

Nataša Pavšelj¹, David Cukjati², Selma Čorovič³, Tomaž Jarm⁴, Gregor Serša⁵, Damijan Miklavčič⁶

Spremljanje, modeliranje in analiza dogajanja med elektroporacijo celičnih membran *in vivo* ter njena uporaba

Assessment, Modeling and Analysis of Cell Membrane Electroporation In Vivo and Its Applications

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: celična membrana, elektroporacija, gensko zdravljenje, zdravilo sistemi sproščanja

Membrana biološke celice v splošnem ni prepustna za večje molekule. Dovolj visoko električno polje pa povzroči elektroporacijo celične membrane in začasno poveča njeno prepustnost, tako da molekule, kot so zdravilne učinkovine večjih molekulskih mas ali DNA, lahko vstopijo v celično notranjost. Najbolj razširjene biomedicinske uporabe elektroporacije so elektroterapija, vnos genov v celice in vnos zdravilnih učinkovin v telo skozi kožo. Pri vseh teh metodah je zelo pomembno, da dosežemo učinkovito elektroporacijo in obenem ne poškodujemo tkiva s previsokim električnim poljem. Uspešnost elektroporacije lahko zaznamo šele po koncu dovajanja pulzov (pri nekaterih metodah *in vitro* lahko že po nekaj minutah, *in vivo* pa ponavadi po 24 ali več urah), z merjenjem spremembe prevodnosti permeabiliziranega tkiva pa bi bilo mogoče potek elektroporacije spremljati že med dovajanjem pulzov. Poleg tega pa opis elektroporacije v celicah in tkivih s pomočjo analitičnih in numeričnih metod predstavlja pomembno orodje za analizo in razlago kompleksnih dogajanj, načrtovanje poskusov *in vivo*, oblik in postavitev elektrod ter novih protokolov. Pri tem moramo biti pozorni na lastnosti tkiv, ki jih opisujemo z modeli, spremembe njihove prevodnosti med elektroporacijo in na nekatere pozitivne ali negativne sekundarne in stranske učinke. V članku predstavljamo najpomembnejše vidike eksperimentalne elektroporacije *in vivo* in načine, ki so nam na voljo za spremljanje in analizo dogajanja, naš cilj pa je kasnejša uporaba metode v klinične namene.

177

ABSTRACT

KEY WORDS: cell membrane, electroporation, gene therapy, drug delivery systems

Cell membrane is, in general, impermeable to larger molecules. However, the application of electric pulses to cells, either in suspension or as tissue, causes the electroporation of the cell

¹ Dr. Nataša Pavšelj, univ. dipl. el., Laboratorij za biokibernetiko, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška 25, 1000 Ljubljana.

² Doc. dr. David Cukjati, univ. dipl. el., Laboratorij za biokibernetiko, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška 25, 1000 Ljubljana.

³ Mag. Selma Čorovič, univ. dipl. el., Laboratorij za biokibernetiko, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška 25, 1000 Ljubljana.

⁴ Doc. dr. Tomaž Jarm, univ. dipl. el., Laboratorij za biokibernetiko, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška 25, 1000 Ljubljana.

⁵ Prof. dr. Gregor Serša, univ. dipl. biol., Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana.

⁶ Prof. dr. Damijan Miklavčič, univ. dipl. el., Laboratorij za biokibernetiko, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška 25, 1000 Ljubljana.

membrane, increasing its permeability and making it possible for larger molecules which otherwise cannot cross the membrane, such as drug molecules or the DNA, to enter cells. The most widely used electroporation-based biomedical applications are electrochemotherapy, gene electrotransfer and transdermal drug delivery. A high level of cell membrane electroporation is the objective of all applications. However, caution should be exercised in order not to damage the tissue with excessively strong electric fields. The outcome of electroporation-based treatments can be assessed by various methods a certain time after treatment. The course of tissue permeabilization can be evaluated by measuring tissue conductivity changes during pulse delivery. Furthermore, cell and tissue electroporation can be described by means of analytical methods or numerical modeling which offers useful insight into the understanding of the underlying biological processes and can help us plan future experiments and develop new electrodes and protocols.

UVOD

Membrana biološke celice v splošnem ni prepustna za večje molekule. Že kratkotrajni visokonapetostni električni pulz pa lahko prepustnost celične membrane poveča. S tem omogočimo molekulam, kot so nekatere zdravilne učinkovine večjih molekulskih mas in molekule DNA, za katere je sicer celična membrana neprepustna ali slabo prepustna, neposreden vstop v celično notranjost. Metoda imenujemo elektroporacija celične membrane in je običajno reverzibilna, ob dovolj visokem električnem polju in njegovem dovolj dolgem trajanju pa je lahko tudi ireverzibilna, kar povzroči celično smrt. Z elektroporacijo lahko v celice vnašamo DNA, citotoksična zdravila, olajšamo vstop specifičnim zaviralcem znotrajcelične encimske aktivnosti ali pa v celično membrano vstavljamo beljakovine. Prav tako lahko preučujemo nekatera dogajanja, kot sta aktivnost encimov *in vivo* ali celična signalizacija preko nadzora koncentracije ionov v citosolu. Nadalje lahko s pomočjo elektroporacije celice tudi zlivamo med seboj (1). Najpomembnejše in najpogostejše uporabljane biomedicinske elektroporacijske aplikacije so elektrokemoterapija, vnos genov v celice in vnos zdravilnih učinkovin v telo skozi kožo (2–5). Obstajajo različne razlage za povečanje prepustnosti celične membrane, ena od njih temelji na nastanku tako imenovanih por, od tod tudi izraz elektroporacija, ki se med raziskovalci na tem področju najpogostejše uporablja. Posledica dovajanja dovolj visokih električnih pulzov pa je prav gotovo povečanje prepustnosti celične mem-

brane, zato se namesto besede elektroporacija pogosto uporablja izraz elektropermeabilizacija. Slednjega bomo v nadaljevanju uporabljali predvsem takrat, ko bomo želeli izpostaviti povečano prepustnost – (elektro)permeabilnost – membran celic.

Elektropermeabilizacija celic je odvisna od različnih dejavnikov: prevodnosti medija, parametrov električnih pulzov ter od velikosti, oblike, orientacije in gostote celic. Parametri električnih pulzov ter oblika in postavitev elektrod so edini dejavniki elektroporacije celic v pogojih *in vivo*, na katere lahko vplivamo. Prav zato so bile objavljene številne raziskave, katerih cilj je bil razviti najbolj uspešne elektroporacijske protokole za različne vrste celic, tkiv in aplikacij. Poskusi so pokazali, da tako število pulzov kot tudi njihova amplituda in trajanje vplivajo na uspešnost elektroporacije. Nekateri predlagani protokoli zato združujejo električne pulze različnih amplitud in trajanj (6).

V klinični praksi je zelo pomembno, da se doseže učinkovita elektroporacija ob čim manjši poškodbi tkiva. Celična membrana se permeabilizira pri pragovni vrednosti transmembranske napetosti, le-ta pa nastopi pri pragovni vrednosti jakosti zunanjšega električnega polja. Pri tem moramo paziti, da celic zaradi previsokega električnega polja ne poškodujemo. Zato želimo, da je njegova jakost med reverzibilnim in ireverzibilnim pragom permeabilizacije. To je še posebej pomembno za gensko transfekcijo *in vivo*, kjer želimo doseči visoko stopnjo prepustnosti celičnih membran in obenem preživeti premeabiliziranih celic. Žal učinke elektroporacije zaznamo

še po določenem času, zaželeno pa bi bilo spremljanje poteka elektroporacije in s tem napovedovanje njenih učinkov med samim dovajanjem električnih pulzov. Možna načina sta meritev spremembe prevodnosti tkiva ali pa električna impedančna tomografija. Na tem področju so bile narejene študije, ki kažejo na morebitno uporabnost impedančne tomografije za spremljanje elektroporacije v realnem času, vseeno pa bo do njene uporabe v klinični praksi potrebno še nekaj dela (7–8).

