

Ugotavljanje prvotne stopnje anizotropnosti mišičnega tkiva prašiča z dinamičnim modelom elektroporacije *ex vivo*

Rok Šmerc¹, Samo Mahnič-Kalamiza¹, Matevž Pintar²,
Janez Langus², Tomaž Šuštar², Damijan Miklavčič¹

¹Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška cesta 25, 1000 Ljubljana

²C3M d.o.o., Tehnološki park 21, 1000 Ljubljana

E-pošta: rok.smerc@fe.uni-lj.si

Determining the initial degree of anisotropy of porcine skeletal muscle tissue using the dynamic model of electroporation *ex vivo*

Skeletal muscles are, due to their large size and ease of access, the most widely used tissue for gene electrotransfer. Electrical conductivity of skeletal muscles exhibits a high degree of anisotropy, i.e. the electric conductivity in the direction of the muscle fibres is considerably higher than the electric conductivity in the direction perpendicular to the muscle fibres. For successful numerical modelling that can be used for optimisation of electric pulse parameters and the geometry of the electrodes, electric properties of the skeletal muscles need to be known.

In the present study, an attempt was made to determine the degree of initial, i.e. pre-treatment anisotropy of porcine skeletal muscle tissue (Longissimus dorsi) by using ex vivo measurements of the electric voltage and current in the aforementioned tissue combined with numerical modelling. Two different orientations of the electrodes with respect to the muscle fibres were used. The first orientation, whereby the electrodes are inserted in such a way that the direction of the applied electric field is the same as the direction of the muscle fibres, and the second, whereby the direction of the applied electric field is perpendicular to the direction of the muscle fibres. With the recently developed dynamic finite-element model we produced curves relating the normalized expected electrical current to the electrode-to-muscle fibre orientation for different values of the ratio of anisotropy, and for different applied voltages. We then used these curves in order to assess what could have been the initial degree of anisotropy of porcine skeletal muscle before applying electroporation. The initial degree of anisotropy was thusly assessed for 10 pairs of measurements, made in the porcine skeletal muscle ex vivo.

1 Uvod

Z izpostavitvijo celice električnemu polju dovolj visoke jakosti, postane njena membrana začasno bolj prepustna za molekule, za katere je sicer slabo ali neprepustna. Ta pojav imenujemo elektroporacija ali elektropermeabilizacija [1]. Elektroporacija je dandanes uveljavljena metoda v različnih biomedicinskih aplikacijah, kot so na primer elektrokemoterapija, genska elektrotransfekcija, DNK vakcinacija, ablacija tkiv z metodo ireverzi-

bilne elektroporacije, kot tudi v biotehnoloških aplikacijah, npr. za ekstrakcijo biomolekul iz mikroorganizmov in rastlin ter za inaktivacijo mikroorganizmov [2, 3].

Pri genski transfekciji z uporabo metode reverzibilne elektroporacije olajšamo prehajanje genskega materiala (običajno plazmidne DNK) v celice. Najpogosteje uporabljena tkiva za gensko elektrotransfekcijo so zaradi svoje velikosti in enostavne dostopnosti skeletne mišice. Ker se mišične celice ne delijo, je izražanje genov po genski elektrotransfekciji dolgo prisotno [4, 5]. Elektroporacijski pulzi poleg tega, da povečajo prepustnost celične membrane, prek elektroforetske sile omogočijo večje število vezav med plazmidno DNK in celičnimi membranami, ki so potrebne za uspešnost genske transfekcije [6]. Zato je za doseganje visoke učinkovitosti genske elektrotransfekcije ključnega pomena optimizirati parametre električnih pulzov in geometrijo elektrod upoštevaje lastnosti ciljnega tkiva, pri čemer si lahko pomagamo z numeričnim modeliranjem [7, 8]. Z vidika numeričnega modeliranja je pomembno dobro poznavanje električnih lastnosti tkiva. Pregled literature kaže, da skeletne mišice izkazujejo izrazito anizotropne električne lastnosti [9–12]. Ugotovljeno je bilo, da je električna prevodnost skeletnih mišic v smeri vlaken višja od električne prevodnosti v smeri pravokotno na vlakna.

