

# Numerično modeliranje porazdelitve pH sprememb v tkivu med dovajanjem elektroporacijskih pulzov

Rok Šmerc, Samo Mahnič-Kalamiza, Damijan Miklavčič

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

E-pošta: rok.smerc@fe.uni-lj.si

## Numerical modelling of pH changes distribution in tissue during delivery of electroporation pulses

**Abstract.** *During and after delivery of electroporation pulses, tissue damage, caused by various electric current and field effects, may occur. For optimal gene electrotransfer, tissue damage needs to be minimised. One of the possible causes for tissue damage is altered pH, caused by electrolysis of water, i.e. hydrolysis. Numerical modelling can be used to assess these pH changes in tissue. In the present study we built a two-dimensional numerical model, based on Nernst-Planck system of equations for the concentration of ions in a four-component electrolyte, and used it to calculate the distribution of pH changes in tissue during delivery of gene electrotransfer pulses (applied voltage of 100 V and total pulse time of 60 ms). Two mechanisms were taken into account: diffusion, caused by concentration gradients; and migration, caused by potential gradients. COMSOL Multiphysics software was used for calculations of pH changes distribution in tissue with finite element method. Our results show that during delivery of pulses, an acidic pH front forms in the vicinity of the anode, and an alkaline pH front forms in the vicinity of the cathode. Extreme pH values below 2.5 and above 13 are reached and sharp delineations between the normal pH and altered pH are observed. The model at this stage has difficulties with convergence, which are caused by relatively high voltage used in electroporation, very high concentration gradients, and the fact that five, highly non-linear, coupled partial differential equations need to be solved.*

## 1 Uvod

Elektroporacija oz. elektropermabilizacija je pojav, kjer z izpostavitvijo celice električnemu polju dovolj šnje jakosti povzročimo spremembe v njeni membrani, zaradi česar le-ta začasno postane bolj prepustna za molekule, za katere je sicer slabo ali neprepustna [1]. Elektroporacija se uporablja na različnih področjih, od biomedicine [2] do biotehnologije [3] in predelave hrane [4].

V biomedicini je ena izmed najpogosteje uporabljanih metod, temelječih na elektroporaciji, genska elektrotransfekcija. Pri genski elektrotransfekciji olajšamo prehajanje genskega materiala (običajno plazmidne DNK) v celice z uporabo metode reverzibilne elektroporacije [5].

Za dosego čim boljše genske izražave je potrebno minimizirati poškodbe tkiva, ki jih povzročijo različni učinki uporabe elektroporacije in dovajanja električnih pulzov. Eden izmed teh so spremembe pH v tkivu, povzročene z elektrolizo vode, tj. hidrolizo [6]. Te spremembe lahko ocenimo z uporabo numeričnega modeliranja. Pri tem uporabimo Nernst-Planckov sistem enačb, ki popisuje gibanje nabitih ionov v mediju, ki jih rešimo z izbrano numerično metodo, najpogosteje z metodo končnih razlik ali z metodo končnih elementov. Težava pri tem je, da je potrebno rešiti več, močno nelinearnih, sklopljenih parcialnih diferencialnih enačb – eno, ki popisuje prostorsko porazdelitev električnega polja ter dodatno enačbo za vsako vrsto ionov, ki jo v modelu upoštevamo. Objavljene študije s tega področja se osredotočajo bodisi na elektrokemijsko zdravljenje tumorjev, kjer se uporabljajo znatno nižje vrednosti električnih tokov in napetosti [7-11] bodisi na pojave med elektroporacijo v le enodimenzionalnem prostoru [6, 12-14]. Študija, kjer bi uspešno implementirali model v več dimenzijah z elektroporacijskimi pogoji, kolikor nam je znano, še ni objavljena.

V pričujoči raziskavi predstavljamo prvi korak v izdelavi numeričnega modela, ki bi omogočal izračun sprememb pH v tkivu pri vrednostih električne napetosti in toka, značilnih za elektroporacijo. Model smo izdelali v programskem okolju COMSOL Multiphysics, ki omogoča numerično reševanje diferencialnih enačb z metodo končnih elementov.