Potek elektropermeabilizacije tkiva in vpliv spremembe parametrov na porazdelitev električnega polja v tkivu in tokove skozenj med elektroporacijo in po njej lahko preučujemo tudi z numeričnimi modeli. Teoretična razlaga dogajanja nam namreč nudi pomemben vpogled v proces elektropermeabilizacije celic, tkiv in organov, pri čemer si lahko pomagamo z analitičnimi izračuni in numeričnim modeliranjem. Predvsem slednje se je izkazalo za nepogrešljivo pri izračunih porazdelitve električne poljske jakosti v tkivih in organih, kjer so obravnavane geometrije preveč zapletene za uporabo analitičnih metod.

Poznavanje mehanizmov elektroporacije celic v tkivih v pogojih *in vivo* razširja osnovno znanje o delovanju električnih polj na celice v pogojih *in vitro*. Teorijo elektroporacije celične membrane in opis poskusov *in vitro* smo v Medicinskih razgledih že opisovali (9). Poskusi *in vitro* nam ne morejo podati optimalnih parametrov za uspešno elektroporacijo *in vivo*, saj je gostota celic in s tem njihova medsebojna interakcija mnogo večja v tkivu (10–12). Prav tako v tkivu niso vse celice enakega tipa. Takšno nehomogeno sestavo tkiva je mnogo težje raziskati kot posamezne celice ali celice v suspenziji. Različne celice ne bodo elektroporirane pri istih vrednostih električnega polja, ki ga moramo prilagoditi na ciljno skupino celic. Za izboljšanje razumevanja elektroporacije v pogojih *in vivo* delamo poskuse na malih laboratorijskih živalih in tudi na večjih živalih.

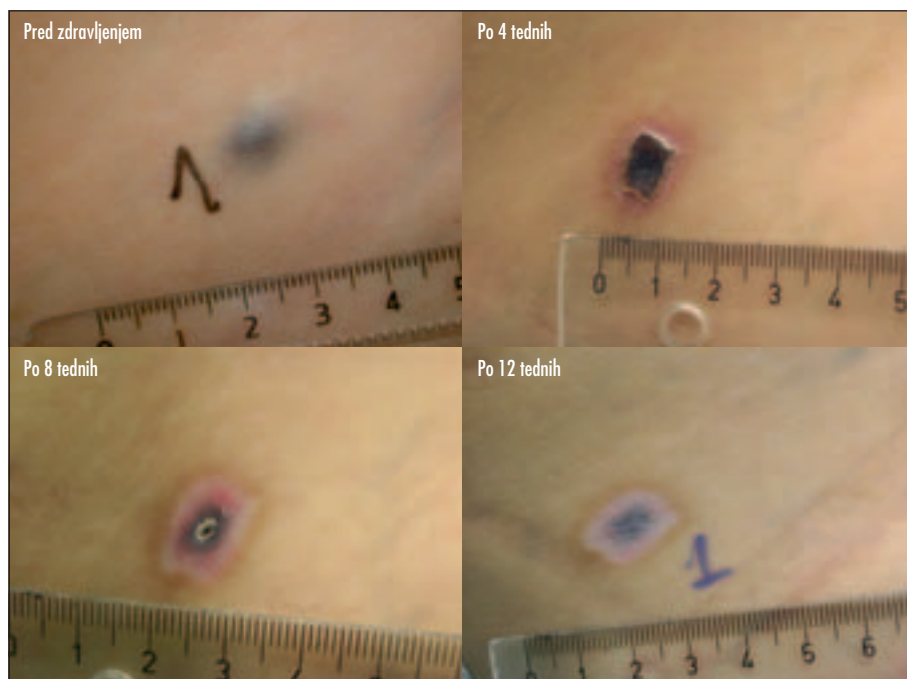
Pri poskusih potrebujemo opremo za dovajanje elektroporacijskih pulzov. Oprema obsega generator visokonapetostnih pulzov in elektrode, preko katerih električne pulze dovedemo tkivu. Elektrode izberemo glede na ciljno tkivo in njegovo lokacijo in so lahko

invazivne (igelne) ali neinvazivne (ploščate) (13). Naš cilj je, da je električno polje, ki se ustvari med elektrodama, višje od potrebne za permeabilizacijo, da pokrije celotno prostornino ciljnega tkiva in je hkrati čimbolj homogeno (14). Obenem pa bi radi v okoliškem tkivu dosegli čim nižjo vrednost električnega polja.

UPORABA ELEKTROPORACIJE IN VIVO

Elektrokemoterapija

Problem uničevanja tumorskih celic s kemoterapevtiki je velikokrat njihova nespecifična citotoksičnost, ki škoduje tudi zdravim celicam, ter rezistenca tumorskih celic zaradi genetskih sprememb. Za uspešno zdravljenje je potrebna dovolj velika koncentracija kemoterapevtika, ki običajno vpliva tudi na normalne celice in povzroča neželene stranske učinke. Poseben problem predstavljajo kemoterapevtiki, ki težko prehajajo celično membrano – v takih primerih so pri zdravljenju potrebni še večji odmerki zdravil. Elektrokemoterapija je metoda hkratne uporabe kemoterapevtikov in elektroporacije ciljnega tkiva. S to metodo se učinkovitost kemoterapevtikov, ki zaradi slabe prepustnosti celične membrane težko vstopajo v notranjost tumorskih celic (cisplatin, bleomicin), močno poveča. Obenem pa se zmanjšajo stranski učinki, ker za učinkovito zdravljenje zadoščajo nizki odmerki kemoterapevtikov. Prvi poskusi na področju elektrokemoterapije segajo v leti 1987 in 1988 (15–17). Številne raziskave kažejo na večstokratno povečanje učinkovitosti kemoterapevtika bleomicin ter do 70-kratno povečanje učinkovitosti kemoterapevtika cisplatin *in vitro*, kadar ju uporabimo v kombinaciji z elektroporacijo ciljnega tkiva (18–19). Elektrokemoterapijo vedno bolj uspešno uporabljajo tudi v klinični praksi za zdravljenje kožnih zasevkov tumorjev različnih histologij (slika 1). Glavnina z elektrokemoterapijo zdravljenih tumorjev so bili kožni zasevki malignega melanoma, kožnega bazalno celičnega karcinoma, zasevki adenokarcinomov vratu in glave, tumorjev dojke, pa tudi zasevki bolj redkih tumorjev, kot sta Kaposijev sarkom in hipernefrom (2, 3, 13, 19–22). Trenutno se elektrokemoterapija



Slika 1. Profuturnorski učinek elektrokemoterapije na kožnem zasevku malignega melanoma. Elektrokemoterapija je bila izvedena ob intratumorskem injiciranju cisplatina. Po 12 tednih je viden popoln regres zdravljenega tumorskega nodula z rahlo pigmentacijo in dobrim kozmetičnim učinkom zdravljenega predela.

uporablja za paliativne namene in v primerih, ko pride do ponovitve ali zasevanja predhodno zdravljenih tumorjev (kirurško, z obsevalno terapijo) in ti standardni pristopi niso več možni. Razvoj elektrokemoterapije gre v zdravljenje tumorjev tudi v notranjih organih, kar bo vsekakor povečalo nabor indikacij za elektrokemoterapijo.