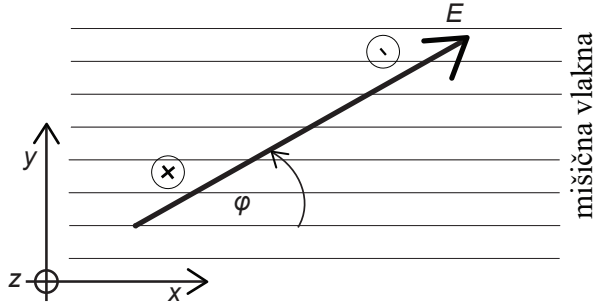
V pričujoči študiji smo skušali na podlagi *ex vivo* meritev električne napetosti in električnega toka med elektroporacijo v hrbtni mišici (*Longissimus dorsi*) prašiča in z uporabo numeričnega modeliranja določiti prvotno stopnjo anizotropnosti uporabljene skeletne mišice, tj. stopnjo anizotropnosti mišice preden so njene lastnosti spremenjene zaradi elektroporacije.

2 Metode

2.1 Protokol meritev in geometrija uporabljenih elektrod

Meritve električne napetosti in električnega toka so bile opravljene *ex vivo* v hrbtni mišici (*Longissimus dorsi*) prašiča. Opravljenih je bilo deset parov meritev z apliciranimi napetostmi med 60 V in 225 V. Par meritev sestavljata meritvi pri enaki napetosti v dveh različnih orientacijah elektrod glede na smer mišičnih vlaken; v prvem primeru je orientacija elektrod takšna, da je smer električnega polja enaka smeri mišičnih vlaken, v drugem primeru pa je orientacija elektrod takšna, da je smer elek-

tričnega polja pravokotna na smer mišičnih vlaken. S prototipnim elektroporatorjem [13] (Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biokibernetiko) je bil za vsako meritev doveden en pulz dolžine 100 μ s, pri tem sta bila izmerjena in beležena električna napetost in tok. Slika 1 prikazuje shematski prikaz orientacije elektrod z ozirom na smer mišičnih vlaken. Pri tem je φ označen kot med smerjo električnega polja in smerjo mišičnih vlaken. Uporabljeni sta bili dve paralelni igelni elektrodi z aktivno dolžino (dolžina neizoliranega dela v tkivo vstavljenih elektrod) 20 mm in premerom 0,7 mm. Razdalja med centroma elektrod je znašala 4 mm.



Slika 1: Shematski prikaz orientacije elektrod z ozirom na smer mišičnih vlaken.

2.2 Numerično modeliranje

Numerično modeliranje smo izvedli z dinamičnim modelom, ki omogoča izračun časovnega poteka električnega toka dovedenih elektroporacijskih pulzov z metodo končnih elementov [14, 15]. Model je implementiran kot dodatek za paket Wolfram Mathematica (Wolfram Research, Champaign, Illinois) z dodatnimi paketi AceFEM in AceGen [16]. Model kot vhodne podatke sprejme ustrezno filtrirane in decimirane časovne signale napetosti, mrežo končnih elementov, parametre, s katerimi definiramo električne in toplotne lastnosti uporabljene tkiva, ter parametre, ki definirajo dinamiko velikosti in števila por med elektroporacijo. Nekateri izmed parametrov so empirične narave in so bili določeni z iskanjem najboljšega ujemanja med izmerjenimi električnimi tokovi v govejih jetrih *ex vivo* ter tokovi dobljenimi z numeričnimi simulacijami.

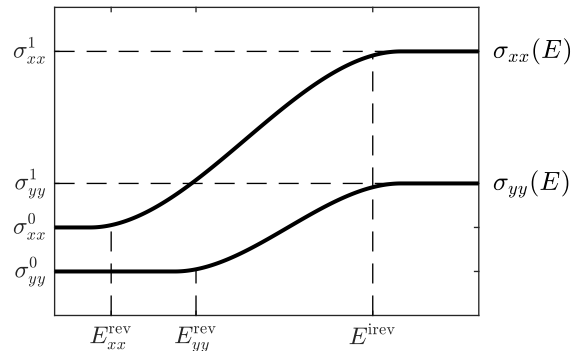
Z modelom smo najprej določili krivulje $I_{\text{norm}}(\varphi)$, glej sliko 3, ki smo jih potem uporabili za določitev prvotne stopnje anizotropnosti mišičnega tkiva. Krivulje na sliki 3 prikazujejo normirano pričakovano vrednost električnega toka v odvisnosti od orientacije vstavljenih elektrod (kot φ) z ozirom na smer mišičnih vlaken za različne vrednosti anizotropnega razmerja začetnih električnih prevodnosti v smeri x proti smeri y mišičnega tkiva, ki smo ga definirali kot:

$$AR_{xy}^0 = \sigma_{xx}^0 / \sigma_{yy}^0, \quad (1)$$

pri čemer je AR_{xy}^0 anizotropno razmerje začetnih električnih prevodnosti ne-elektroporiranega tkiva v smeri x proti smeri y (v nadaljevanju kar krajše anizotropno razmerje ali AR), σ_{xx}^0 začetna električna prevodnost

mišičnega tkiva v smeri mišičnih vlaken in σ_{yy}^0 začetna električna prevodnost mišičnega tkiva v smeri, ki je pravokotna smeri mišičnih vlaken in pravokotna na smer vstavitve elektrod v tkivo (glej sliko 1).

V modelu smo upoštevali sigmoidno spreminjanje električne prevodnosti tkiva v odvisnosti od jakosti električnega polja, pri čemer predpostavimo, da pride do poracije tkiva v smeri mišičnih vlaken (x) že pri nižji jakosti električnega polja kot v smereh, pravokotnih na mišična vlakna (y, z). To pomeni, da se električna prevodnost tkiva v smeri mišičnih vlaken začne višati že pri nižji jakosti električnega polja kot v smereh, pravokotnih na mišična vlakna [17]. Slika 2 prikazuje odvisnosti $\sigma_{xx}(E)$ in $\sigma_{yy}(E)$ v primeru, ko je vrednost anizotropnega razmerja AR enaka 2,0. Pri tem predpostavimo, da je x os koordinatnega sistema usmerjena v smeri mišičnih vlaken. Tako je E_{xx}^{rev} prag reverzibilne elektroporacije v smeri mišičnih vlaken, $E_{yy}^{\text{rev}} = E_{zz}^{\text{rev}}$ prag reverzibilne elektroporacije v smereh, pravokotnih na mišična vlakna, E^{irrev} pa je prag ireverzibilne elektroporacije in je enak v vseh smereh. Uporabili smo naslednje številske vrednosti: $E_{xx}^{\text{rev}} = 80 \text{ V cm}^{-1}$, $E_{yy}^{\text{rev}} = E_{zz}^{\text{rev}} = 200 \text{ V cm}^{-1}$ in $E^{\text{irrev}} = 450 \text{ V cm}^{-1}$ [7, 17].



Slika 2: Prikaz sigmoidnega spreminjanja električnih prevodnosti $\sigma_{xx}(E)$ in $\sigma_{yy}(E)$ v odvisnosti od jakosti električnega polja z označenimi pragovi elektroporacije za vrednost $AR = 2,0$.

