



Elektropermeom: celični odgovor na elektroporacijo

The electropermeome: cellular response to electroporation

Angelika Vižintin, Damijan Miklavčič

Izvleček

Povečano prepustnost celične membrane zaradi izpostavitve celic oz. tkiv električnemu polju imenujemo elektroporacija. Povzroči vrsto sprememb v celici, od strukturnih in kemijskih sprememb v celični membrani, strukturnih sprememb proteinov oz. proteinskih kompleksov, prenosa snovi v celice in iz njih do aktiviranja signalnih poti in popravljalnih mehanizmov; ob določenih pogojih sproži tudi celično smrt. S pojmom elektropermeom označujemo tako permeabilizirano celico med ali tik po dovajanju električnih pulzov kot tudi vse poznejše procese, ki ostanejo aktivni še nekaj časa potem, ko ni več mogoče opaziti povečanega transmembranskega transporta snovi, za katere je celična ovojnica običajno neprepustna, torej tudi po času, ko že ugotavljamo, da je zaceljena. Elektroporacija se uporablja na številnih področjih, vključno z ablacijo tkiv, gensko elektrotransfekcijo za vnos plazmidov v celice ter elektrokemoterapijo. Aplikacije elektroporacije v medicini so učinkovite in varne, vendar so zaradi delovanja električnih pulzov lahko prisotni tudi določeni neželeni stranski učinki, predvsem mišično krčenje in akutna bolečina. Za optimiziranje parametrov elektroporacije in s tem rezultatov na elektroporaciji temelječih terapij je ključnega pomena nadaljnja razjasnitev osnovnih mehanizmov elektroporacije in vplivov posameznih parametrov električnega polja na elektropermeom. Namen prispevka je predstaviti celovit pregled mehanizmov elektroporacije ter elektropermeoma, tj. celičnega odgovora na elektroporacijo.

Abstract

The increased permeability of a cell membrane due to exposure of cells/tissues to an electric field is called electroporation. Electroporation induces a range of changes in the cell - from structural and chemical changes in the cell membrane, structural changes in proteins or protein complexes, transport of substances in and out of the cell, activation of signalling pathways, and repair mechanisms; it also triggers cell death under certain conditions. The term electropermeome is used to describe both the permeabilised cell during or immediately after the delivery of electrical pulses and all subsequent processes that remain active for some time after the increased transmembrane transport of substances for which the cell membrane is normally impermeable has ceased, i.e. even after the membrane has resealed. Electroporation is used in many areas, including tissue ablation, gene electrotransfer for plasmid delivery into cells and electrochemotherapy. Medical applications of electroporation are effective and safe, but the action of the electrical pulses can cause certain adverse side effects, notably muscle contractions and acute pain. Further elucidation of the underlying mechanisms of electroporation

Laboratorij za biokibernetiko, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Korespondenca / Correspondence: Damijan Miklavčič, e: Damijan.Miklavcic@fe.uni-lj.si

Ključne besede: elektropermeabilizacija; električni pulzi; transmembranski transport; peroksidacija lipidov; celična smrt

Key words: electropermeabilization; electrical pulses; transmembrane transport; lipid peroxidation; cell death

Prispelo / Received: 10. 5. 2021 | **Sprejeto / Accepted:** 5. 4. 2022

Citirajte kot/Cite as: Vižintin A, Miklavčič D. Elektropermeom: celični odgovor na elektroporacijo. Zdrav Vestn. 2022;91(Epub ahead of print):1–13. DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3267>



Avtorske pravice (c) 2022 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

and the effects of individual electric field parameters on the electroporability is crucial to optimise the parameters of electroporation and consequently the results of electroporation-based therapies. The aim of the present paper is to provide a comprehensive overview of the mechanisms of electroporation and the electroporability, i.e. the cellular response to electroporation.