Vnos genov v celice z elektroporacijo

Napredek na področju razkrivanja človeškega genoma je povzročil pravo evforijo v farmacevtskih in medicinskih znanstvenih krogih. Z vnašanjem genov namreč lahko zdravimo nekatere dedne in celo nalezljive bolezni. Pri genski terapiji gre za umestitev nove, delujoče kopije okvarjenega gena v genom. V splošnem tu ne moremo govoriti o zamenjavi gena, ki povzroča bolezen, z »zdravim« genom, temveč le dodamo delujočo kopijo, da bi nadomestila funkcijo okvarjenega gena. Za vnos nove kopije gena pa potrebujemo nek nosilec, tako

imenovani vektor, s katerim terapevtski gen vnesemo v pacientove ciljne celice. Poleg načrtovanja ustrezne učinkovite molekule nukleinskih kislin pa je še vedno problematičen prav uspešen vnos genov v ciljne celice in tkiva. Virusni vektorji, čeprav uspešni pri vnosu svojega genskega zapisa s terapevtskimi geni v ciljne celice, prinašajo mnogo vprašanj glede z virusi povezanega tveganja za zdravlje ljudi (23). Veliko raziskav je zato v zadnjem času posvečeno razvoju nevirusnih metod vnosa terapevtskih genov v ciljna tkiva in organe (24–25). Ena od metod je tudi uporaba električnih pulzov za povečanje prepustnosti membrane, imenovana vnos genov z elektroporacijo (5). Uspešen vnos dosežemo z različnimi protokoli, le-ti pa lahko vključujejo vlak enakih pulzov ali pa kombinacije pulzov različnih trajanj in amplitud. Poskusi kažejo tudi na dvojnost delovanja električnih pulzov za vnos genskega materiala v celice: z visokonapetostnimi pulzi povečamo prepustnost celične membrane (elektropermeabilizacija), s pomočjo daljšega nizkonapetostnega pulza

pa električno negativne molekule DNA potisnemo v bližino permeabilizirane membrane in v notranjost celice (elektroforeza) (26–27). Pri vnosu genov v celice z elektroporacijo moramo biti še posebej pazljivi, da s previsokim električnim poljem ne ogrozimo celičnega preživetja. To pri elektrokemoterapiji predstavlja nekoliko manjši problem, saj je uničenje tumorskih celic pravzaprav naš cilj, paziti pa moramo seveda, da s previsokim električnim poljem ne poškodujemo okoliškega, zdravega tkiva.

Vnos zdravilnih učinkovin v telo preko kože

Zdravilne učinkovine lahko vnašamo v telo skozi kožo. Zaradi majhne prepustnosti kože si lahko pri tem pomagamo z različnimi metodami, kot so ultrazvok, iontoforeza (potisk električno nabitih molekul zdravilne učinkovine s pomočjo šibkega električnega toka iste polaritete) ali elektroporacija (28–31). Takšen vnos zdravilnih učinkovin ima določene prednosti, saj je manj invaziven kot intravenski vnos, izognemo pa se tudi škodljivemu vplivu prebavnih encimov in nizkih pH vrednosti na učinkovine, kar je lahko problem, kadar dajemo zdravilo peroralno. Nadalje lahko s transdermalnimi terapevtskimi sistemi dosežemo postopen, konstanten vnos zdravilne učinkovine v telo namesto hitrega dajanja z intravensko injekcijo. Vendar pa je zaradi zaščitne funkcije kože in njene zelo nizke prepustnosti vnos molekul v kožo težaven. Elektroporacija je ena od metod, s katero začasno povečamo prepustnost kože brez škodljivih posledic, električni tok pa lahko dodatno pospeši prenos ionov in električno nabitih molekul v kožo (30, 32–33).

Odstranjevanje tkiva

Pri odstranjevanju benignih ali malignih tumorjev je zelo pomembno, da to storimo na nadzorovan način, ob čim manjšem poškodovanju zdravega okoliškega tkiva. Z leti se je razvilo kar nekaj minimalno invazivnih metod, ki so alternativa invazivnim operacijam. Neželeno tkivo lahko odstranimo z vrsto načinov, kot so na primer radiofrekvenčna ablacija, kriokirurgija, ultrazvočna koagulacija, v zadnjem času pa raziskujejo tudi možnost

uporabe ireverzibilne elektroporacije. Pri ostalih zgoraj naštetih uporabah elektroporacije *in vivo*, npr. pri elektrokemoterapiji in elektrogenski terapiji, je naš cilj doseči električno polje, ki omogoča permeabilizacijo celic in obenem omogoča njihovo preživetje, pri ablaciji tkiva pa dovolj močno električno polje že samo povzroči nekrozo tkiva. Metoda ni zahtevna, je minimalno invazivna in ne zahteva uporabe dodatnih zdravilnih učinkovin (34). Ireverzibilna elektroporacija je netermična metoda, s katero se izognemo denaturaciji proteinov, struktura tkiva ostane nepoškodovana, prav tako ob njeni uporabi ne pride do vnetja in brazgotinjenja. Metodo uspešno uporabljajo za odstranjevanje tumorskega tkiva pri raku prostate in tkiva srčne mišice pri zdravljenju nekaterih srčnih aritmij (34–35). Postopki so v začetni fazi klinične rabe, v literaturi tako še ne zasledimo poročil o neželenih stranskih učinkih in slabostih.

BIOLOŠKO TKIVO IN NJEGOVE ELEKTRIČNE LASTNOSTI

Za uspešno uporabo zgoraj opisanih načinov uporabe elektroporacije moramo najprej teoretično in praktično raziskati dogajanje v tkivu med elektroporacijo *in vivo*. *In vitro* običajno izvajamo poskuse na prostornini 50–100 μ l, kjer 1 do 2 % prostornine zasedajo celice, 98 do 99 % pa gojišče. V pogojih *in vivo* celice zasedajo od 10 do 80 % prostornine. Tako v običajnih pogojih *in vitro* posamezna celica nima vpliva na permeabilizacijo ostalih celic, razen v posebnih izredno gostih celičnih suspenzijah. V pogojih *in vivo* pa načeloma že permeabilizacija ene same celice spremeni prevodnost tkiva v okolici in s tem lokalno porazdelitev električnega polja, kar lahko vpliva na permeabilizacijo sosednjih celic.

Zaradi različnih oblik celic in različnih načinov njihove namestitve v tkivu ter različnih električnih lastnosti medceličnega prostora je namreč dogajanje v tkivih na mikro nivoju precej kompleksno (36).

Razlike zaradi nehomogenosti tkiv

Biološko tkivo je zelo nehomogen material. Celice v tkivih so različnih velikosti in imajo

različne funkcije. Med vrednostmi električnih prevodnosti tkiv zasledimo velike razlike: zaradi tekočega tkiva, ki teče po žilah, mielinskih ovojnic, ki kot izolatorji ovijajo aksone živčnih celic, veznega tkiva, ki mora prenesti mehanski stres, kosti, zob, mišic, mrtvih delov kože, plinov v pljučnem tkivu itn. Kri je zelo dober prevodnik, jetra in vranica manj. Možgani prevajajo bolje, mišica slabše. Med najslabšimi prevodniki v telesih toplokrvnih živali so pljuča (zaradi visoke vsebnosti plinov), maščoba (zaradi nizke vsebnosti elektrolitov), koža (zaradi neprevodne zunanje plasti *stratum corneum*) in kosti (ker so zgrajene pretežno iz nizkoprevodnega kalcijevega fosfata). Od vseh tkiv v človeškem telesu je prevodnost kosti tudi najbolj spremenljiva. To ni presenetljivo, saj je kost po svoji strukturi zelo nehomogena. Lobanja npr. je iz dveh gostih, slabo prevodnih kosov, spužvasto tkivo med njima pa je polno krvi, ki je dober prevodnik. Podobno so tudi dolge kosti v resnici slabo prevodni votli valji, napolnjeni z visoko prevodnim žilnatim kostnim mozgom.

Anizotropnost tkiv

Nekateri biološki materiali imajo izrazite anizotropne lastnosti, kar pomeni, da so njihove fizikalne lastnosti v različnih smereh različne. Takšna je recimo mišica (37). Mišične celice so zaradi krčenja mišice usmerjene, zaradi česar so električne lastnosti odvisne od smeri merjenja. Prevodnost v smeri vzdolž mišičnih vlaken je tako večja kot prečna prevodnost, vendar pa se ta razlika z višanjem frekvence zmanjšuje.

