar@fe.uni-lj.si

Planar lipid bilayers exposed to nanosecond pulsed electric field

Abstract. *Planar lipid bilayers are often used to study electroporation phenomena. In this study, preliminary experiments were carried out to measure changes in planar lipid bilayer resistance and capacitance resulting from exposure to nanosecond pulsed electric fields. We also looked at the effects of calcium ions on bilayer electrical properties. The results of the measured planar lipid bilayer resistance and capacitance obtained after exposure to nanosecond pulse rises several new questions about basic understanding of membrane electroporation mechanism under nanosecond electric field, which requires additional work to be performed.*

1 Uvod

Izpostavitev bioloških celic električnemu polju se je izkazala kot uporabna tehnologija za manipulacijo s prepustnostjo celične membrane ter s tem potencialno široko uporabo v številnih biomedicinskih in biotehnoloških aplikacijah ter tudi v predelavi hrane [1,2]. Že kratkotrajna izpostavitev električnemu polju povzroči strukturne spremembe na nivoju lipidnih molekul v celični membrani. V odvisnosti od parametrov električnega polja (amplituda, trajanje, frekvenca) postane membrana začasno prepustna, tudi po zaključeni izpostavitvi električnemu polju, za molekule, ki običajno ne morejo prehajati celične membrane. Pojav imenujemo elektroporacija ali elektropermeabilizacija [3-5].

Kljub temu, da je dandanes elektroporacija široko uporabljena metoda v različnih biomedicinskih in biotehnoloških aplikacijah [1,2], vključno s predelavo hrane [6,7], so nekateri osnovni fizikalni in biološki ter molekularni mehanizmi prenosa snovi pri elektroporaciji še vedno niso v celoti razjasnjeni.

Elektroporacijo delimo na dve osnovni veji: mikrosekundno elektroporacijo ter nanosekundno elektroporacijo, pri čemer predpostavljamo, da so osnovni mehanizmi enaki. Pri mikrosekundni elektroporaciji uporabljamo električne pulze z električnim poljem manjšim od 1 MV/m ter mikrosekundnim trajanjem. Nanosekunda elektroporacija uporablja električno polje večje od 1 MV/m ter trajanjem manjše od 1 μ s [8]. Večina poizkusov v *in vitro* ter *in vivo* pogojih in aplikacij elektroporacije je bila narejena v mikrosekundnem

področju. V nanosekundnem področju pa so bili narejeni osnovni modeli elektroporacije z molekularno dinamiko poleg tega pa tudi poizkusi *in vitro* ter *in vivo* pogojih. Za premostitev razlik med nano in mikrosekundnim območjem in razlago dinamike dogodkov na celični membrani ob elektroporaciji, smo zasnovali poizkuse na ravninskih lipidnih dvoslojih tako, da smo jih izpostavili nanosekundnim pulzom.

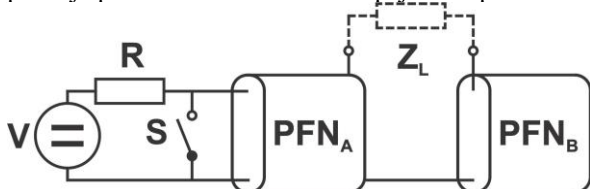
Ravninski lipidni dvosloj je umetna struktura lipidnih membran, ki po svoji zgradbi ponazarja infinitezimalno majhen košček celične membrane. Pogosto ga uporabljamo za preučevanje pojava elektroporacije tako na eksperimentalnem nivoju z merjenjem kapacitivnosti ter porušitvene napetosti membrane kot tudi na nivoju molekularne dinamike. Odlika ravninskega lipidnega dvosloja je njegova električna dostopnost z obeh strani in preprosta predstavitev z električnim vezjem vzporedno vezanega upora in kondenzatorja [9]. Na ravninskih lipidnih dvoslojih so v preteklosti že bili narejeni poizkusi za različne lipidne molekule, pri različnih temperaturah v odvisnosti od faznega prehoda lipidnih molekul in z uporabo različnih stimulacijskih signalov. Z meritvami kapacitivnosti posameznega ravninskega lipidnega dvosloja preverimo kvaliteto zgrajega ravninskega lipidnega dvosloja. Za preučevanje pojava elektroporacije je pomemben parameter porušitvena napetost, ki nam podaja stabilnost ravninskega lipidnega dvosloja v električnem polju.

