

ANALÝZA BUNĚK KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU

PAVLÍNA SVOBODOVÁ^{a,b}, KATEŘINA VÍTKOVÁ^c, VÁCLAV PROCHÁZKA^c a JAN PETR^{a*}

^a Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů – Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, ^b Gymnázium a Jazyková škola s právem státní jazykové zkoušky Zlín, náměstí T. G. Masaryka 2734-9, 760 01 Zlín, ^c Fakultní nemocnice Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba
secjpetr@gmail.com

Došlo 16.1.12, přijato 11.4.12.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, kmenové buňky, disperze, iontová síla

Úvod

Buňka je základní stavební a funkční jednotka těl organismů a procesy, které v buňce probíhají, mají vliv na celý živý organismus¹. Z toho vyplývá i nutnost pochopení těchto procesů jak v jednotlivých buňkách, tak v oblasti vzájemné buněčné komunikace a vyšší organizace buněk. Pochopení těchto jevů pak dává jednoznačnou využitelnost získaných poznatků v oblasti diagnostiky a léčby závažných chorob, cíleného doručení léčiv apod. (cit.^{2,3}). Jedním ze zajímavých úkolů je studium buněk a jejich chování ve vitálním stavu⁴, kdy není primárním úkolem „rozbití“ buňky a studium např. jejich obsahu. Takto získané informace pak slouží jak k obecné charakterizaci buněk a jejich množství, tak k dalšímu a detailnějšímu popisu jejich chování např. v prostředí s narušenou acidobazickou rovnováhou, v prostředí obsahujícím látky užívané k terapii chorob nebo v prostředí nanočástic používaných pro zobrazování. V případě obecné charakterizace buněk a jejich množství se nejčastěji využívá mikroskopických technik⁵ a průtokové cytometrie⁶. Nicméně, pro detailnější studium se jako výhodné jeví použití i techniky kapilární elektroforézy, která může poskytnout další informace o chování buněk z pohledu koloidní chemie.

Kapilární elektroforéza je analytická separační technika, kde je separace založena na rozdílech v rychlosti pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli^{7,8}. Kapilární elektroforézou lze separovat jak malé anorganické a organické ionty, tak makromolekuly včetně proteinů a fragmentů nukleových kysel

lin^{8,9}. Zajímavou aplikační oblastí je i analýza velkých částic, jako jsou právě buňky¹⁰, mikročástice a nanočástice¹¹, mikroorganismy¹² nebo buněčné orgány¹³. Tyto útvary se pohybují v elektrickém poli v závislosti na jejich náboji, resp. zeta potenciálu (hustotě povrchového náboje), jejich velikosti (efektivní velikosti odpovídající jejich velikosti včetně solvatačního obalu) a tvaru^{14,15}. Kromě výše uvedeného umožňuje kapilární elektroforéza zjistit jejich schopnost agregace, resp. jejich koloidní stabilitu¹⁶. Zvláštní skupinou aplikací je pak analýza jednotlivých buněk pro studium např. metabolismu jedné buňky apod. (cit.^{17–20}).

Cílem této práce bylo pilotní studium elektroforetického chování kmenových buněk tukové tkáně. Kmenové buňky jsou specifickým typem buněk, jedná se o nespecializované buňky, které mají schopnost dělit se a přeměnit se na jiný buněčný typ^{21,22}. Kmenové buňky jsou přítomny v různých typech tkání např. v kostní dřeni či tukové tkáni. Z medicínského pohledu tato schopnost umožňuje tělu vytvořit nové buňky a tím „opravit“ poškozené části organismu. Jedním z příkladů využití této schopnosti kmenových buněk je léčba chronického nedokrvení končetin označovaného jako tzv. diabetická noha^{23,24}. Toto onemocnění postihuje ročně 500–750 nemocných/milion obyvatel. Je způsobeno tím, že v průběhu cukrovky klesá zásobenění dolních končetin kyslíkem a živinami, dochází k poškození cévního i nervového systému, které může vést až k amputaci končetiny. V případě léčby diabetické nohy pomocí kmenových buněk jsou pacientovi aplikovány vlastní kmenové buňky získané separací tukové tkáně nebo kostní dřeni. Pomocí kmenových buněk pak dochází k obnově cévního systému, tzv. neovaskularizaci končetiny, a tím k rychlé a účinné léčbě tohoto problému²⁵.