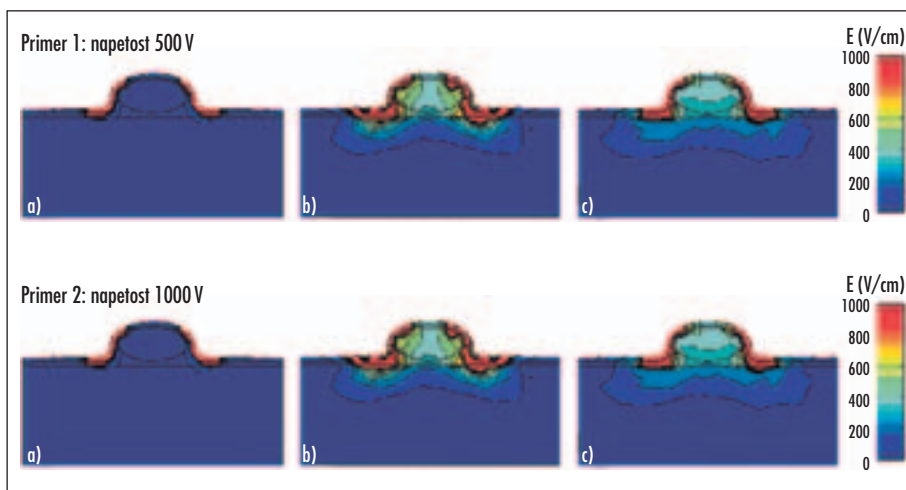
Ostali fiziološki dejavniki

Tkiva se med seboj razlikujejo tudi v odvisnosti od živalske vrste, kateri pripadajo. Vseeno pa lahko iz literature s primerjavo meritev pri različnih živalskih vrstah ugotovimo, da te razlike niso sistematične in so lahko dosti večje znotraj iste vrste kot med različnimi vrstami (38). Vpliv na električne lastnosti tkiva imajo tudi sezonske spremembe, dejavniki okolja, starost oseba in morebitna bolezenska stanja (39).

SPREMEMBA PREVODNOSTI TKIVA MED ELEKTROPORACIJO

Spremljanje permeabilizacije tkiva v realnem času je želja mnogih raziskovalcev in uporabnikov. Povratno informacijo o poteku elektropermeabilizacije tkiva bi lahko uporabili za prilagajanje električnih parametrov med samo terapijo, kar bi izboljšalo učinek terapije. V nasprotju s tem se danes še vedno uporablja vnaprej določene parametre pulzov, ki so se izkazali za najučinkovitejše. Med in po elektroporaciji se električne lastnosti tkiva spremenijo. Najbolj pomembna merljiva posledica je povečanje specifične prevodnosti tkiva, podvrženega elektroporaciji. Ob dosegu praga električne poljske jakosti, ki povzroči permeabilizacijo tkiva, steče skozenj višji tok, porazdelitev električnega polja pa je drugačna kot na začetku (40–41). Pri tem se moramo spopasti s problemom različnih električnih lastnosti tkiv, ki jih elektroporiramo. Dovedena električna napetost se bo v tkivih porazdelila po principu napetostnega delilnika, ki pravi, da se bo pri zaporedni vezavi elementov (tkiv) z različno električno upornostjo napetost po elementih (tkivih) porazdelila v razmerju vrednosti upornosti, tako da bo napetost največja na elementu (tkivu) z največjo upornostjo. Največji padec napetosti bo torej v tkivu z najvišjo specifično upornostjo, kjer bo tudi električno polje najvišje. Električne pulze vedemo tkivom preko elektrood, ki so lahko nein vazivne, zunanje, kjer pulze dovajamo preko kože (ploščate elektrode), ali pa invazivne, igelne, s katerimi predremo kožo in tako dosežemo globlje ležeča tkiva (42).

Za primer vzemimo elektrokemoterapijo podkožnega tumorja, kjer električne pulze dovedemo z zunanji ploščatimi elektrodam. Ob dovajanju električnih pulzov praktično celoten padec napetosti prevzame koža, ki je v okolici podkožnega tumorja tkivo z najvišjo specifično upornostjo. Ob uporabi dovolj visoke napetosti pulzov povzročimo permeabilizacijo kože, saj je električna poljska jakost v njej nad kritičnim pragom permeabilizacije. Električna upornost kože se med permeabilizacijo zato močno zmanjša, kar spremeni porazdelitev električne poljske jakosti tudi v podkožnih tkivih. Tako dovolj močno elek-



Slika 2. Numerični model elektropermeabilizacije podkožnega tumorja in okoliških tkiv. Pulzi so dovedeni preko ploščatih elektrod z razmikom 8 mm, napetost med njima je v prvem primeru 500 V, v drugem pa 1000 V. Elektrode so modelirane kot robni pogoji. Slike prikazujejo porazdelitev električnega polja (E) a) pred permeabilizacijo tkiv; b) med procesom elektropermeabilizacije, ko se specifične prevodnosti tkiv spreminjajo; c) v končnem stanju procesa elektropermeabilizacije. Opis postopka numeričnega izračunavanja je opisan v (40).

trično polje »doseže« tumor, s čimer povzročimo uspešno elektropermeabilizacijo tumorskih celic in s tem vnos kemoterapevtika (40).

Slika 8 prikazuje numerični izračun porazdelitve električnega polja v podkožnem tumorju in okoliških tkivih med elektroporacijo za dve različni napetosti med ploščatima elektrodama: 500 V in 1000 V.

Če pogledamo končno stanje procesa elektropermeabilizacije pri 500 V, ugotovimo, da je električno polje v večjem delu ciljnega tkiva – tumorja – še vedno pod reverzibilnim pragom permeabilizacije (le-ta znaša približno 400 V/cm). Z uporabo napetosti 1000 V pa je električno polje v tumorju zadosti visoko za uspešno permeabilizacijo, v nekaterih področjih pa celo preseže ireverzibilni prag (nad 800 V/cm). Ti rezultati se ujemajo tudi z eksperimentalnimi rezultati elektrokemoterapije podkožnega tumorja na živalskem tumorskem modelu (19).

NUMERIČNO MODELIRANJE ELEKTROPORACIJE TKIV *IN VIVO*

Za razumevanje poteka elektroporacije v tkivu in načrtovanje poskusov *in vivo* je torej pomembna teoretična analiza dogajanja v tki-

vu, pri čemer uporabljamo analitične in numerične metode. Določiti želimo porazdelitev vektorskih in skalarne električne veličin v tkivu oziroma organizmu kot posledico dovedenih električnih pulzov. Na področju bioelektromagnetike predstavljajo numerični izračuni porazdelitev električnih tokov in elektromagnetnih polj znotraj bioloških sistemov pomembno orodje za analizo in razlago kompleksnih dogajanj v bioloških sistemih. Z numeričnimi izračuni porazdelitve električnih tokov in elektromagnetnih polj lahko ovrednotimo različne električne pogoje, kot so velikosti tokov oz. napetosti, velikosti in smeri polj, geometrijo elektrod, ipd. (43–44). Eksperimentiranje na modelih je namreč lažje kot na realnih bioloških sistemih, kjer v nekaterih primerih sploh ni mogoče ali dopustno. Seveda pa moramo numerične modele ovrednotiti, tako da jih primerjamo z eksperimenti na realnih bioloških sistemih.

Spreminjanje električnega vzbujanja je poenostavljeno, saj gre le za spremembe robnih oziroma začetnih pogojev na istem modelu; le začetna faza – izgradnja modela – zahteva precej časa, natančnosti in izkušenj. Analitični izračun porazdelitve elektromagnetnih polj je enostaven le takrat, ko lahko geometrijo, nehomogenosti in anizotropnosti

materialov ter robne pogoje opišemo v izbranim koordinatnem sistemu (npr. pravokotnem, valjnem ali krogelnem). V nasprotju s tem numerične metode reševanja večinoma omogočajo približevanje dejanskim oblikam in robnim pogojem. Pri večini numeričnih metod je mogoče materialom pripisati nehomogenost in pri nekaterih tudi anizotropnost. Za večino bioloških sistemov je značilna zapletena in nepravilna geometrija ter nehomogenost in anizotropnost materialov, kar kaže na nujnost uporabe numeričnih metod v tovrstnih raziskavah.