Namen študije je bil izpostavitev ravninskega lipidnega dvosloja nanosekundnim pulzom in pri tem preučevanje strukturnih sprememb, kot so reorientacija lipidnih molekul, pore ter porušitvene napetosti. Ker poizkusov z nanosekundnimi pulzi v preteklosti na ravninskih lipidnih dvoslojih še ni bilo, je bil del študije razvoj unikatnega eksperimentalnega sistema za elektroporacijo ravninskih lipidnih dvoslojev z električnimi pulzi v območju nekaj deset voltov ter trajanjem pulzov nekaj nanosekund. Optično opazovanje ravninskega lipidnega dvosloja je zaradi narave komore, kjer zgradimo ravninski lipidni dvosloj nemogoče. Zato smo morali spremembe na ravninskem lipidnem dvosloju meriti električno s primernim napetostnim vzbujanjem ter merjenjem odziva toka. Merjenje toka v času nanosekundnega napetostnega vzbujanja je izredno zahtevno. Zato smo pred in po izpostavitvijo ravninskega lipidnega dvosloja nanosekundnim pulzom merili kapacitivnost in upornost ravninskega lipidnega dvosloja z LCR metrom.

2 Materiali in metode

2.1 Nanosekundni pulzni generator

Tehnike generiranja nanosekundnih pulzov se zelo razlikujejo od tistih za generiranje mikro- ali milisekundnih pulzov [10-14]. Vzrok so predvsem stikala, ki ne omogočajo izključitve v nanosekundnem časovnem območju. Za generiranje nanosekundnih pulzov uporabljamo mrežo za oblikovanje pulza (ang. *pulse-forming networks* – PFN). Mreža za oblikovanje pulza je zgrajena iz večih podsekcij, kjer so posamezne sekcije sestavljene iz tuljav (L) in kondenzatorjev (C). Generator Blumlein (slika 1) tvori nanosekundni pulz s pomočjo dveh mrež za oblikovanje pulza. Blumlein generator deluje v dveh fazah, naelektritvi linij in razelektritvi. V času faze naelektritve mreža za oblikovanje pulza je stikalo (S) izključeno. Napetostni vir z nastavljivo amplitudo enosmerno napetostjo (V) nabije mrežo za oblikovanje pulza preko upora (R). V fazi razelektritve vključimo stikalo (S), tako razelektrimo naboj, shranjen v mreži za oblikovanje pulza preko impedance bremena (Z_L) oziroma ravninskega lipidnega dvosloja. Ker želimo generirati napetostni pulz brez odbojev, se mora impedanca Z_L čim bolj ujemati z impedanco mreže za oblikovanje pulza. Impedanco mreže za oblikovanje pulza določimo z enačbo $(L/C)^{0.5}$, kjer L in C predatavljata induktivnost tuljave in kapacitivnost kondenzatorja v posamezni podsekciji. Trajanje nanosekundnega pulza je $2N(LC)^{0.5}$, kjer je N število podsekcij mreže za oblikovanje pulza. Izhodna napetost nanosekundnega pulza je približno enaka izbrani napajalni napetosti V .



Slika 1. Shema generatorja Blumlein z dvema mrežama za oblikovanje pulza (PFN_A and PFN_B), nastavljivim napetostnim napajalnikom V , visoko impedančnim uporom R za nabijanje mreže za oblikovanje pulza, stikalom S in impedanco bremena – ravninskega lipidnega dvosloja Z_L .