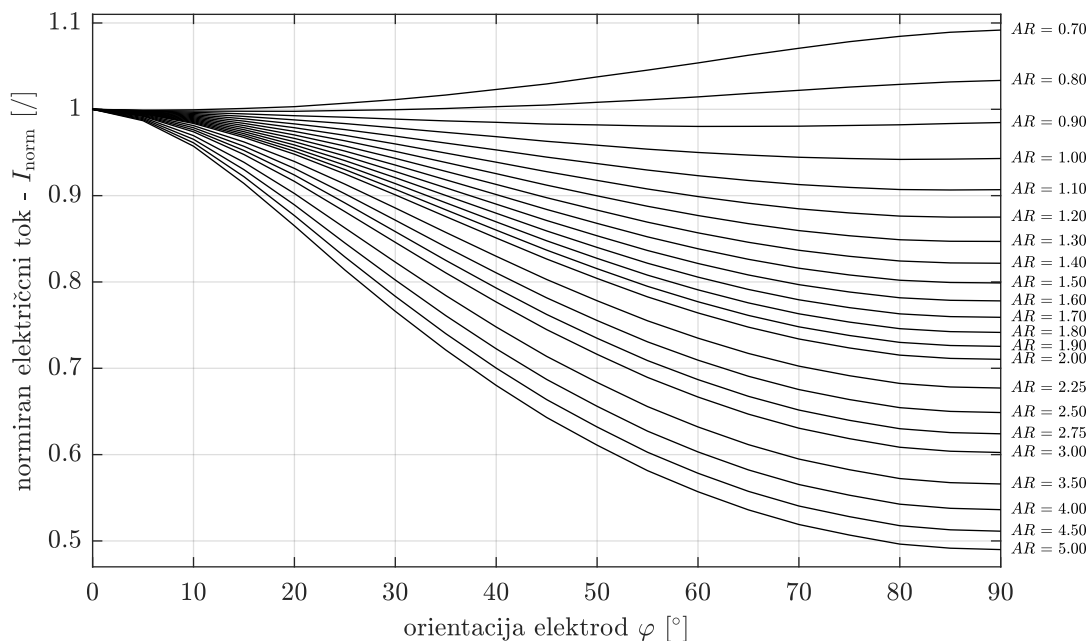
Poleg odvisnosti električne prevodnosti tkiva od jakosti lokalnega električnega polja, smo upoštevali tudi dodatno povišanje električne prevodnosti tkiva v smeri polja [18, 19]. Pojav je bil opažen med spremljanjem električne prevodnosti pri elektroporaciji piščančjih jeter *ex vivo* z uporabo magnetne resonančne električne impedančne tomografije [18], in ga razlagamo kot posledico tvorbe večine por v celični membrani na mestih, kjer je vsiljena transmembranska napetost najvišja, tj. na mestih, kjer je celična membrana pravokotna na smer električnega polja [1].

Vrednosti električne prevodnosti v smereh x in y nad ireverzibilnim pragom poracije (velja samo za $\varphi = 0^\circ$ in $\varphi = 90^\circ$) sta določeni z naslednjima enačbama:

$$\sigma_{xx}^1 = A \sigma_{xx}^0 (1 + B \cos \varphi), \quad (2)$$

$$\sigma_{yy}^1 = A \sigma_{yy}^0 (1 + B \sin \varphi), \quad (3)$$

pri čemer parameter A odraža povišanje električne prevodnosti zaradi električnega polja v vseh smereh, parametre



Slika 3: Normirana pričakovana vrednost električnega toka v odvisnosti od orientacije elektrod φ za različne vrednosti parametra AR . Velja za en doveden pulz dolžine 100 μs in napetosti 150 V.

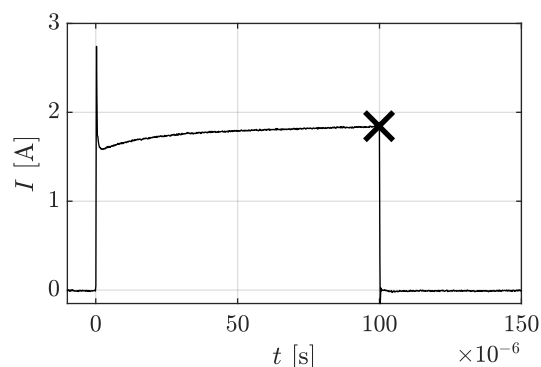
ter B pa dodatno povišanje električne prevodnosti samo v dominantni smeri električnega polja. V tej študiji smo uporabili vrednosti $A = 3,0$ in $B = 0,25$, v grobem določeni na podlagi literature ter smiselno preračunani za proučevani primer.

Z modelom smo naredili večje število simulacij, in sicer smo na podlagi izmerjenega časovnega poteka električne napetosti elektroporacijskega pulza dolžine 100 μs simulirali pričakovan časovni potek električnega toka. Pri tem smo uporabili pet različnih napetosti pulzov (iste vrednosti napetosti, kot so bile uporabljene pri meritvah v hrbtni mišici prašiča) za 19 različnih kotov φ (med 0° in 90° , s korakom 5°) in za 23 različnih vrednosti anizotropnega razmerja AR (med 0,5 in 5,0). Skupaj smo tako izvedli 2185 simulacij. Nato smo izračunane vrednosti električnega toka pri različnih orientacijah elektrod, ki ustrezajo določeni vrednosti aplicirane električne napetosti in določeni vrednosti anizotropnega razmerja, normirali z ustrezno izračunano vrednostjo električnega toka pri orientaciji $\varphi = 0^\circ$. Tako smo za vsako izmed izbranih anizotropnih razmerij in za vsako od izbranih električnih napetosti dobili krivuljo, ki prikazuje pričakovan električni tok v odvisnosti od orientacije elektrod glede na mišična vlakna.