1 Uvod

Celice preko sistema ionskih kanalčkov in črpalk vzdržujejo razliko v električnem potencialu med notranjo in zunanjo stranjo celične membrane, kar imenujemo mirovna transmembranska napetost. Pri evkariontskih celicah se ta navadno giblje med -40 in -70 mV. Ob izpostavitvi celice električnemu polju pa se transmembranski napetosti prišteje še vsiljena transmembranska napetost, ki je prisotna v času izpostavitve celice električnemu polju. Izpostavitve celic električnemu polju dovolj visoke jakosti lahko vsili znatno višjo transmembransko napetost od mirovne. Tako visoka transmembranska napetost in zaradi nje visoko električno polje v membrani vodi do vrste sprememb, vključno s strukturnimi spremembami v membrani in z modifikacijami molekul, ki sestavljajo membrano. Zato lahko preko membrane prehajajo molekule, za katere je membrana običajno neprepustna. Povečano prepustnost celične membrane, tj. permeabilizacijo membrane, zaradi izpostavitve celic/tkiv električnemu polju imenujemo elektroporacija oz. tudi elektroporabilizacija (1). Električno polje pri elektroporaciji vzpostavimo z dovajanjem električnih pulzov preko elektrod, ki so v stiku z vzorcem oz. tkivom.

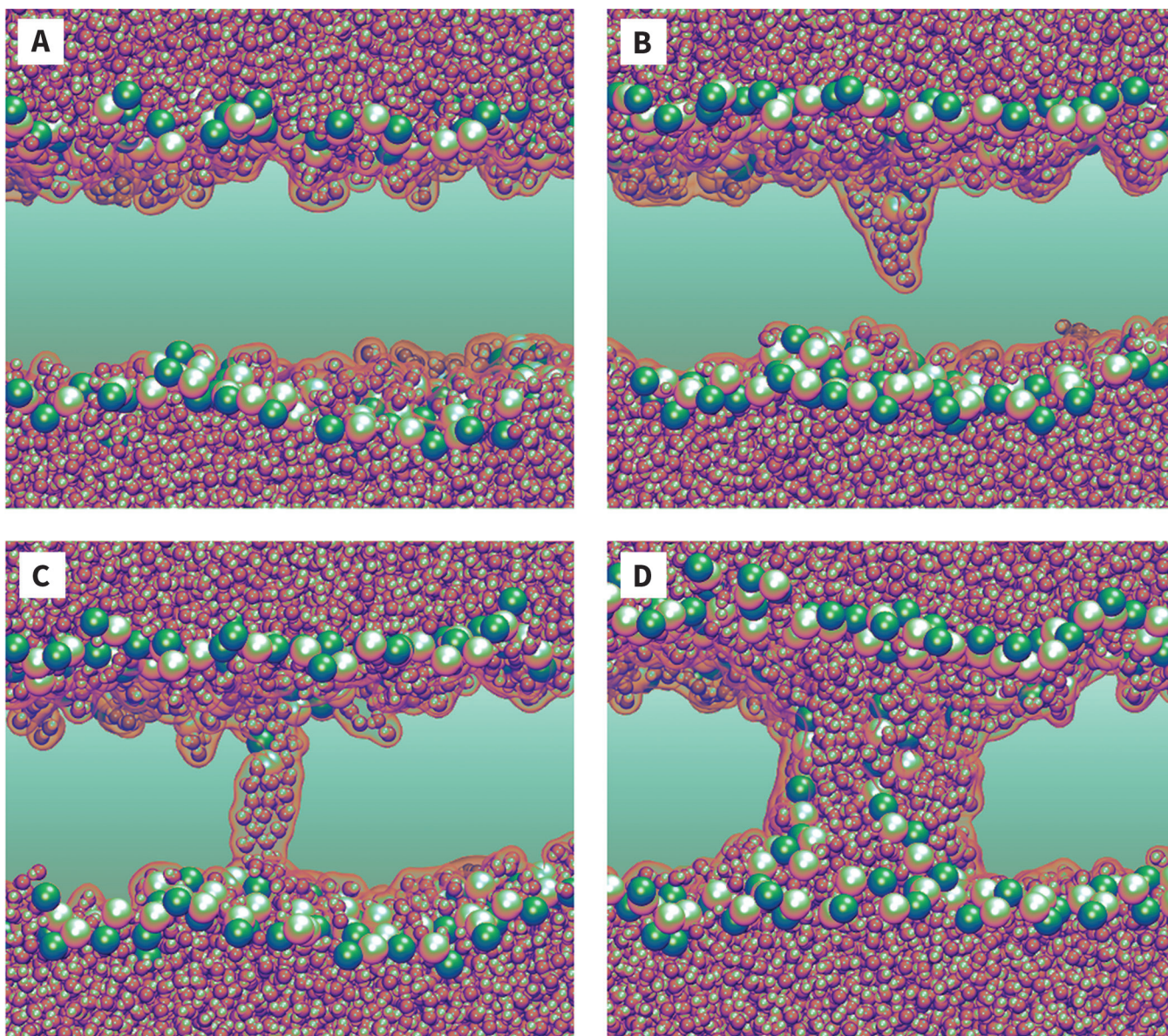
Elektroporacija se uporablja na številnih področjih, vključno z ablacijo tkiv, gensko elektrotransfekcijo za vnos plazmidov v celice ter elektrokemoterapijo, ki je lokalni postopek za zdravljenje raka s kombinacijo standardnega kemoterapevtika in kratkih električnih pulzov (2). Medicinsko apliciranje elektroporacij je učinkovito in varno. Pri elektrokemoterapiji in ablaciji z elektroporacijo celična smrt v glavnem ni posledica termičnih poškodb, ampak povečane prepustnosti celične membrane. Zato se zdravo okoliško tkivo zaradi terapije ne poškoduje (3,4). Vendar zaradi delovanja električnih pulzov lahko nastanejo tudi nekateri neželeni stranski učinki, predvsem mišično krčenje, ki lahko povzroča neprijetne občutke in celo bolečino; v nekaterih primerih pa je potrebno dovajanje pulzov uskladiti z elektrokardiogrami, da preprečimo motnje srčnega ritma (npr. sprožitev trepetanja srčnih prekatov). Za izboljšanje rezultatov pri aplikacijah, temelječih na elektroporaciji, je ključno razjasniti vpliv posameznih parametrov – od parametrov električnih pulzov (npr.