Pri nanosekundni elektroporaciji je Blumline generator uporabljen praktično v vseh poizkusih za generiranje nanosekundnih pulzov. Njegova prednost je nizka cena, enostavnost izdelave, dobro kontrolo nad ponovljivostjo električnih parametrov. Kljub temu pa je pomembno, da je impedanca mreže za oblikovanje pulza prilagojena ravninskemu lipidnemu dvosloju, da preprečimo atenuacije amplitude pulza ter odboje nanosekundnega pulza. Pulzni generator Blumline, ki smo ga razvili za elektroporacijo ravninskih lipidnih dvoslojev, tvori nanosekundne pulze amplitud od 0 do 60 V in trajanja 7 ns.

2.2 Merjenje električnih lastnosti ravninskega lipidnega dvosloja

Merjenje strukturnih sprememb ravninskih lipidnih dvoslojev ob izpostavitvi nanosekundnim pulzom smo izvedli z LCR metrom Agilent E4980A, 20 Hz – 300 kHz, (ZDA). LCR meter deluje na principu mostične metode. Izbrana parametra merjenja sta bila paralelna upornost in kapacitivnos R_P-C_P . Amplituda merilne sinusne napetosti je bila izbrana 20 mV, frekvenca pa 2 kHz.

Merjenje impedance z LCR metrom in generiranje nanosekundnega pulza sočasno ni bilo mogoče. Zato smo razvili posebno analogno stikalo, ki je preklapljalo elektrode med nanosekundnim Blumline generatorjem in LCR metrom. Prožilnik preklapljanja smo izvedli z digitalnim zakasnitvenim generatorjem DG645 (Stanford Research Systems, ZDA)

Na analogno stikalo smo priključili štiri Ag-AgCl elektrode, ki smo jih potopili v prevodno raztopino; dve na vsako stran ravninskega lipidnega dvosloja. Teflonska komora je sestavljena iz dveh kockastih rezervoarjev volumnov $5,3 \text{ cm}^3$. V povezovalno luknjico med rezervoarjema smo vstavili $25 \text{ }\mu\text{m}$ tanko teflonsko folijo na sredi katere je bila luknjica s premerom $106 \text{ }\mu\text{m}$. Lipidne dvosloje smo tvorili z metodo dvigovanja gladine [15].

Celoten sistem smo nadzirali z uporabo programskega orodja Matlab 2017a ter dodatnim modulom Instrumentation Control Toolbox za nadzor merilnih instrumentov preko protokola VISA.

2.3 Priprava ravninskih lipidnih dvoslojev

Prevodno raztopino smo pripravili iz 0,1 molarne KCl (Merck, Nemčija) in 0,01 molarne raztopine Hepes (Merck, Nemčija). Zmešali smo ju v enakem razmerju in dodali toliko kapljic 1 M NaOH (Merck, Nemčija), da smo dosegli pH raztopine 7,4.

Lipidne dvosloje smo pripravljali iz 1-palmitil 2-oleil 3-fosfatidilholin-a (POPC), ki smo jih kupili v prahu (Avanti Polar-Lipids, inc., ZDA). Lipid v prahu smo raztopili v mešanici heksana (Riedel-de Haën, Nemčija) in etanola (Riedel-de Haën, Nemčija) v razmerju 9:1. Za podporni torus smo uporabili mešanico heksadekana (MERCK, Nemčija) in etanola v razmerju 3:7.

Za preizkus zmožnosti detekcije strukturnih sprememb ravninskega lipidnega dvosloja smo pripravili dodatne poizkuse z dodajanjem dvovalentnih ionskih raztopin Ca^{2+} v okoliško prevodno raztopino. V komoro smo na eno stran ravninskega lipidnega dvosloja postopoma dodajali po $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ 1M CaCl_2 raztopine, kar je pomenilo, da smo molarnost CaCl_2 z vsakim vnosom povečali za $0,5 \text{ mM}$.