Numerična metoda končnih elementov se je izkazala za zelo učinkovito pri analizi porazdelitve električnega polja znotraj bioloških struktur. Bistvo metode je v razdelitvi geometrije na manjše sestavne dele – končne elemente. Iskane veličine se znotraj elementov spreminjajo kot funkcije polinomov nižjega reda, odvisno od vrste elementa. Snovne lastnosti pa so znotraj elementov homogene. V področjih, kjer pričakujemo dinamično spreminjanje računanih veličin, moramo ponavadi postaviti gostejšo mrežo, prav tako tudi v področjih, kjer nas porazdelitve električnega polja še posebej zanimajo. Mreža mora biti gostejša tudi v mejnih področjih med dvema materialoma, katerih snovne lastnosti se močno razlikujejo. Slabo zgrajena mreža končnih elementov je najpogostejši vzrok za slab izračun, zato je treba gradnji mreže posvetiti še posebno pozornost. Eden najosnovnejših postopkov preverjanja modela, ki ga običajno opravimo na samem začetku raziskave, je gostitev mreže v opazovanih področjih (na primer znotraj tumorja ali v okolici elektrod). Če se pri gostejši mreži rezultati bistveno ne spremenijo, je mreža dovolj gosta. Gradnja mreže je močno poenostavljena pri modelih, katerih geometrija je pravilne ali simetrične oblike. Z določitvijo osi oziroma ravnin simetrije se zmanjša tudi potrebno število končnih elementov in s tem močno poenostavi in skrajša izračun.

DOLOČANJE ELEKTROPERMEABILIZACIJE CELIC V POGOJIH *IN VIVO*

Dober model, potrjen z rezultati meritev, nam omogoča razlago dogajanja v tkivu med elek-

troporacijo, načrtovanje poskusov *in vivo* ter geometrij elektrod. Kljub temu se moramo zavedati dejstva, da so modeli zelo poenostavljena slika realnih razmer. Numerični izračuni zato ne morejo nadomestiti eksperimentalnega dela, ampak služijo kot vir dodatnih informacij za osvetlitev dogajanj in načrtovanje eksperimentov in terapije. Zato morajo teoretičnemu modeliranju slediti poskusi, najprej v pogojih *in vitro*, kasneje neizogibno tudi poskusi *in vivo* na laboratorijskih živalih.

S poskusi *in vivo* zato želimo določiti uspešnost elektroporacije oziroma stopnjo permeabiliziranosti celic v tkivu. V pogojih *in vivo* je zaznavanje permeabilizacije celic oteženo. Markerji ali ciljne molekule namreč niso porazdeljeni enakomerno in v bližini celic, kot so to v pogojih *in vitro*, temveč nehomogeno in zaradi ovir (druge celice, ekstracelularni matriks, membrane kot je mišična ovojnica v mišici) tudi ne nujno v primerni bližini. Vnos markerjev ali ciljnih molekul je možen z lokalnim ali znotrajžilnim vnosom. Slednje je možno le, če ima močno razredčena molekula še vedno biološki učinek (npr. bleomicin) oz. če molekulo še vedno lahko zasledimo. V nadaljevanju bomo na kratko opisali nekaj metod, ki jih uporabljamo za določanje elektropermeabilizacije celic v pogojih *in vivo*.

Večina metod za določanje permeabilizacije membran celic v tkivu temelji na lastnostih markerskih molekul in na dejstvu, da z elektroporacijo membrane začasno povečamo njeno prepustnost za te molekule. Markerji ali ciljne molekule ne smejo prehajati celične membrane v običajnih razmerah, v primeru permeabilizacije celične membrane pa molekule vstopijo v membrano. Takšne molekule so npr. bleomicin, EDTA, DTPA. Njihova značilnost je, da jih po določenem času v telesu ne zasledimo, razen v primeru njihove akumulacije v celicah po elektropermeabilizaciji membrane. Če označimo molekule z radioaktivnim izotopom, jih lahko v tkivu po določenem času zaznamo z gama kamero *in situ* ali pa *ex vivo*. Učinek neoznačenega bleomicina pa lahko opazujemo na histoloških preparatih, kjer ugotavljamo spremembe v celični morfologiji. V drugi sklop molekul, ki jih lahko uporabimo za detekcijo permeabilizacije membran celic *in vivo*, sodijo npr. fluo-

rescentne molekule propidijev jodid, GFP in encim luciferaza, ki katalizira reakcijo luminescence. Vse te molekule nam omogočajo določitev tako reverzibilnega kot tudi ireverzibilnega praga. Prisotnost teh molekul pa lahko z ustrežno opremo za detekcijo opazujemo tako *in situ* kot tudi *ex vivo*. V tretji sklop metod za določitev elektropermeabilizacije celičnih membran *in vivo* pa sodi merjenje električnih lastnosti tkiva: impedančna spektrometrija in merjenje toka in napetosti ter določitev dinamične prevodnosti tkiva med samim dovajanjem elektropermeabilizacijskih električnih pulzov. Merjenje električnih lastnosti tkiva nam omogoča detekcijo praga reverzibilne elektropermeabilizacije, ne pa tudi ireverzibilne. Ireverzibilni prag elektropermeabilizacije lahko določimo tudi samo z opazovanjem pojava nekroze, vendar pa moramo tu najprej določiti optimalni čas opazovanja po elektropermeabilizaciji (44).

1. Bleomicin. Metoda temelji na spoznanju, da bleomicin prehaja plazmalemo z receptorsko posredovano endocitozo, z elektropermeabilizacijo pa se prepustnost membrane za bleomicin izrazito poveča (44–45). Bleomicin povzroči pri majhnih znotrajceličnih koncentracijah mitotično celično smrt, pri velikih pa sproži procese, ki so značilni za apoptozo. Bleomicin po vstopu v celico namreč tvori enojne in dvojne prelome DNK vijačnice. Če je teh prelomov relativno malo, celična smrt nastopi šele takrat, ko se celica deli. Kadar pa je teh prelomov veliko, pride do sproženja apoptoze. Bleomicin lahko v večjih količinah vstopi le v permeabilizirane celice. Že v nekaj minutah po vstopu bleomicina postanejo jedra apoptotična. Opazovanje karakterističnih morfoloških sprememb celic je možno na histoloških preparatih z mikroskopom. Ta metoda nam omogoča določevanje reverzibilnega praga elektropermeabilizacije tkiva, ne pa tudi ireverzibilnega praga (44).
2. ^{57}Co -Bleomicin je stabilna mešanica kobalta in bleomicina z visoko specifično radioaktivnostjo (46). Slabost metode je počasno odvajanje molekul iz telesa preko ledvic. Zato lahko dobimo rezultate šele po treh dneh, ko izmerimo stopnjo radioaktivnosti ciljnega tkiva in tako ocenimo uspešnost elektropermeabilizacije. Razpolovni

cikel ^{57}Co je 270 dni, kar pomeni, da moramo radioaktivne živali in odpadke zelo dolgo hraniti v ustrezno zaščiteni prostorih.

3. ^{51}Cr -EDTA. Radioaktivna snov, katere razpolovni čas je le 27,7 dneva. Tipično damo 0,72 MBq v veno nekaj minut pred dovajanjem električnih pulzov. Vnešena snov se porazdeli v žilnem in medceličnem prostoru, vendar ne more vstopiti v celice, če ni zagotovljen dostop, npr. z elektropermeabilizacijo. V 24 urah se radioaktivna snov, ki ni ujeta v reverzibilno permeabiliziranih celicah, izloči iz organizma. Takrat živali usmrtime, izrežemo ciljno tkivo, ga stehamo in v gama števcu izmerimo stopnjo radioaktivnosti. Vsebnost substance, ki je rezultat reverzibilne elektropermeabilizacije tkiva, izračunamo iz meritev in izrazimo v nanomolih ^{51}Cr -EDTA na gram ciljnega tkiva. Z metodo lahko določimo oba praga elektropermeabilizacije, reverzibilnega in ireverzibilnega. Ob povečevanju amplitude dovedenih pulzov najprej zaznamo povečano zadrževanje ^{51}Cr -EDTA v vzorcih tkiva, ki narašča do amplitude pulzov, pri kateri se začneja ireverzibilna elektropermeabilizacija. Od te amplitude naprej se količina ^{51}Cr -EDTA v vzorcih ponovno začne zmanjševati. Prag reverzibilne elektropermeabilizacije je torej pri amplitudi pulzov, kjer zaznamo povečanje ^{51}Cr -EDTA v vzorcu, prag ireverzibilne elektropermeabilizacije pa pri amplitudi, kjer dosežemo maksimalno količino ^{51}Cr -EDTA v vzorcu (42).
4. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA. Radiofarmacevtska snov, ki se uporablja v radionuklidni angiografiji, statičnih možganskih slikanjih ter raziskavah ledvic in sečnih poti. Farmakokinetsko je zelo podobna bleomicinu, saj se hitro izloči iz telesa s sečem. Obe snovi sta hidrofilni, kar pomeni, da ne prehajata skozi celično membrano. Snov vbrizgamo v veno pred elektropermeabilizacijo. Elektropermeabilizirano tkivo lahko slikamo z gama kamero šest ur kasneje in slike primerjamo s slikami tkiva pred postopkom ter tako dobimo podatke o reverzibilnem in ireverzibilnem pragu elektropermeabilizacije (47).
5. PI (Propidijev jodid) je fluorescenčna molekula, ki lahko preide v notranjost celic le s povečano prepustnostjo membrane (48). Propidijev jodid se v celici veže na DNA. Šele na DNA vezan propidijev jodid fluorescira z rdečo barvo. Rezultate uspešnosti