napetost, trajanje in število pulzov) do geometrije in položaja elektrod – na uspešnost terapije (2). Tradicionalno se v elektroporacijskih postopkih uporabljajo monofazni pulzi s trajanjem v velikostnem redu mikro- in milisekund, vendar se v zadnjih letih preučuje možnost uporabiti nanosekundne pulze in visokofrekvenčne bifazne pulze v trajanju le nekaj mikrosekund, ker je z njimi možno preseči določene omejitve, ki se pojavljajo pri običajni elektroporaciji z monofaznimi mili- in mikrosekundnimi pulzi. Nanosekundni pulzi zmanjšajo mišično krčenje (5) in manj segrevajo tkivo zaradi manjše dovedene energije (6). To zmanjšuje verjetnost za toplotne poškodbe, medtem ko uporaba bifaznih pulzov zmanjša mišično krčenje (7,8) in verjetnost za pojav motenj srčnega ritma (7,9).

Celovito optimizacijo parametrov električnih pulzov za posamezne aplikacije omejuje nepopolno razumevanje osnovnih mehanizmov elektroporacije. Namen prispevka je celovit pregled mehanizmov povečanja prepustnosti celične membrane zaradi delovanja električnih pulzov ter vseh nadaljnjih sprememb in procesov, ki jih sproži elektroporacija – od kemičnih sprememb membranskih lipidov in modulacije funkcije proteinov do sprememb v izražanju genov in sinteze proteinov ter aktivacije celične smrti in imunskega odziva.