2.4 Merilni protokol

Potek poizkusov je temeljil na cikličnem merilnem protokolu. Najprej smo v komori tvorili ravninski lipidni dvosloj, nato smo z LCR metrom merili kapacitivnost in upornost ravninskega lipidnega

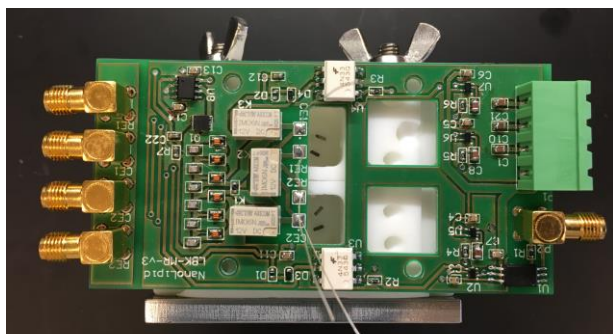
dvosloja. V primeru, da vrednosti le teh nista ustrezali ravninskemu lipidnemu dvosloju, smo postopek ponovili. Ob primernih vrednostih kapacitivnosti in upornosti ravninskega lipidnega dvosloja smo pričeli s postopkom merjenja in generiranja nanosekundnega pulza. Posamezna meritev na LCR metru je trajala vsaj 400 sekund. Med tem smo enkrat vbrizgali dvovalentno raztopino CaCl_2 in opazovali sprememo upornosti in kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja. Med posameznimi meritvami smo tudi večkrat prožili nanosekundni pulz različnih amplitud.

3 Rezultati

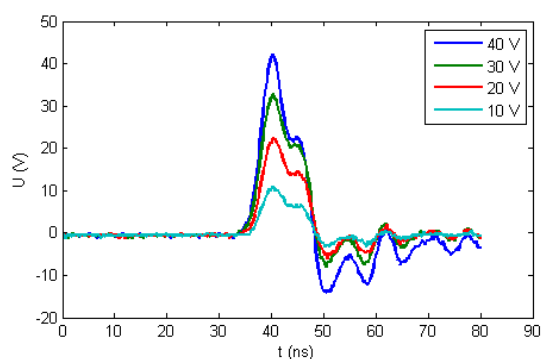
Študija je obsegala razvoj nanosekundnega pulznega generatorja ter izpostavitve ravninskih lipidnega dvosloja nanosekundnim pulzom in pri tem preučevanje strukturnih sprememb ter porušitvene napetosti z merjenjem upornosti in kapacitivnosti.

3.1 Generator nanosekundnih pulzov Blumeline

Komora za ravninski lipidni dvosloj z nizko prevodnostjo in visoko kapacitivnostjo predstavlja električno breme z visoko časovno konstanto. Za generiranje nanosekundnega pulza na bremenu z visoko časovno konstanto mora zato imeti pulzni generator nizko impedanco in mora biti električno blizu bremena. Blumlein generator z mrežo za oblikovanje pulza je eden izmed najprimernejših konceptov za generiranje pulzov na nizki impedanci, saj je njegovo vezje in električne komponente najlažje optimizirati, da dosežemo zahteve za izhodni pulz. Generator smo najprej optimizirali s programom PSPICE (Cadence, ZDA) [16] in ga nato še izdelali (slika 2). Obe mreži za oblikovanje pulza v Blumlein generatorju sta sestavljeni iz treh pod sklopov z induktivnostjo 6 nH in kapacitivnostjo 240 pF. Izhodni pulzi iz nanosekundnega Blumlein generatorja se dobro ujemajo s PSPICE simulacijo. Polna dolžina pulza pri polovični amplitudi (FWHM) je 7 ns, maksimalna amplituda pulzov pa je enaka napajalni napetosti (slika 3). Nepravokotnost pulzov in 20% negativni odboji so bili predvideni že pri PSPICE simulaciji in so posledica majhnega števila pod sklopov mreže za oblikovanje pulza. To pa zato, da smo lahko realizirali kompaktno vezje na majhni komori za ravninski lipidni dvosloj.