Določanje stopnje anizotropnosti mišičnega tkiva smo izvedli tako, da smo za vsak par meritev (enaka amplituda, enkrat pri orientaciji 0° in drugič pri 90°) vzeli izmerjeno vrednost električnega toka na koncu pulza, nato pa vrednost pri 90° normirali z vrednostjo pri 0° (slika 4 prikazuje eno izmed opravljenih meritev, kjer je s križcem označena vrednost toka, ki smo jo uporabili). Vrednost anizotropnega razmerja AR smo nato določili z linearno interpolacijo med dvema najbližjima krivuljama (slika 3 prikazuje te krivulje za primer pulza dolžine 100

μs napetosti 150 V).

Na ta način preko primerjave med simuliranim in dejanskim izmerjenim tokom pri enakem vhodnem signalu (časovni potek napetosti pulza) retrogradno sklepamo na začetno, tj. prvotno stopnjo anizotropnosti tkiva, ki jo podaja z enačbo 1 definirani parameter AR .

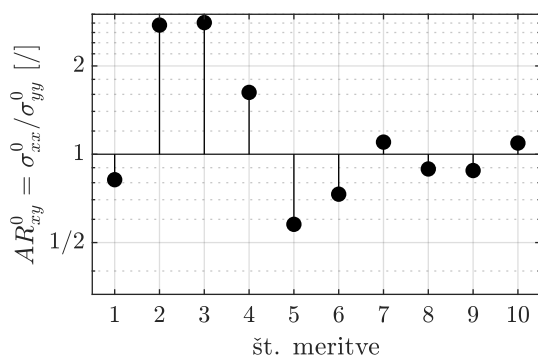


Slika 4: Ena izmed opravljenih meritev električnega toka. S križcem je označena vrednost, ki smo jo uporabili pri določanju vrednosti parametra AR .

3 Rezultati

Z numeričnim modelom smo določili krivulje, ki prikazujejo normirano pričakovano vrednost električnega toka v odvisnosti od orientacije elektrod φ za različne vrednosti parametra AR . Oblika teh krivulj je odvisna od geometrije elektrod in od dolžine ter napetosti pulza. Slika 3 prikazuje krivulje, ki veljajo za v našem eksperimentalnem primeru uporabljeno geometrijo elektrod in en doveden pulz dolžine 100 μs napetosti 150 V.

Iz meritev toka ter z uporabo simuliranih krivulj normalne pričakovane vrednosti toka v odvisnosti od orientacije elektrod smo določili vrednost parametra AR za vseh deset parov opravljenih meritev (gl. sliko 5). Geometrijsko povprečje anizotropnih razmerij AR za vseh deset parov meritev znaša 1,15, faktor geometrijske standardne deviacije pa 0,51. Geometrijsko povprečje in standardno deviacijo navajamo zato, ker mora statistična funkcija za povprečje obratnih vrednosti vrniti vrednost 1, saj je anizotropno razmerje AR definirano kot kvocient dveh vrednosti.



Slika 5: Dobljene vrednosti parametra AR za vseh deset parov opravljenih meritev.

4 Razprava

Pri dobljenih vrednostih anizotropnega razmerja AR lahko opazimo velik raztros. Najnižja vrednost AR znaša 0,58, najvišja pa 2,81. Geometrijsko povprečje vseh anizotropnih razmerij znaša 1,15, kar kaže na to, da je v povprečju prvotna prevodnost v smeri mišičnih vlaken res višja kot v smeri, pravokotno na mišična vlakna, vendar je raztros rezultatov prevelik, da bi to vrednost lahko sprejeli kot zanesljivo.