2 Mehanizmi povečanja prepustnosti membrane

Eksperimentalni rezultati kažejo, da se povečanje prepustnosti membrane lahko zgodi v manj kot 10 ns, kar nakazuje na neposredno preureditev membranskih komponent (10). Trenutno uveljavljena razlaga elektroporacije temelji na nastanku vodnih por v lipidnem dvosloju. Simulacije molekularne dinamike nakazujejo, da se (ob dovolj visoki vzpostavljeni napetosti na dvosloju oz. dovolj visokem električnem polju) nastajanje pore prične z usmeritvijo vodnih molekul v smeri električnega polja in njihovo prodiranje v lipidni dvosloj z obeh (intra- in ekstracelularne) strani lipidnega dvosloja (Slika 1A). Molekule vode, usmerjene v smeri električnega polja, se z vodikovimi vezmi povežejo



Slika 1: Nastanek pore v lipidnem (fosfatidilholinskem) dvosloju.

(A) orientacija vodnih molekul v smeri električnega polja in penetracija v lipidni dvosloj, (B) pojav vodnih prstov, z vodikovimi vezmi povezanih gručk molekul vode, ki prodirajo v sredico lipidnega dvosloja, (C) združitev vodnih prstov v vodni kanal, imenovan hidrofobna pora, ki povezuje intra- in ekstracelularno stran lipidnega dvosloja, (D) reorientacija fosfolipidov tako, da svoje polarne glave obrnejo proti vodnemu kanalu, ki se na tej stopnji imenuje hidrofilna pora. Polarne glave fosfatidilholina so prikazane kot zeleni in beli krogi, lipidni repi pa zaradi jasnosti niso prikazani.

v majhne gruče. Te gruče, imenovane vodni prsti, se povečujejo in vse bolj prodirajo v hidrofobno sredico lipidnega dvosloja (Slika 1B), dokler se ne združijo tako, da povežejo obe strani (intra- in ekstracelularno) in tvorijo vodni kanal (Slika 1C). Tako strukturo imenujemo hidrofobna pora. Fosfolipidi se ob prisotnosti vodnih kanalov preusmerijo tako, da obrnejo svoje polarne glave proti nastalemu vodnemu kanalu, da »zaščitijo« nepolarne repe pred vodnimi molekulami. Preusmeritev fosfolipidov stabilizira poro, ki jo na tej

stopnji imenujemo hidrofilna pora (Slika 1D). Stabilizacija pore omogoči, da v vodni kanal vstopi še več molekul vode in drugih polarnih molekul (1).

Ko električno polje ni več prisotno, se pore pričnejo zapirati. Zapiranje por poteka v obratnem vrstnem redu od analognih stopenj nastanka por. Medtem ko se čas, potreben za nastanek por, eksponentno krajša z večanjem jakosti električnega polja (11), je čas, potreben za zapiranje por, praktično neodvisen od jakosti električnega polja, ki je sprožilo njihov nastanek;

zapiranje por v lipidnih dvoslojih v simulacijah molekularne dinamike vedno traja od nekaj deset do nekaj sto nanosekund, kar nakazuje, da pore niso stabilne. V simulacijah ocenjeni čas, potreben za zaprtje por, pa je za več velikostnih redov krajši od eksperimentalno določenega časa, ki je potreben za zaceljenje membran (tj. čas, v katerem je opazen povečan transmembranski transport) (1). Povečano prepustnost celične membrane opazimo namreč še nekaj minut za tem, ko električno polje ni več prisotno, in to tudi pri uporabi pulzov s trajanjem le nekaj nanosekund. Je pa trajanje povečane prepustnosti celične membrane odvisno od temperature (12-15), kar nakazuje, da je elektroporacija celičnih membran kompleksnejši proces od zgolj nastanka kratkoživih por v lipidnem dvosloju. Več raziskav kaže na pomen kemičnih sprememb membranskih lipidov in modulacije funkcije proteinov pri povečanju prepustnosti membrane pri elektroporaciji (1).