## 2 Materiali in metode

### 2.1 Nernst-Planckov sistem enačb

Enačbe, ki smo jih uporabili za numerično modeliranje porazdelitve pH sprememb v tkivu med dovajanjem elektroporacijskih pulzov temeljijo na delu Eve Nilsson s sodelavci [15, 16] s področja numeričnega modeliranja elektrokemijskega zdravljenja tumorjev. Model temelji na Nernst-Planckovem sistemu enačb za koncentracijo ionov v štirikomponentnem elektrolitu. Upoštevamo dva mehanizma: difuzijo vsled koncentracijskih gradientov in migracijo zaradi potencialnih gradientov. Za konvekcijo predpostavimo, da je zanemarljiva in je torej ne upoštevamo. Model vsebuje pet neznanih spremenljivk: koncentracije vodikovih, hidroksidnih, kloridnih in natrijevih ionov ter prostorsko porazdelitev električnega polja.

Materialno ravnovesje ionov komponente  $i$  je podano z:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{N}_i + R_i, \quad (1)$$

kjer je  $c_i$  koncentracija ionov komponente  $i$  (kjer je  $i$   $\text{H}^+$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  ali  $\text{Na}^+$  ion),  $t$  je čas,  $R_i$  je sproščanje ionov komponente  $i$  s kemijskimi reakcijami v elektrolitu,  $\mathbf{N}_i$  pa je molarni tok ionov komponente  $i$ :

$$\mathbf{N}_i = -D_i \nabla c_i - \frac{z_i}{|z_i|} u_i c_i \nabla \phi, \quad (2)$$

kjer je  $D_i$  difuzijski koeficient ionov komponente  $i$ ,  $z_i$  je (predznačen) naboj ionov komponente  $i$ ,  $u_i$  je gibljivost ionov komponente  $i$ ,  $\phi$  pa je električni potencial v elektrolitu. Pogoju elektroneutralnosti je zadoščeno z naslednjo enačbo:

$$\sum_{i=1}^4 z_i c_i = 0. \quad (3)$$

Gibljivost ionov in difuzijski koeficient sta povezana z Nernst-Einsteinovo enačbo:

$$D_i = \frac{RT}{|z_i|F} u_i, \quad (4)$$

kjer je  $R$  splošna plinska konstanta,  $T$  je temperatura in  $F$  je Faradayeva konstanta. Gostoto električnega toka  $\mathbf{j}$  v elektrolitu izračunamo z uporabo Faradayevega zakona:

$$\mathbf{j} = F \sum_{i=1}^4 z_i \mathbf{N}_i. \quad (5)$$

Enačbo za ohranitev električnega naboja

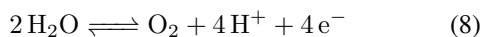
$$\nabla \cdot \mathbf{j} = 0 \quad (6)$$

lahko, upoštevaje enačbi (2) in (5), zapišemo kot:

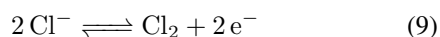
$$\nabla \cdot \left( \sum_{i=1}^4 |z_i| u_i c_i \nabla \phi \right) + \sum_{i=1}^4 z_i D_i \nabla^2 c_i = 0, \quad (7)$$

kar je enačba, uporabljena za izračun porazdelitve električnega polja.

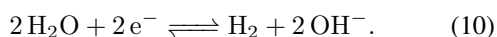
Dve reakciji potekata na anodi, evolucija kisika



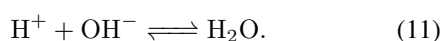
in evolucija klorida



ter ena na katodi, evolucija hidroksida



Kinetiko reakcij na elektrodah računamo z uporabo koncentracijsko osnovane Butler-Volmerjeve enačbe. Edina reakcija v elektrolitu, ki jo upoštevamo, je protolitska reakcija vode:



Sproščanje natrijevih in kloridnih ionov je enako 0 (torej njuna koncentracija ostane konstantna), vodikovi in hidroksidni ioni pa se sproščajo in porabljajo skladno s protolitsko reakcijo vode. Tako lahko zapišemo naslednja izraza za sproščanje ionov:

$$R_{\text{Na}^+} = R_{\text{Cl}^-} = 0, \quad (12)$$

$$R_{\text{H}^+} = R_{\text{OH}^-} = k_{w,b} c_{\text{H}_2\text{O}} - k_{w,f} c_{\text{H}^+} c_{\text{OH}^-}, \quad (13)$$

kjer sta  $k_{w,b}$  in  $k_{w,f}$  hitrostni konstanti protolitske reakcije vode v smeri nazaj in naprej.