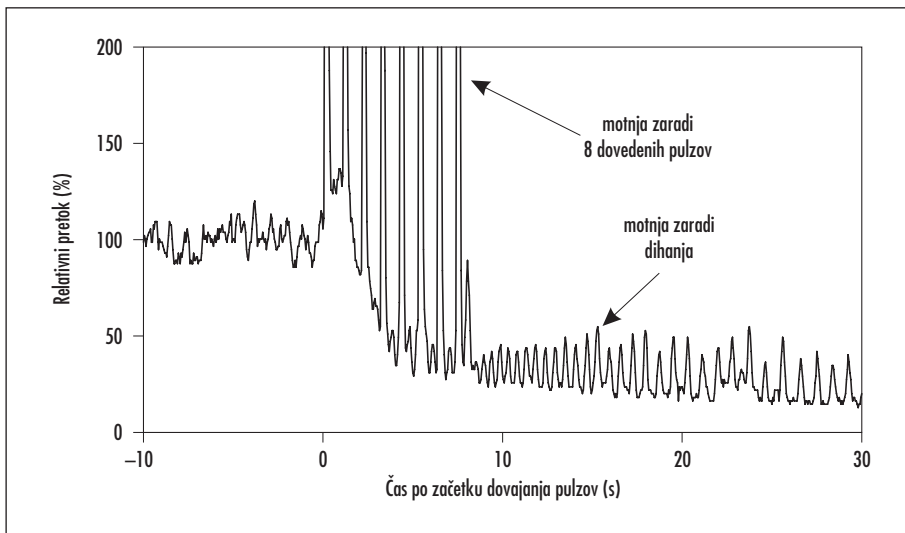
- elektroporacije pridobimo sorazmerno hitro, ker fluorescenco lahko opazujemo že v prvih 15 minutah po dovajanju elektroporacijskih pulzov. Zanimivost te metode je tudi v tem, da med eksperimentom ohranimo geometrijo tkiva, kar nam omogoča, da na podlagi fluorescence tkiva izsledimo tudi obliko porazdelitve električnega polja oziroma reverzibilno in ireverzibilno pragovno vrednost elektroporacije tkiv.
6. GFP (angl. *green fluorescent protein*) je protein, ki fluorescira zeleno, ko ga osvetlimo z modro svetlobo. V *in vivo* pogojih v tkivo vnesemo gen, ki kodira protein GFP. Tkivo dovedemo elektroporacijske pulze, ki omogočijo vstop plazmida v celice. Izražanje gena GFP nekaj dni kasneje nam omogoči opazovanje elektropermeabiliziranega tkiva in določitev pragov reverzibilne in ireverzibilne elektroporacije. Fluorescenco lahko opazujemo pod konfokalnim mikroskopom in tako dobimo kvalitativen podatek o mestu izražanja gena, z opazovanjem moči fluorescence pa dobimo semikvantitativen podatek o količini prisotnega proteina GFP (49–50).
 7. Luciferaza je encim, ki katalizira reakcijo luminiscence in ga lahko tako kot GFP uporabljamo za merjenje uspešnosti elektroporacije *in vivo* in določitev pragovnih vrednosti elektroporacije. Luminiscenco tkiva merimo z napravo luminometer nekaj dni po vnosu plazmida, ki kodira protein luciferazo, kateremu je sledila elektroporacija. Podatek je kvantitativen in nam po umeritvi z referenčno vrednostjo pove vsebnost proteina v tkivu (49).
 8. Impedančna spektrometrija. Običajno merimo impedanco tkiva v območju 10 Hz do 200 kHz tik pred (Z_{pred}) in takoj po (Z_{po}) elektroporaciji tkiva. Nato izračunamo razmerje impedance pred in po elektroporaciji Z_{pred}/Z_{po} , kar korelira z uspešnostjo elektroporacije (51). Uporabimo lahko dvoelektrodni ali štirielektrodni sistem. Pri dvoelektrodnem uporabimo iste elektrode za merjenje impedance in za dovajanje visokonapetostnih pulzov, pri štirielektrodnem sistemu pa en par elektrod uporabljamo za dovajanje pulzov, drugi par za merjenje napetosti, impedanco potem določimo iz meritev na obeh parih elektrod.

9. Merjenje karakteristike toka in napetosti (I/U metoda). Opazujemo potek toka v odvisnosti od napetosti na elektrodah. Permeabiliziranemu tkivu se namreč poveča prevodnost, skozenj steče večji tok, to pa se odraža v spremembi naklona poteka I/U odvisnosti. Na ta način lahko določamo predvsem reverzibilni prag elektroporacije, ireverzibilni je veliko manj izrazit. Rezultati so odvisni tudi od homogenosti porazdelitve električnega polja, torej od stopnje homogenosti tkiva in geometrije elektrod (52).

Pri vseh naštetih metodah določanja reverzibilnega in ireverzibilnega praga elektroporacije *in vivo* pa je treba upoštevati porazdelitev električnega polja v tkivu, ki je odvisna od uporabljenih elektrod – njihove geometrije in postavitve glede na tkivo – in električne prevodnosti različnih tkiv. Zavedati pa se moramo tudi, da je določitev praga reverzibilne permeabilizacije tkiva odvisna tudi od uporabljenega markerja ali ciljne molekule, pa tudi od drugih uporabljenih parametrov električnih pulzov poleg amplitude – to je od trajanja, števila dovedenih pulzov in njihove ponavljalne frekvence.

SEKUNDARNI UČINKI ELEKTROPORACIJE

Uporaba visokonapetostnih elektroporacijskih pulzov ima poleg primarnega učinka permeabilizacije celične membrane tumorskih celic tudi sekundarne učinke. Glavni mehanizem delovanja terapij, ki vključujejo elektroporacijo, temelji načasno močno povečani prepustnosti celične membrane za molekule, ki drugače membrano težko prehajajo ali pa je sploh ne. V primeru elektrokemoterapije tumorjev lahko na ta način močno povečamo vnos kemoterapevtika v notranost tumorskih celic in s tem lokalno izražen protitumorski učinek. Poleg tega neposrednega učinka pa imajo elektroporacijski pulzi velik vpliv tudi na lokalni pretok krvi, tako v normalnih tkivih, kot je mišica, kot tudi v tumorjih (3, 53). Hitre spremembe v pretoku krvi v tkivih na nivoju mikrocirkulacije lahko ovrednotimo z optično lasersko dopplersko metodo, pri kateri merimo spremembe v valovni dolžini laserske svetlobe, ko