Elektroporacija povzroči vrsto sprememb v celični membrani (nastanek lipidnih in proteinskih por, oksidacijo membranskih lipidov), depolarizacijo, nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti – RKZ (*angl.* ROS), iztekanje ATP in K^+ iz celice, vdor Ca^{2+} v citoplazmo, vstop molekul iz celične zunanosti v celico, osmotsko neravnovesje, reorganiziranje proteinov ali strukturne spremembe proteinov, vključno z odprtjem ionskih kanalov, porušitev citoskeleta, aktivacijo raznih signalnih poti, spremembe v izražanju genov in sintezi proteinov ter tudi aktivacijo več celičnih popravljenih mehanizmov (Slika 2). Spremembe v permeabilizirani celični membrani, kot tudi vse poznejše procese, ki so aktivni tudi, ko ni več opaziti povečanega transmembranskega transporta snovi, za katere je celična membrana običajno neprepustna, označujemo s pojmom elektropermeom (16).

2.1 Kemične spremembe membranskih lipidov

Elektroporacijski pulzi sprožijo nastanek ekstra- in intracelularnih RKZ (17-22). Oksidacija lipidov zaradi izpostavitve električnim pulzom, kot se uporabljajo pri elektroporaciji, spremeni sestavo in lastnosti tako lipidnih dvoslojev kot celičnih membran. Kemijske spremembe membranskih lipidov, zlasti peroksidacija, bi lahko pojasnile dlje trajajočo povečano prepustnost celičnih membran po elektroporaciji. Lipidna peroksidacija je oksidativna degradacija lipidov. Vključuje nastanek in razpad dikisikovih aduktov nenasičenih lipidov, imenovanih lipidni hidroperoksidi (Slika 3). Reakcijo sproži močan oksidant (npr. hidroksilni radikal), ki lipidu odvzame šibko vezani alilni vodik. Nadaljnja

razgradnja hidroperoksidov, primarnih produktov lipidne peroksidacije, je kompleksen proces, v katerem nastane veliko sekundarnih produktov, npr. aldehidi, ketoni, alkoholi, ogljikovodiki, estri, furani, laktoni, peroksidi. Hidroperoksidi in nekateri njihovi razpadni produkti, npr. mutageni malondialdehid (MDA), reagirajo z aminokislinami, DNA in membranami (23).

Pokazali so, da se koncentracija RKZ in obseg peroksidacije lipidov povečujeta z intenzivnostjo električnega polja, trajanjem pulza in številom pulzov pri bakterijskih, rastlinskih in živalskih celicah kot tudi pri liposomih, peroksidacija lipidov pa je povezana s povečano prepustnostjo celične membrane, časom, potrebnim za zaceljenje membrane, in celičnimi poškodbami (17-20,22,24).