Eden od možnih vzrokov za velik raztros je kot vstavitve elektrod glede na mišična vlakna, ki ga ni bilo moč natančno izmeriti, saj bi bilo to moč storiti le s histološko analizo. Elektrode so bile v tkivo vstavljene na podlagi vizualnega pregleda površine mišice v prizadevanju, da bi bila orientacija elektrod kar se le da vzporedna oz. pravokotna na vlakna. Problematična je lahko tudi lokacija vstavitve elektrod. Mišično tkivo je dokaj nehomogeno, lastnosti se spreminjajo z oddaljenostjo od narastišča, poleg tega usmerjenost vlaken lahko variira v danem volumnu mišice, v katerem se vzpostavi električno polje.

S to študijo smo želeli pokazati, kako je moč prek modeliranja elektroporacije določiti prvotno stopnjo anizotropnosti mišičnega tkiva kot intrinzično in od elektroporacije neodvisno lastnost tkiva. Za zanesljivejše rezultate je potrebno zagotoviti visoko natančnost pri vstavljanju elektrod v tkivo, nato pa tudi izmeriti dejanski kot vstavljenih elektrod glede na potek mišičnih vlaken v kolikor je to mogoče, ter skušati kar se le da zmanjšati vpliv dejavnikov z naslova biološke variabilnosti.

Zahvala

Študijo sta delno financirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije in podjetje RenBio.

Literatura

- [1] T. Kotnik *et al.*: Membrane Electroporation and Electroporation: Mechanisms and Models. *Annu. Rev. Biophys.* 48: 63-91, 2019.
- [2] M.L. Yarmush *et al.*: Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 16: 295-320, 2014.
- [3] S. Haberl *et al.*: Cell membrane electroporation – Part 2: The applications. *IEEE Electr. Insul. M.* 29(1): 29-37, 2013.
- [4] C. Rosazza *et al.*: Gene electrotransfer: A mechanistic perspective. *Curr Gene Ther.* 16: 98–129, 2016.
- [5] E. Sokolowska *et al.*: A Critical review of electroporation as a plasmid delivery system in mouse skeletal muscle. *Int J Mol Sci.* 20(11): 2776, 2019.
- [6] C. Faurie *et al.*: Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation. *J. Gene Med.* 12: 117-125, 2010.
- [7] A. Županič *et al.*: Numerical optimization of gene electrotransfer into muscle tissue. *Biomed Eng Online* 9:66, 2010.
- [8] T. Forjanič & D. Miklavčič: Numerical study of gene electrotransfer efficiency based on electroporation volume and electrophoretic movement of plasmid DNA. *Biomed. Eng. Online* 17:80: 1-10, 2018.
- [9] C. Gabriel *et al.*: The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey. *Phys. Med. Biol.* 41: 2231–2249, 1996.
- [10] S. Gabriel *et al.*: The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz. *Phys. Med. Biol.* 41: 2251–2269, 1996.
- [11] S. Gabriel *et al.*: The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues. *Phys. Med. Biol.* 41: 2271–2293, 1996.
- [12] D. Miklavčič *et al.*: Electric properties of tissues. *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*: 3578-3589, 2006.
- [13] P. Mekuč: Razvoj in preizkus visokofrekvenčnega bipolarnega elektroporatorja: magistrsko delo. Ljubljana, 2017.
- [14] J. Langus *et al.*: Dynamic finite-element model for efficient modelling of electric currents in electroporated tissue. *Sci. Rep.* 6: 26409, 2016.
- [15] M. Pintar *et al.*: Time-dependent finite-element analysis of *ex vivo* electrochemotherapy treatment. *Technol. Cancer Res. Treat.* 17: 1-9, 2018.
- [16] J. Korelc & P. Wriggers: Automation of Finite Element Methods. Springer International Publishing; 2016.
- [17] S. Čorović *et al.*: The influence of skeletal muscle anisotropy on electroporation: *ex vivo* study and numerical modeling. *Med. Biol. Eng. Comput.* 48: 637-648, 2010.
- [18] M. Essone Mezeme *et al.*: Assessing how electroporation affects the effective conductivity tensor of biological tissues. *Appl. Phys. Lett.* 101: 213702, 2012.
- [19] N. Labarbera & C. Drapaca: Anisotropically varying conductivity in irreversible electroporation simulations. *Theor. Biol. Med. Model.* 14(1): 20, 2017.