Experimentální část

Chemikálie

Složky základního elektrolytu (*N*-morfolinethan-sulfonová kyselina (MES), hydroxid sodný, chlorid sodný, citronová kyselina, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), didodecyldimethylammonium bromid (DDAB), cetyltrimethylammonium bromid (CTAB)) byly zakoupeny od firmy Sigma (St. Louis, USA) v čistotě p.a. Kmenové buňky z tukové tkáně byly získány pomocí TGI 1000/1200 Cell Isolation System (Tissue Genesis, Ing., Havaj, USA) ve Fakultní nemocnici Ostrava. S kmenovými buňkami bylo pracováno jako s potenciálně biologicky nebezpečným materiálem.

Aparatura

Měření bylo prováděno na přístroji HP 3D-CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s detektorem s diodovým polem snímajícím při 200 a 254 nm. Pro měření byla použita nepokrytá křemenná kapilára s vnitřním průměrem 75 μm, celkovou délkou

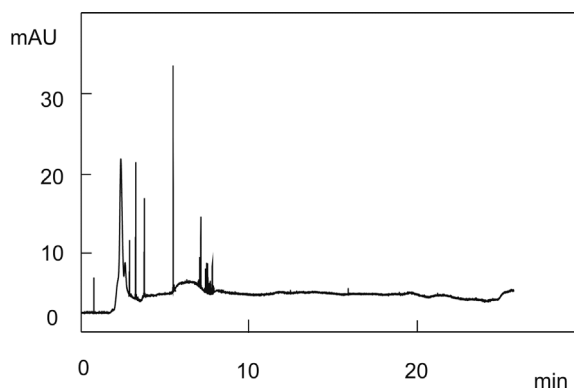
48,5 cm a efektivní délkou 40 cm. Kapilára byla termostatována na 25 °C. Každý den byla kapilára kondicionována promytím 0,1 M-NaOH (15 min) a deionizovanou vodou (10 min). Mezi každým měřením byla kapilára promývána 0,1 M-NaOH (2 min), deionizovanou vodou (2 min) a základním elektrolytem (5 min). V případě dynamického pokrytí kapiláry pomocí DDAB byla kapilára promývána 0,1 M-NaOH (2 min), deionizovanou vodou (2 min), roztokem DDAB v deionizované vodě o koncentraci 5 mg ml⁻¹ (10 min) a základním elektrolytem (5 min). Základní elektrolyt MES/NaOH pH 6,0 byl připraven rozpuštěním vypočteného množství MES v deionizované vodě a pH roztoku bylo upraveno titrací roztokem NaOH v deionizované vodě. Základní elektrolyt citrát/Tris pH 8,0 byl připraven rozpuštěním vypočteného množství kyseliny citrónové v deionizované vodě a pH roztoku bylo upraveno titrací Tris. V případě použití dalších látek v elektrolytu byly tyto přidány až po upravení pH. Suspenze kmenových buněk byla před dávkováním sonikována 0,5 min při 25 °C. Vzorek byl dávkován 5 s tlakem 50 mbar.

Výsledky a diskuse

Kmenové buňky tukové tkáně byly izolovány separací lipoaspirátu tukové tkáně pacienta v separátoru (viz Experimentální část). V tomto případě separovaná fáze tukových buněk obsahuje jak vlastní tukové buňky, tak vnitřní prostředí používané k uchování buněk. V případě analýzy takto připravených kmenových buněk je nutné analyzovat i slepý vzorek obsahující separát bez tukových buněk pro průkaz přítomnosti daných kmenových buněk. Obecně lze tvrdit (viz Úvod), že se kmenové buňky budou při elektroforetických separacích chovat stejně jako jiné buňky lidské nebo živočišné tkáně, případně nanočástice. Toto spojení vyplývá především z podobnosti rozměrů buněk a nanočástic, jejich povrchu (zeta potenciálu) a tím i jejich podobného elektroforetického chování. Lze očekávat, že kmenové buňky mohou být analyzovány ve formě buněčných klastrů, podobně jako jsou analyzovány kapilární elektroforézou mikroorganismy²⁶, anebo ve formě stabilních disperzí, jak jsou v současnosti analyzovány spíše nanočástice²⁷.