Vrednosti parametrov, ki smo jih uporabili v numeričnih izračunih, so navedene v tabeli 1.

Tabela 1: Vrednosti parametrov, uporabljene v numeričnih izračunih [15].

Parameter	Vrednost
$k_{w,f}$	$1,5 \cdot 10^{11} \text{ l mol}^{-1}$
$k_{w,b}$	$2,7 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
$D_{\text{H}^+}$	$9,31 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
$D_{\text{OH}^-}$	$5,26 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
$D_{\text{Na}^+}$	$1,33 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
$D_{\text{Cl}^-}$	$2,03 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
$c_{\text{H}^+}^0$	$1,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$
$c_{\text{OH}^-}^0$	$1,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$
$c_{\text{Na}^+}^0$	$0,16 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$
$c_{\text{Cl}^-}^0$	$0,16 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$
$c_{\text{H}_2\text{O}}$	$55,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$

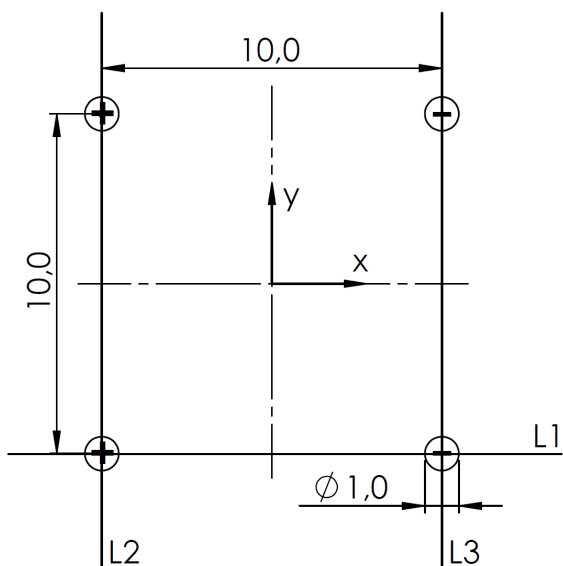
## 2.2 Numerično modeliranje

Z opisanimi enačbami smo izvedli numerični izračun pH sprememb v tkivu med dovajanjem elektroporacijskih pulzov, kakršni se uporabljajo pri genski elektrotransfekciji [5]. Uporabili smo štiri igelne elektrode premera 1 mm, ki so razporejene v ogliščih kvadrata s stranico 10 mm. Postavitev elektrod je prikazana na sliki 1.

Predpostavimo, da je glavni mehanizem, ki povzroči spremembo pH v tkivu migracija ionov v času apliciranja električnega polja, difuzija, ki poteka tekom pavz med pulzi, pa je v primerjavi s tem zanemarljiva. Ta predpostavka nam omogoči, da izračune izvedemo z uporabo konstantne napetosti, torej ne upoštevamo dejanske oblike pulzov in pavz med njimi. S tem se v modelu znebimo enega izmed izvorov nelinearnosti, s čimer postane model numerično nekoliko lažje obvladljiv. Uporabili smo napetost 100 V in pulze skupne dolžine 60 ms. Porazdelitev pH vrednosti v tkivu izračunamo na podlagi porazdelitve vodikovih ionov:

$$\text{pH} = -\log_{10} c_{\text{H}^+}. \quad (14)$$

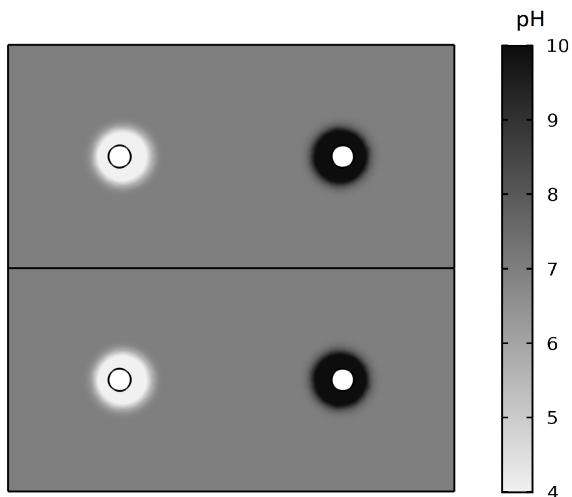
Enačbe, navedene v prejšnjem in v tem podpoglavju, smo uporabili za izdelavo numeričnega modela v dveh dimenzijah v programskem okolju COMSOL Multiphysics (COMSOL Inc., Švedska, različica 5.5), ki omogoča numerično analizo na osnovi metode končnih elementov (MKE).



Slika 1: Postavitev elektrod, vstavljenih v tkivo, z označenimi črtami L1, L2 in L3, ki smo jih uporabili za natančnejši prikaz porazdelitve pH sprememb v tkivu. Vse označene dimenzije so v milimetrih.

### 3 Rezultati

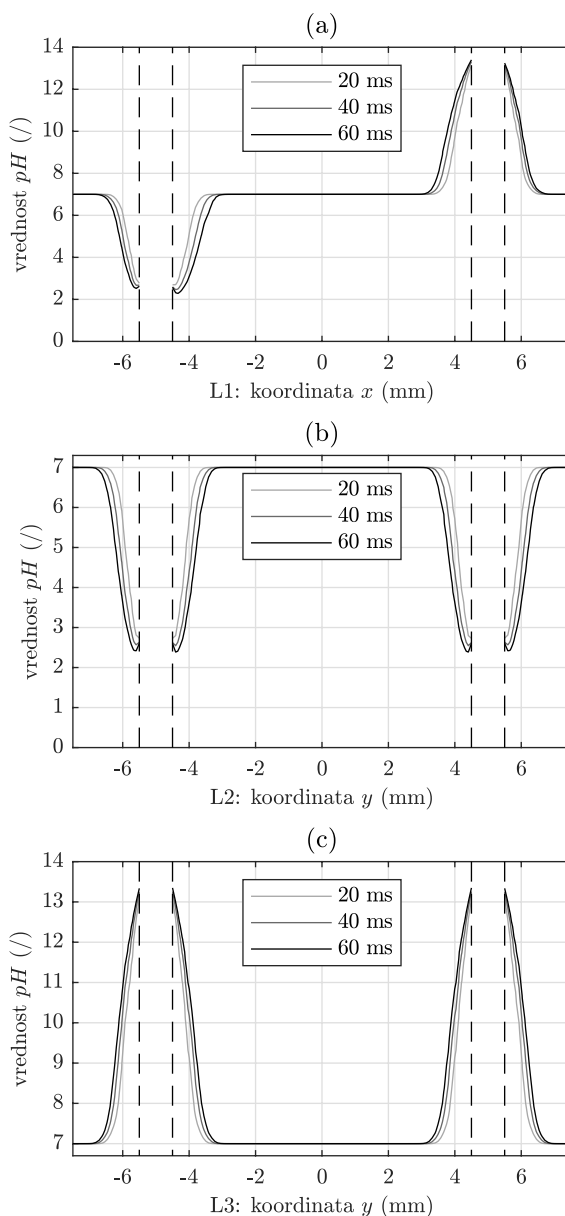
Izračunano porazdelitev pH sprememb v tkivu po dovajanju elektroporacijskih pulzov napetosti 100 V in skupne dolžine 60 ms prikazuje slika 2.



Slika 2: Porazdelitev pH sprememb v tkivu po dovajanju elektroporacijskih pulzov napetosti 100 V in skupne dolžine 60 ms.

Za natančnejši prikaz porazdelitve pH sprememb v tkivu smo si izbrali tri črte, ki so označene na postavitvi elektrod, prikazani na sliki 1. Črta L1 poteka skozi eno izmed anod in eno izmed katod, črta L2 poteka skozi obe anodi in črta L3 poteka skozi obe katodi. Porazdelitev pH sprememb v tkivu po dovajanju elektroporacijskih pulzov napetosti 100 V in skupne dolžine 20, 40 ali 60 ms vzdolž teh črt je prikazana na sliki 3.