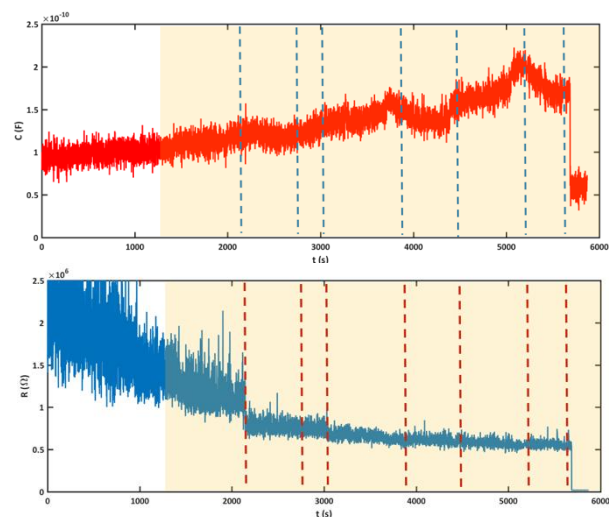
Slika 2. Vezje nanosekundnega Blumlein generatorja na komori za ravninski lipidni dvosloj.



Slika 3. Časovni potek izhodnega nanosekundnega pulza iz Blumlein generatorja pri različnih napajalnih napetostih (10 - 40 V).

3.2 Ravninski lipidni dvosloji izpostavljeni nanosekundnim pulzem

Rezultati merjenja kapacitivnosti in upornosti ravninskega lipidnega dvosloja z uporabo LCR meta so pokazali, da nanosekundni pulzi na ravninski lipidni dvosloj nimajo vpliva. Pri dodajanju dvovalentne raztopine CaCl_2 , opazimo povečanje kapacitivnosti in zmanjšanje upornosti ravninskega lipidnega dvosloja. V kombinaciji vzbujanja ravninskega lipidnega dvosloja in dodajanja CaCl_2 opazimo, da se upornost in kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja spremeni le ob dodajanju CaCl_2 (slika 4). Ravninski lipidni dvosloj se zaradi vzbujanja z nanosekundnimi pulzi ni porušil, kot smo pričakovali. Ko je prevodna raztopina vsebovala 4 mM CaCl_2 , se je ravninski lipidni dvosloj običajno porušil, zaradi dodajanja CaCl_2 v prevodno raztopino. Pri ponovnem tvorjenju ravninskega lipidnega dvosloja se lipidni dvosloj se več vzpostavil. Poizkuse smo ponovili večkrat, na sliki 4 je prikazan eden od rezultatov.



Slika 4. Kapacitivnost in upornost ravninskega lipidnega dvosloja v odvisnosti od časa. Črktane črte na obeh grafih predstavljajo dodajanje 0,5 mM CaCl_2 v solno raztopino na eno stran ravninskega lipidnega dvosloja. Sivo polje predstavlja vzujanje ravninskega lipidnega dvosloja z nanosekundnim pulzom amplitude 50 V in trajanja 7 ns. Nanosekundni pulzi so bili proženi na vsakih 50 s.

4 Diskusija

Ravninski lipidni dvosloj, kot preprost model celične membrane, do sedaj ni bil izpostavljen nanosekundnim elektroporacijskim pulzom. Cilj študije je bil razvoj nanosekundnega generatorja za izpostavitve ravninskih lipidnih dvoslojev nanosekundnim pulzom, da bi razložili razliko eksperimentov *in vitro* ter *in vivo* z uporabo nanosekundnih in mikrosekundnih pulzov. V skladu z študijami v *in vitro* in *in vivo* pogojih ter simulacijami molekularne dinamike smo ob izpostavitvi nanosekundnim pulzom pričakovali strukturne spremembe oziroma porušitev ravninskega lipidnega dvosloja.

Opazovanje v času trajanja nanosekundnega pulza je težko izvedljivo. Optično opazovanje z mikroskopom ni mogoče zaradi komore, kjer so pripravljene ravninski lipidni dvosloji. Zato moramo spremembe ravninskega lipidnega dvosloja opazovati električno z merjenjem spremembe kapacitivnosti in upornosti. Pred in po vzpostavitvi ravninskega lipidnega dvosloja nanosekundnim pulzom smo merili kapacitivnost in upornost ravninskega lipidnega dvosloja z LCR metrom.