Pro pilotní ověření obou teorií byla vybrána trojice podmínek: 1) elektrolyt obsahující MES/NaOH pH 6,0 s iontovou silou 10 mM a dynamickým pokrytím vnitřní stěny kapiláry pomocí DDAB (pro tvorbu stabilní disperze buněk), 2) elektrolyt obsahující MES/NaOH pH 6,0 s iontovou silou 10 mM (pro tvorbu stabilní disperze buněk) a 3) elektrolyt obsahující citrát/Tris pH 8,0 s iontovou silou 10 mM a přidavkem 1 mg ml⁻¹ CTAB (pro tvorbu klastrů buněk).

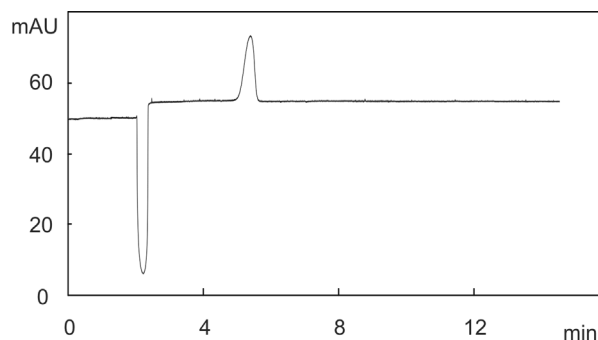
V případě elektrolytu MES/NaOH bez použití dynamického pokrytí vnitřní stěny kapiláry nedošlo k viditelné separaci buněk, analyzované profily byly naprosto neopakovatelné (obr. 1). V případě elektrolytu MES/NaOH s dynamickým pokrytím vnitřní stěny kapiláry pomocí DDAB byl získán profil odpovídající tvorbě jedné disperze



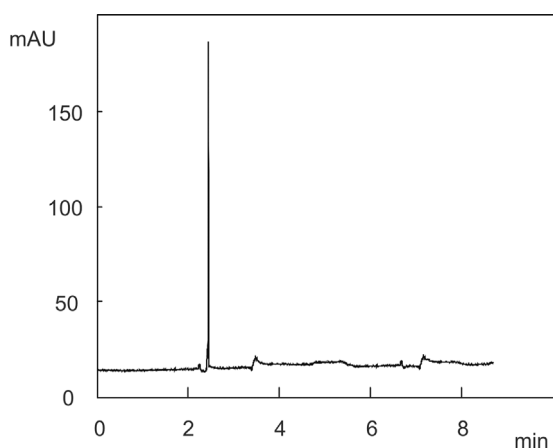
Obr. 1. Analýza suspenze kmenových buněk s použitím elektrolytu MES/NaOH pH 6,0; Elektrolyt: 10 mM MES/NaOH pH 6,0; napětí: +30 kV

buněk (obr. 2), který byl opakovatelný (relativní směrodatná odchylka migračních časů byla menší než 3%). V případě elektrolytu citrát/Tris se podařilo získat jeden agregát buněk (obr. 3), který měl opět špatnou opakovatelnost migračních časů i odezvy. Protože Petr a Maier (cit.²⁸) ve svém přehledném článku o elektroforéze mikroorganismů upozorňují na mnoho problémů s analýzou klastrů, bylo pro další studium vybráno prostředí elektrolytu MES/NaOH s DDAB pokrytím, kde byl získán nejlepší profil buněk odpovídající jejich disperzi.

V následujícím kroku byly studovány experimentální podmínky za použití elektrolytu MES/NaOH a DDAB pokrytí. Bylo testováno pH, iontová síla elektrolytu a teplota. Vliv pH byl studován v rozmezí pH 5,0 až 7,0 za použití 10 mM MES/NaOH, přičemž nebyl pozorován žádný signifikantní vliv pH na tvar piku nebo migraci buněk. Pravděpodobně změna v tomto rozmezí pH nemá zásadní vliv na hustotu povrchového náboje buněk a tím i na jejich elektroforetické chování. Vliv iontové síly byl studován pomocí přidavku NaCl k základnímu elektrolytu.