V tabeli 2 so navedene izračunane površine območij



Slika 3: Porazdelitev pH sprememb v tkivu po dovajanju elektroporacijskih pulzov napetosti 100 V in skupne dolžine 20, 40 ali 60 ms (a) vzdolž črte L1, ki poteka skozi eno anodo in eno katodo, (b) vzdolž črte L2, ki poteka skozi obe anodi in (c) vzdolž črte L3, ki poteka skozi obe katodi. Črtkane črte označujejo lokacije elektrod.

okoli vsake izmed elektrod, kjer je prišlo do spremembe vrednosti pH (vrednost pH < 6,9 oz. > 7,1) po dovajanju elektroporacijskih pulzov napetosti 100 V in skupne dolžine 20, 40 ali 60 ms. Kot meje območij, kjer pride do sprememb vrednosti pH, smo izbrali vrednosti 6,9 oz. 7,1 zato, da v območje ne zajamemo vrednosti, ki se od 7,0 razlikujejo zaradi numerične napake. Marino in sodelavci navajajo, da poškodbe plazmidne DNK nastopijo, kadar je le ta izpostavljena kislemu mediju s pH nižjim od 4,5, ali bazičnemu mediju s pH višjim od 8,4. Izračunane vrednosti območij okoli vsake izmed elektrod, ki ustrezajo temu pogoju, so prav tako navedene v tabeli 2.

Tabela 2: Izračunane površine območij, kjer je prišlo do spremembe vrednosti pH (vrednost pH < 6,9 oz. > 7,1) in območij, kjer pričakujemo poškodbe plazmidne DNK (vrednost pH < 4,5 oz. > 8,4) okoli vsake izmed elektrod (tj. ene izmed štirih elektrod, anode oz. katode) po dovajanju elektroporacijskih pulzov napetosti 100 V in skupne dolžine 20, 40 ali 60 ms. Kot meje območij, kjer pride do sprememb vrednosti pH, smo izbrali vrednosti 6,9 oz. 7,1 zato, da v območje ne zajamemo vrednosti, ki se od 7,0 razlikujejo zaradi numerične napake.

$t$ (ms)	20	40	60
$pH < 4,5$ (mm <sup>2</sup> )	1,583	2,528	3,437
$pH < 6,9$ (mm <sup>2</sup> )	4,973	6,777	8,301
$pH > 7,1$ (mm <sup>2</sup> )	6,013	7,353	8,384
$pH > 8,4$ (mm <sup>2</sup> )	2,870	3,872	4,693

## 4 Razprava

Na grafih, ki jih prikazuje slika 3 opazimo, da se med dovajanjem elektroporacijskih pulzov v bližini anod pojavi kislo območje, v bližini katod pa bazično. V bližini anod se pojavi skrajna vrednost pH, nižja od 2,5, v bližini katod pa višja od 13. Opazimo ostre razmejitev med nespremenjenimi in spremenjenimi vrednostmi pH, tj. področja pH front. Kot je pričakovano, se z daljšanjem skupnega časa dovedenih pulzov povečuje območje spremenjenih vrednosti pH, prav tako pa se znižujejo oz. zvišujejo skrajne dosežene vrednosti v bližini elektrod. Opazimo, da je v bližini katod površina območja spremenjenega pH večja, kot v bližini anod, prav tako pa je v bližini katod večja površina območja, kjer pričakujemo poškodbe plazmidne DNK.

V tem prispevku smo predstavili prvi korak pri izdelavi numeričnega modela, ki omogoča izračun porazdelitve pH sprememb v tkivu med dovajanjem elektroporacijskih pulzov. Model smo uporabili za izračun porazdelitve pH sprememb v tkivu med dovajanjem elektroporacijskih pulzov, ki se uporabljajo pri genski transfekciji. Numerični model ima na tej stopnji razvoja težave s konvergenco in potrebuje nadaljnji razvoj. Težave povzročajo relativno visoke napetosti, ki se uporabljajo v elektroporaciji, visoki koncentracijski gradienti in pa dejstvo, da rešujemo sistem petih močno nelinearnih sklopljenih parcialnih diferencialnih enačb. Prav tako v tej fazi še niso upoštevane naravne sposobnosti tkiva za nevtralizacijo povzročenih pH sprememb, rezultati izračunov pa niso bili validirani z rezultati realnih eksperimentov.