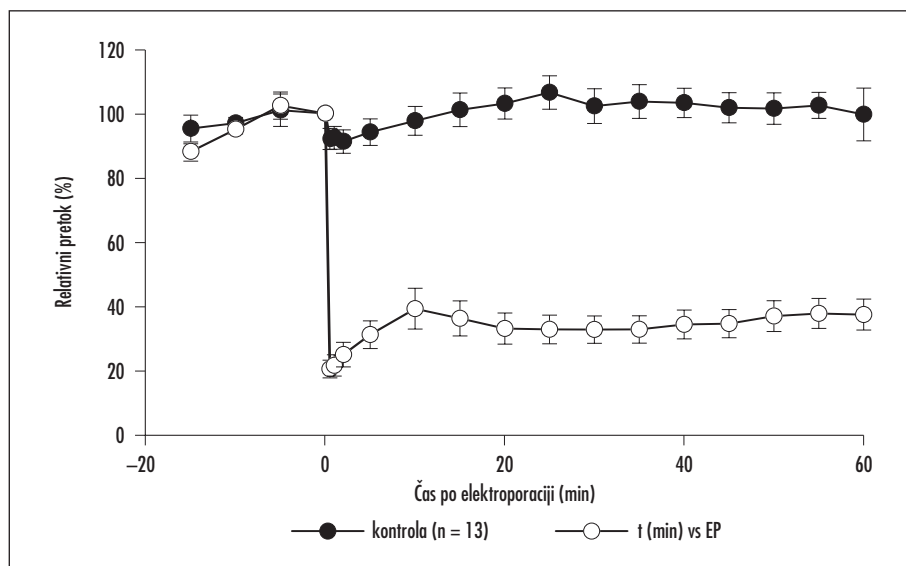
Slika 3. Primer spremembe v nivoju mikrocirkulacije zaradi uporabe elektroporacijskih pulzov. Osnovni nivo pretoka predstavlja spodnji rob krivulje, vidimo pa tudi motnja zaradi dihanja in mišičnih kontrakcij ob dovedenih pulzih. Izmerjeno z metodo laser Doppler v podkožnem tumorju Sa-1 pri miši seva A/J (60).

se ta sipa na premikajočih se krvnih celicah v kapilarah, arteriolah in venulah. Na sliki 3 lahko vidimo, kako se lokalna tumorska mikrocirkulacija skoraj popolnoma zaustavi že med dovajanjem elektroporacijskih pulzov. Ta takojšnji učinek na pretok krvi je posledica močnega krčenja gladkih mišičnih celic v stenah krvnih žil zaradi električnega toka in pa tudi večje prepustnosti žil zaradi porušitve struktur celičnega skeleta (54). Mikrocirkulacija se v tumorjih delno obnovi relativno hitro po aplikaciji pulzov, kljub temu pa je eno uro kasneje pretok krvi v tumorjih še vedno močno zmanjšan, kar je razvidno iz slike 4. Z metodama barvanja tkiva *in vivo* z barvilom patent modro ter merjenja vsebnosti radioaktivnega izotopa rubidija v tkivu smo ugotovili zmanjšano prekrvljenost tumorjev celo 48 ur po elektroporaciji (55–56). V času, ko je zmanjšan pretok krvi v tumorjih, je povečano zadrževanje kemoterapevtika, kar je dodatni pozitiven dejavnik, saj je z daljšim delovanjem učinkovitost kemoterapevtikov povečana. Poleg tega je potrebno poudariti, da zmanjšani mikrocirkulaciji sledi tudi zmanjšana oksigenacija tkiv, kar ima vpliv na delovanje kemoterapevtikov in na izražanje vnešenih genov (57).

Začetno zmanjšanje mikrocirkulacije in dogajanje v prvih minutah do nekaj ur po elektroporaciji lahko večinoma pripišemo učinku električnih pulzov na celice gladkih mišic in prepustnosti žilja. V kasnejšem obdobju po elektroporaciji pa je v primeru elektrokemoterapije zmanjšan pretok krvi posledica predvsem citotoksičnih učinkov kemoterapevtika na endotelne celice v stenah krvnih žil, ki so podobno kot tumorske celice izpostavljene elektroporacijskim učinkom. Na ta način prihaja do žilno ciljanega zdravljenja saj pri dolgotrajni zaustavitvi krvnega pretoka pride do odmiranja celic, ki jih oskrbujejo prizadete kapilare in s tem do posrednega delovanja na tumorske celice (56, 58). To hipotezo podpirajo tudi rezultati študije učinka elektrokemoterapije na endotelne celice v pogojih *in vitro* (59). Vedno več je torej dokazov, da moramo elektroporacijo obravnavati tudi s stališča njenega vpliva na lokalno žilje in na lokalni pretok krvi. S tem pa se odpirajo tudi nove možnosti za uporabo elektroporacije v zdravljenju.

STRANSKI UČINKI ELEKTROPORACIJE

Med elektrokemoterapijo in po njej se lahko pojavijo tudi nekateri neprijetni stranski



Slika 4. Vpliv elektroporacije na pretok krvi v podkožnih tumorjih *Sa-1* pri miših seva A/J. Prikazane so srednje vrednosti pretoka s standardno napako. Izmerjeno z metodo laser Doppler (60).

učinki. Zaradi visokih lokalnih vrednosti tokovne gostote med dovajanjem pulzov lahko na koži neposredno pod mestom stika z elektrodami nastanejo lokalne opekline, ki pa običajno v kratkem času (v nekaj urah do enega dneva) izginejo (61). Mogoč je tudi nastanek edema in bolj pogosto rdečice okrog mesta zdravljenja, vendar sta tudi ta pojava zgolj kratkotrajna. Za bolnike sta bolj neprijetni bolečina in nehoteno mišično krčenje, ki se pojavita med dovajanjem električnih pulzov. Vsak električni pulz ponavljalne frekvence 1 Hz namreč povzroči zelo kratko ostro bolečino in močno nehoteno mišično krčenje, kar je lahko za bolnika razmeroma neprijetno. Z uporabo višjih ponavljalnih frekvenc, npr. 5 kHz, se število bolečinskih zaznav in mišičnih krčenj zniža (62–63). Protitumorski učinek obeh ponavljalnih frekvenc električnih pulzov je primerljiv, kar potrjujejo eksperimentalni podatki in klinični rezultati (63–64).

ZAKLJUČEK

Elektroporacijo kot metodo vnosa lahko uporabljamo v različne biološke, biotehnoške in medicinske namene. Narejene so bile številne raziskave, s katerimi so poskušali določiti

vpliv različnih parametrov celic, tkiv in električnih pulzov na izid elektroporacije. Želje, da bi elektroporacijske metode prišle tudi v klinično prakso, dvigujejo pomembnost teh raziskav, saj so učinkovitost, varnost in pacientovo sprejemanje neke terapevtske metode na prvem mestu. Kot pomembno dopolnilo eksperimentalnemu delu lahko s pomočjo numeričnih modelov teoretično opišemo in razložimo rezultate poskusov *in vivo*, optimiziramo parametre pulzov, napovedujemo izid terapije in načrtujemo nove pristope k protokolom električnih pulzov in geometrijam elektrod. Uporaba elektroporacije za vnos genskega materiala v celice ter uporaba za vnos snovi v kožo sta še v predklinični fazi. Kombinacija kemoterapevtikov in elektroporacije – elektrokemoterapija – pa se že uspešno uporablja v kliničnem okolju za zdravljenje kožnih in podkožnih tumorjev.

ZAHVALA

Raziskave na področju elektroporacije in njene uporabe sta omogočili Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije in Evropska komisija.