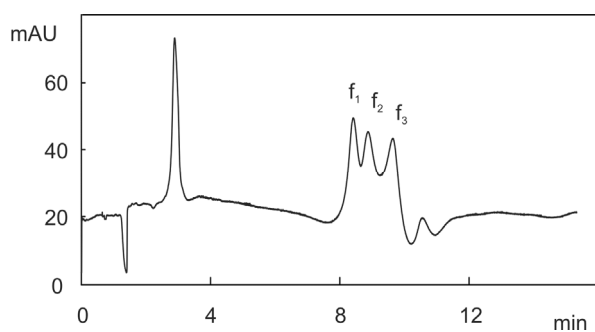


Obr. 2. Analýza suspenze kmenových buněk s použitím elektrolytu MES/NaOH pH 6,0 a dynamickým pokrytím vnitřní stěny kapiláry pomocí DDAB; Elektrolyt: 10 mM MES/NaOH pH 6,0; napětí: -30 kV; DDAB 5 mg ml⁻¹, negativní pík reprezentuje marker elektroosmotického toku



Obr. 3. Analýza suspenze kmenových buněk s použitím elektrolytu citrát/Tris pH 8,0 s CTAB; Elektrolyt: 10 mM citrát/Tris pH 8,0 s přídavkem 1 mg ml⁻¹ CTAB; napětí: -30 kV

Iontová síla obecně ovlivňuje zeta potenciál buněk a tím ovlivňuje i jejich schopnost agregace, popř. separace. Byly studovány následující koncentrace NaCl: 0 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM a 200 mM. Při použití 200 mM NaCl byl překročen nastavený limit pro procházející elektrický proud (100 μ A). Z důvodů možnosti generování velkého Jouleova tepla nebyla tato koncentrace dále testována. Zajímavého výsledku bylo dosaženo při použití 150 mM-NaCl v 10 mM MES/NaOH pH 6,0 (celková iontová síla 160 mM). V tomto elektrolytu byla pozorována opakovatelná separace kmenových buněk na tři frakce (viz obr. 4), lišící se v poměru hustoty povrchového náboje (zeta potenciálu) k hydrodynamické velikosti. Lze tedy předpokládat, že tyto frakce se budou výrazně lišit i povrchovou strukturou a biologickými vlastnostmi a jsou proto v současnosti dále intenzivně studovány. Posledním studovaným parametrem byla teplota, která má vliv jak na vlastní viskozitu elektrolytu, tak na zeta potenciál buněk a jejich schopnost agregace (termodynamickou stabilitu ko-



Obr. 4. Analýza suspenze kmenových buněk v elektrolytu MES/NaOH pH 6,0 s přídavkem NaCl; Elektrolyt: 10 mM MES/NaOH pH 6,0 s přídavkem 150 mM-NaCl; napětí: +20 kV; $f_1 - f_3$ představují frakce kmenových buněk lišících se ve svém poměru povrchového náboje k hydrodynamické velikosti

loidní disperze buněk). Byly testovány 3 různé teploty: 25 °C, 40 °C a 60 °C. Ve všech třech případech nebyla pozorována změna, která by odpovídala změně chování frakcí kmenových buněk.

Závěr

Během této pilotní studie bylo prokázáno, že kapilární elektroforéza je ideální metodou pro charakterizaci kmenových buněk, a to především díky rychlosti analýzy a možnosti snadno ovlivňovat separační prostředí (selektivitu). Navíc se podařilo prokázat, že kapilární elektroforéza umožňuje rozdělit analyzované kmenové buňky tukové tkáně na tři frakce, které jsou dále intenzivně zkoumány pro jejich potenciální využití v medicíně.

Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za finanční podporu výzkumu (projekt Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace CZ.1.05/2.1.00/03.0058 a projekt Operačního programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost CZ.1.07/2.3.00/20.0018).