Rezultati merjenja kapacitivnosti in upornosti so pokazali, da izpostavitve ravninskega lipidnega dvosloja nanosekundnim pulzom ne vpliva, opazne pa so spremembe ob dodajanju dvo-valentnih ionov v okoliško raztopino. To odpira nekatera nova vprašanja na nivoju osnovnega razumevanja mehanizmov elektroporacije na nivoju nanosekundnih pulzov, ki zahtevajo dodatne raziskave.

Z dinamičnim merjenjem toka v času trajanja pulza bi lahko izmerili perturbacije lipidnih molekul v membrani. Vendar so lastnosti merilnega sistema, kot je pasovna širina v gigaherčnem frekvenčnem območju, hitra dinamika merilnika, merjenje toka v pikoamperih, prezahtevne. Izdelati ali kupiti bi bilo potrebno tudi novo mikro komoro za izgradnjo ravninskih lipidnih dvoslojev ter prilagoditi merilno vezje za visoko frekvenčno merjenje. Za primerjavo poizkusov med nanosekundnim območjem ter mikrosekundnim območjem bo v prihodnosti potrebno načrtovati poizkuse tako z napetostnim kot tudi tokovnim vzbujanjem s pulzi.

Zahvala

Raziskava je podprta s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije. Raziskave so bile opravljene v sklopu laboratorijev EBAM skupine evropskih laboratorijev (LEA). Del poizkusov je bil opravljen v sklopu programa Mreže infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani (MRIC UL IP-0510). Del poizkusov je bil opravljen v sklopu štirimesečnega obiska v Frank Reidy Research Center for Bioelectrics, Old Dominion University, Norfolk, Virginia, ZDA, za katerega je doc. dr. Peter Kramar prejel Fulbrightovo stipendijo.

Literatura

- [1] M.L. Yarmush *et al.*: Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 16: 295-320, 2014.
- [2] T. Kotnik *et al.*: Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 33: 480-488, 2015.
- [3] E. Neumann *et al.*: Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.* 10: 279–290, 1972.
- [4] D. Miklavčič: *Handbook of Electroporation*. Springer 2017.
- [5] T. Kotnik *et al.*: Cell membrane electroporation – Part 1: The phenomenon. *IEEE Electr. Insul. M.* 28(5): 14-23, 2012.
- [6] S. Mahnič-Kalamiza *et al.*: Electroporation in food processing and biorefinery. *J. Membrane Biol.* 247: 1279-1304, 2014.
- [7] E. Puértolas *et al.*: Improving mass transfer to soften tissues by pulsed electric fields: fundamentals and applications. *Annu Rev Food Sci Technol* 3: 263–82, 2012.
- [8] T. Batista Napotnik *et al.*: Effects of high voltage nanosecond electric pulses on eukaryotic cells (in vitro): A systematic review. *Bioelectrochemistry* 110: 1-12, 2016.
- [9] P. Kramar *et al.*: Merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev. *Elektrotehniški vestnik* 76: 293-298, 2009.
- [10] M. Reberšek *et al.*: Cell membrane electroporation – Part 3: The equipment. *IEEE Electr. Insul. M.* 30(3): 8-18, 2014.
- [11] J. F. Kolb *et al.*: Nanosecond pulsed electric field generators for the study of subcellular effects. *Bioelectromagnetics*, 27: 172–187, 2006.
- [12] M. Reberšek *et al.*: Blumlein configuration for high-repetitionrate pulse generation of variable duration and polarity using synchronized switch control. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 56(11): 2642–2648, 2009.
- [13] C. Merla *et al.*: A 10- Ω high-voltage nanosecond pulse generator. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, 58(12): 4079–4085, 2010.
- [14] J. F. Kolb: Generation of ultrashort pulse. In *Advanced Electroporation Techniques in Biology in Medicine*, A. G. Pakhomov, D. Miklavčič, and M. S. Markov, Ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010, pp. 341–352.
- [15] M. Montal *et al.*: Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69: 3561–3566, 1972.
- [16] E. Puértolas *et al.*: Improving mass transfer to soften tissues by pulsed electric fields: fundamentals and applications. *Annu Rev Food Sci Technol* 3: 263–82, 2012.