## Zahvala

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

## Literatura

[1] T. Kotnik, L. Rems, M. Tarek, in D. Miklavčič, „Membrane Electroporation and Electroporability: Mechanisms and Models“, *Annu. Rev. Biophys.*, let. 48, št. 1, str. 63–91, maj 2019.

[2] M. L. Yarmush, A. Golberg, G. Serša, T. Kotnik, in D. Miklavčič, „Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges“, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, let. 16, št. 1, str. 295–320, jul. 2014.

[3] T. Kotnik, W. Frey, M. Sack, S. Haberl Meglič, M. Peterka, in D. Miklavčič, „Electroporation-based applications in biotechnology“, *Trends in Biotechnology*, let. 33, št. 8, str. 480–488, avg. 2015.

[4] S. Mahnič-Kalamiza, E. Vorobiev, in D. Miklavčič, „Electroporation in Food Processing and Biorefinery“, *J. Membrane Biol.*, let. 247, št. 12, str. 1279–1304, dec. 2014.

[5] C. Rosazza, S. Haberl Meglič, A. Zumbusch, M.-P. Rols, in D. Miklavčič, „Gene Electrotransfer: A Mechanistic Perspective“, *CGT*, let. 16, št. 2, str. 98–129, apr. 2016.

[6] N. Olaiz idr., „Tissue damage modeling in gene electrotransfer: The role of pH“, *Bioelectrochemistry*, let. 100, str. 105–111, dec. 2014.

[7] P. Turjanski, N. Olaiz, P. Abou-Adal, C. Suárez, M. Risk, in G. Marshall, „pH front tracking in the electrochemical treatment (EChT) of tumors: Experiments and simulations“, *Electrochimica Acta*, let. 54, št. 26, str. 6199–6206, nov. 2009.

[8] E. Luján idr., „Optimal dose-response relationship in electrolytic ablation of tumors with a one-probe-two-electrode device“, *Electrochimica Acta*, let. 186, str. 494–503, dec. 2015.

[9] A. Soba idr., „Integrated analysis of the potential, electric field, temperature, pH and tissue damage generated by different electrode arrays in a tumor under electrochemical treatment“, *Mathematics and Computers in Simulation*, let. 146, str. 160–176, apr. 2018.

[10] A. Mokhtare, M. Shiv Krishna Reddy, V. A. Roodan, E. P. Furlani, in A. Abbaspourrad, „The role of pH fronts, chlorination and physicochemical reactions in tumor necrosis in the electrochemical treatment of tumors: A numerical study“, *Electrochimica Acta*, let. 307, str. 129–147, jun. 2019.

[11] E. M. Calzado, H. Schinca, L. E. B. Cabrales, F. M. García, P. Turjanski, in N. Olaiz, „Impact of permeabilization and pH effects in the electrochemical treatment of tumors: Experiments and simulations“, *Applied Mathematical Modelling*, let. 74, str. 62–72, okt. 2019.

[12] P. Turjanski idr., „The Role of pH Fronts in Reversible Electroporation“, *PLoS ONE*, let. 6, št. 4, str. e17303, apr. 2011.

[13] F. Maglietti, S. Michinski, N. Olaiz, M. Castro, C. Suárez, in G. Marshall, „The Role of Ph Fronts in Tissue Electroporation Based Treatments“, *PLoS ONE*, let. 8, št. 11, str. e80167, nov. 2013.

[14] M. Marino idr., „pH fronts and tissue natural buffer interaction in gene electrotransfer protocols“, *Electrochimica Acta*, let. 255, str. 463–471, nov. 2017.

[15] E. Nilsson, J. Berendson, in E. Fontes, „Electrochemical treatment of tumours: a simplified mathematical model“, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, let. 460, št. 1–2, str. 88–99, jan. 1999.

[16] E. Nilsson in E. Fontes, „Mathematical modelling of physicochemical reactions and transport processes occurring around a platinum cathode during the electrochemical treatment of tumours“, *Bioelectrochemistry*, let. 53, št. 2, str. 213–224, mar. 2001.