LITERATURA

- Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L.: *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York 2007.
- Cole A. J., Yang V. C., David A. E.: *Trends Biotechnol.* 29, 323 (2011).
- Malam Y., Loizidou M., Seifalian A. M.: *Trends Pharm. Sci.* 30, 592 (2009).
- Jankowski J. A., Tracht S., Sweedler J. V.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 14, 170 (1995).
- Lewin B., Cassimeris L., Lingappa V. R., Plopper G. (ed.): *Cells*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury 2007.
- Goldys E. M. (ed.): *Fluorescence Applications in Biotechnology and the Life Sciences*. Wiley-Blackwell, New Jersey 2009.
- Kašička V.: *Chem. Listy* 91, 320 (1997).
- Khaledi M. G. (ed.): *High-Performance Capillary-Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*. J. Wiley, New York 1998.
- Frost N. W., Jing M., Browser M. T.: *Anal. Chem.* 82, 4682 (2010).
- Huang W. H., Ai F., Wang Z. L., Cheng J. K.: *J. Chromatogr., B* 866, 104 (2008).
- Pyell U.: *Electrophoresis* 31, 814 (2010).
- Rodriguez M. A., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr., B* 800, 7 (2004).
- Olson K. J., Ahmadzadeh H., Arriaga E. A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 906 (2008).
- Radko S. P., Chrambach A.: *Electrophoresis* 23, 1957 (2002).
- Klodzinska E., Buszewski B.: *Anal. Chem.* 81, 8 (2009).
- Petr J., Teste B., Descroix S., Siaugue J.-M., Gareil P., Varenne A.: *Electrophoresis* 31, 2754 (2010).

17. Lin Y. Q., Trouillon R., Safina G., Ewing A. G.: *Anal. Chem.* **83**, 4369 (2011).
18. Gilman S. D., Ewing A. G.: *Anal. Chem.* **67**, 58 (1995).
19. Nemes P., Knolhoff A. M., Rubakhin S. S., Sweedler J. V.: *Anal. Chem.* **83**, 6810 (2011).
20. Xie W. J., Xu A. S., Yeung E. S.: *Anal. Chem.* **81**, 1280 (2009).
21. Rafii S., Lyden D.: *Nat. Med.* **9**, 702 (2003).
22. Uccelli A., Moretta L., Pistoia V.: *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 726 (2008).
23. Singh N., Armstrong D. G., Lipsky B. A.: *J. Am. Med. Assoc.* **293**, 217 (2005).
24. Hinchliffe R. J., Valk G. D., Apelqvist J., Armstrong D. G., Bakker K., Game F. L., Hartemann-Heurtier A., Londahl M., Price P. E., van Houtum W. H., Jeffcoate W. J.: *Diabetes/Metab. Res. Rev.* **24**, S119 (2008).
25. Procházka V., Gumulec J., Jalůvka F., Šalounová D., Jonszta T., Czerný D., Krajča J., Urbanec R., Klement P., Martinek J., Klement G. L.: *Cell Transplant.* **19**, 1413 (2010).
26. Armstrong D. W., Girod M., He L. F., Rodriguez M. A., Wei W., Zheng J. J., Yeung E. S.: *Anal. Chem.* **74**, 5523 (2002).
27. d'Orlyé F., Varenne A., Georgelin T., Siaugue J. M., Teste B., Descroix S., Gareil P.: *Electrophoresis* **30**, 2572 (2009).
28. Petr J., Maier V.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **31**, 9 (2012).

P. Svobodová^{a,b}, K. Vítková^c, V. Procházka^c, and J. Petr^a (^a *Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*; ^b *Grammar School, Zlín, Czech Republic*; ^c *University Hospital, Ostrava-Poruba, Czech Republic*): **Analysis of Cells by Capillary Electrophoresis**

Cell analysis is an important task in both analytical and medicinal chemistry. A pilot study of capillary electrophoresis analysis of adipose stem cells is presented. The optimum conditions for cell analysis were found in morpholinoethanesulfonic acid (MES)/NaOH buffer (pH 6.0) with an addition of NaCl. Capillary electrophoresis proved to be an effective tool in analysis of adipose stem cells. It could be also used for solving many other tasks in medicinal chemistry.