LITERATURA

1. Maček Lebar A, Serša G, Čemažar M, et al. Elektroporacija. *Med Razgl* 1998; 37: 339–54.
2. Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 2003; 177: 437–47.
3. Serša G. The state-of-the-art of electrochemotherapy before the ESOPE study; advantages and clinical uses. *Eur J Cancer Suppl* 2006; 4: 52–9.
4. Zampaglione I, Arcuri M, Cappelletti M, et al. In vivo DNA gene electro-transfer: a systematic analysis of different electrical parameters. *J Gene Med* 2005; 7: 1475–81.
5. Čemažar M, Golzio M, Serša G, et al. Electrically-assisted nucleic acids delivery to tissues in vivo: Where do we stand? *Curr Pharm Design* 2006; 12: 3817–25.
6. Mir LM, Bureau MF, Rangara R, et al. Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse – mediated gene transfer into skeletal muscle. *Medical Sciences* 1998; 321: 893–9.
7. Davalos RV, Otten DM, Mir LM, et al. Electrical impedance tomography for imaging tissue electroporation. *IEEE Trans Biomed Eng* 2004; 51: 761–7.
8. Davalos R, Mir LM, Rubinsky B. Tissue ablation with reversible electroporation. *Ann Biomed Eng* 2005; 33 (2): 223–31.
9. Kotnik T, Maček Lebar A, Kandušer M, et al. Elektroporacija celične membrane: teorija ter poizkusi in vitro = Electroporation of the cell membrane: theory and experiments in vitro. *Med razgl* 2005; 44 (1): 81–90.
10. Šemrov D, Miklavčič D. Vsiljeni transmembranski potencial zaradi zunanega električnega polja v odvisnosti od oblike in orientacije ter gostote celic. *Elektrotehniški vestnik* 1995; 62 (1): 35–42.
11. Susil R, Šemrov D, Miklavčič D. Electric field induced transmembrane potential depends on cell density and organization. *Electro Magnetobiol* 1998; 17: 391–9.
12. Pavlin M, Pavšelj N, Miklavčič D. Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system. *IEEE Trans Biomed Eng* 2002; 49 (6): 605–12.
13. Miklavčič D, Čorović S, Pucihar G, et al. Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy. *Eur J Cancer Suppl* 2006; 4: 45–51.
14. Puc M, Čorović S, Flisar K, et al. Techniques of signal generation required for electroporation. *Survey of electroporation devices*. *Bioelectrochemistry* 2004; 64: 113–24.
15. Okino M, Mohri H. Effects of high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78: 1319–21.
16. Mir LM, Banoun H, Paoletti C. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: Direct access to the cytosol. *Exp Cell Res* 1988; 175: 15–25.
17. Mir LM, Orlowski S, Belehradek J, et al. Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 1991; 27 (1): 68–72.
18. Poddevin B, Orlowski S, Belehradek J, et al. Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 67–75.
19. Serša G, Čemažar M, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinium (II) in mice. *Cancer Res* 1995; 55: 3450–55.
20. Heller R, Jaroszeski MJ, Reintgen DS, et al. Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin. *Cancer* 1998; 83: 148–57.
21. Heller R, Gilbert R, Jaroszeski MJ. Clinical application of electrochemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 35: 119–29.
22. Serša G, Čemažar M, Rudolf Z. Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients. *Cancer Therapy* 2003; 1: 133–42.
23. Ferber D. Gene therapy: safer and virus-free? *Science* 2001; 294: 1638–42.
24. Parker AL, Newman C, Briggs S, et al. Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2003; 5: 1–15.
25. Mehier-Humbert S, Guy RS. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57 (5): 733–53.
26. Šatkauskas S, Bureau M, Puc M, et al. Mechanisms of in vitro DNA electrotransfer: Respective contributions of cell electroporation and DNA electrophoresis. *Mol Ther* 2002; 5 (2): 133–40.
27. Šatkauskas S, Andre F, Bureau MF, et al. Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of in vivo DNA electrotransfer. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 1194–201.
28. Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2001; 14: 101–14.
29. Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3 (2): 115–24.
30. Prausnitz MR. The effects of electric current applied to skin: A review for transdermal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1996; 18: 395–425.

31. Prausnitz MR. Reversible skin permeabilization for transdermal delivery of macromolecules. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1997; 14 (4): 455–83.
32. Denet A-R, Prétat V. Transdermal delivery of timolol by electroporation through human skin. *J Control Release* 2003; 88: 253–62.
33. Prausnitz MR. A practical assessment of transdermal drug delivery by skin electroporation. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 35: 61–76.
34. Lavee J, Onik G, Mikus P, et al. A Novel Nonthermal Energy Source for Surgical Epicardial Atrial Ablation: Irreversible Electroporation. *The Heart Surgery Forum* 2007; 10 (2): 96–101.
35. Onik G, Mikus P, Rubinsky B. Irreversible electroporation: Implications for prostate ablation. *Technology in Cancer Research and Treatment* 2007; 6 (4): 295–300.
36. Miklavčič D, Pavšelj N, Hart FX. Electric Properties of Tissues. In: *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*, John Wiley & Sons, New York, 2006.
37. Epstein BR, Foster KR. Anisotropy in the dielectric properties of skeletal muscle. *Med Biol Eng Comput* 1983; 21 (1): 51–5.
38. Gabriel C, Gabriel S, Corthout E. The dielectric properties of biological tissues: I. literature survey. *Phys Med Biol* 1996; 41: 2231–49.
39. Geddes LA, Baker LE. The specific resistance of biological material – a compendium of data for the biomedical engineer and physiologist. *Med Biol Eng* 1967; 5: 271–93.
40. Pavšelj N, Bregar Z, Cukjati D, et al. The course of tissue permeabilization studied on a mathematical model of a subcutaneous tumor in small animals. *IEEE Trans Biomed Eng* 2005; 52: 1373–81.
41. Šel D, Cukjati D, Batiuskaite D, et al. Sequential finite element model of tissue electroporation. *IEEE Trans Biomed Eng* 2005; 52: 816–27.
42. Gehl J, Sorensen TH, Nielsen K, et al. In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1428: 233–40.
43. Fear EC, Stuchly MA. Modeling assemblies of biological cells exposed to electric fields. *IEEE Trans Biomed Eng* 1998; 45 (10): 1259–71.
44. Miklavčič D, Šemrov D, Mekid H, et al. A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1523: 73–83.
45. Mir LM, Tounetki O, Orlowski S. Bleomycin: revival of an old drug. *General Pharmacol* 1996; 27: 745–48.
46. Pron G, Mahrouf N, Orlowski S, et al. Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism. *Biochem Pharmacol* 1999; 57 (1): 45–56.
47. Engstrom PE, Persson BR, Salford LG. Studies of in vivo electroporation by gamma camera measurements of (99m)Tc-DTPA. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473: 321–8.
48. Gabriel B, Teissié J. Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electroporation cell membrane. *Biophys J* 1997; 73: 2630–7.
49. Pavšelj N, Prétat V. DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse. *J Control Release* 2005; 106: 407–15.
50. Čemažar M, Wilson I, Dachs GU, et al. Direct visualization of electroporation-assisted in vivo gene delivery to tumors using intravital microscopy – spatial and time dependent distribution. *BMC Cancer* 2004; 4 (81): 1–7.
51. Ivorra A, Rubinsky B. In vivo electrical impedance measurements during and after electroporation of rat liver. *Bioelectrochemistry* 2007; 70 (2): 287–95.
52. Cukjati D, Batiuskaite D, André F, et al. Real time electroporation control for accurate and safe in vivo non-viral gene therapy. *Bioelectrochemistry* 2007; 70: 501–7.
53. Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. Vascular Reactions to in Vivo Electroporation: Characterization and Consequences for Drug and Gene Delivery. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1569: 51–8.
54. Kanthou C, Kranjc S, Serša G, et al. The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation based therapies. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 3145–52.
55. Serša G, Čemažar M, Parkins CS, et al. Tumor blood flow changes induced by application of electric pulses. *Eur J Cancer* 1999; 35: 672–7.
56. Serša G, Čemažar M, Miklavčič D, et al. Tumor blood flow modifying effect of electrochemotherapy with bleomycin. *Anticancer Res* 1999; 19: 4017–22.
57. Serša G, Čemažar M, Miklavčič D. Tumor blood flow modifying effects of electrochemotherapy: a potential vascular targeted mechanism. *Radiol Oncol* 2003; 37: 43–8.
58. Serša G, Kržič M, Šenjčur M, et al. Reduced blood flow and oxygenation in SA-1 tumours after electrochemotherapy with cisplatin. *Br J Cancer* 2002; 87: 1047–54.
59. Čemažar M, Parkins CS, Holder AL, et al. Electroporation of human microvascular endothelial cells: evidence for an anti-vascular mechanism of electrochemotherapy. *Br J Cancer* 2001; 84: 565–70.
60. Serša G, Jarm T, Kotnik T, et al. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *Br J Cancer* 2008; 98: 388–98.

61. Mir LM, Glass LF, Serša G, et al. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1998; 77: 2336-42.
62. Miklavčič D, Pucihar G, Pavlovec M, et al. The effect of high frequency electric pulses on muscle contractions and antitumor efficiency in vivo for a potential use in clinical electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry* 2005; 65: 121-8.
63. Županič A, Ribarič S, Miklavčič D. Increasing the Repetition Frequency of Electric Pulse Delivery Reduces Unpleasant Sensations that Occur in Electrochemotherapy. *Neoplasma* 2007; 54: 246-50.
64. Marty M, Serša G, Garbay JR, et al. Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Eur J Cancer Suppl* 2006; 4: 3-13.

Prispelo 10. 1. 2008