2.1.1 Peroksidacija membranskih fosfolipidov

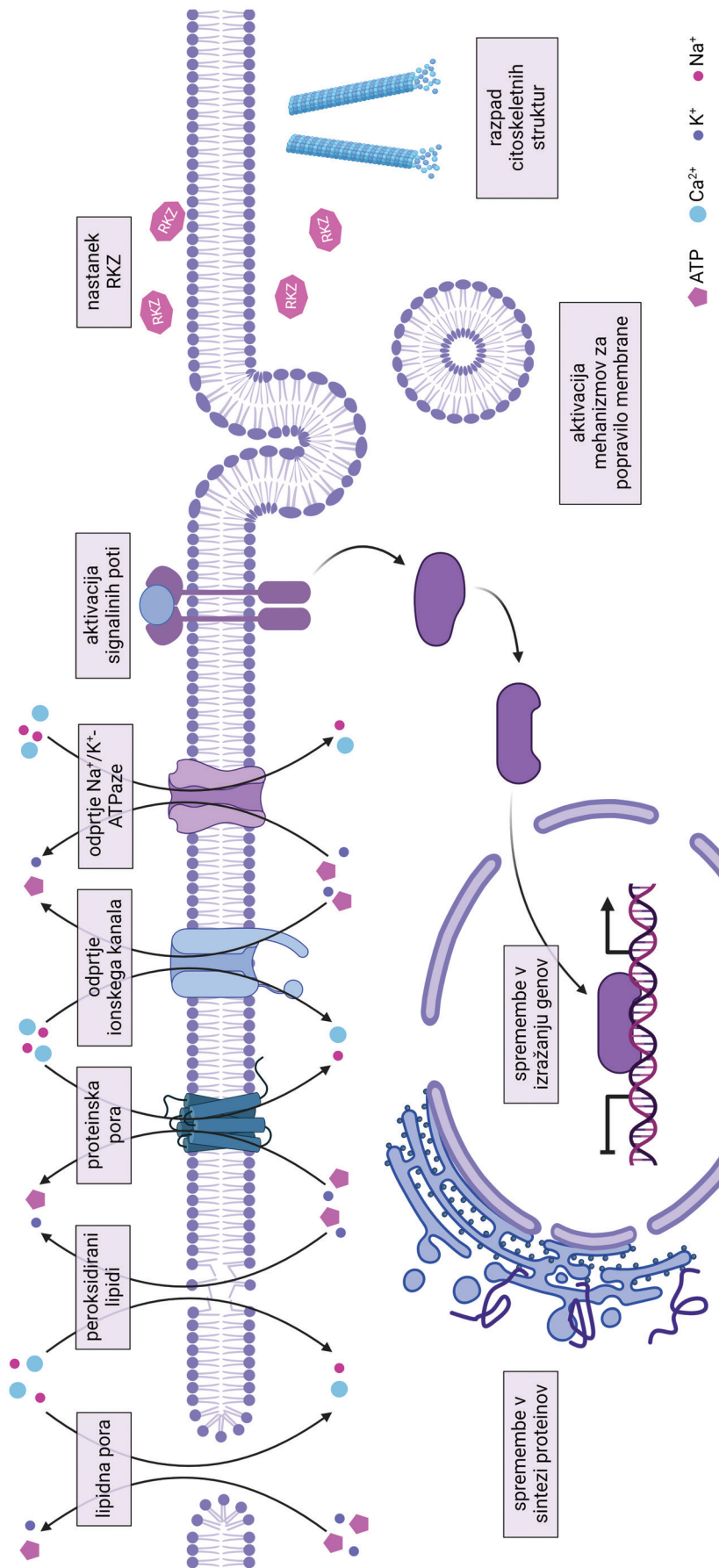
Celične membrane so v osnovi sestavljene iz dvosloja fosfolipidov in sterolov, v katerega so umeščeni proteini in druge molekule. Prisotnost oksidiranih lipidov v lipidnih membranah zmanjša urejenost lipidov, vodi do lateralne širitve in stanjšanja dvosloja, zniža temperaturo faznega prehoda, spremeni hidracijo dvosloja, poveča gibljivost lipidov in pogostost t. i. »flip-flop« preskokov, vpliva na lateralno fazno organiziranost in spodbuja nastanek defektov v membrani. Zato so dvosloji z oksidiranimi lipidi bistveno bolj prepustni in prevodni od neoksidiranih dvoslojev (25-29). Eksperimentalno so pokazali prisotnost konjugiranih dienov v membranah elektroporiranih celic oziroma veziklov, kar nakazuje na prisotnost hidroperoksidov, primarnih produktov lipidne peroksidacije (17,22,24), kot tudi MDA, kar nakazuje na prisotnost sekundarnih produktov peroksidacije (24).

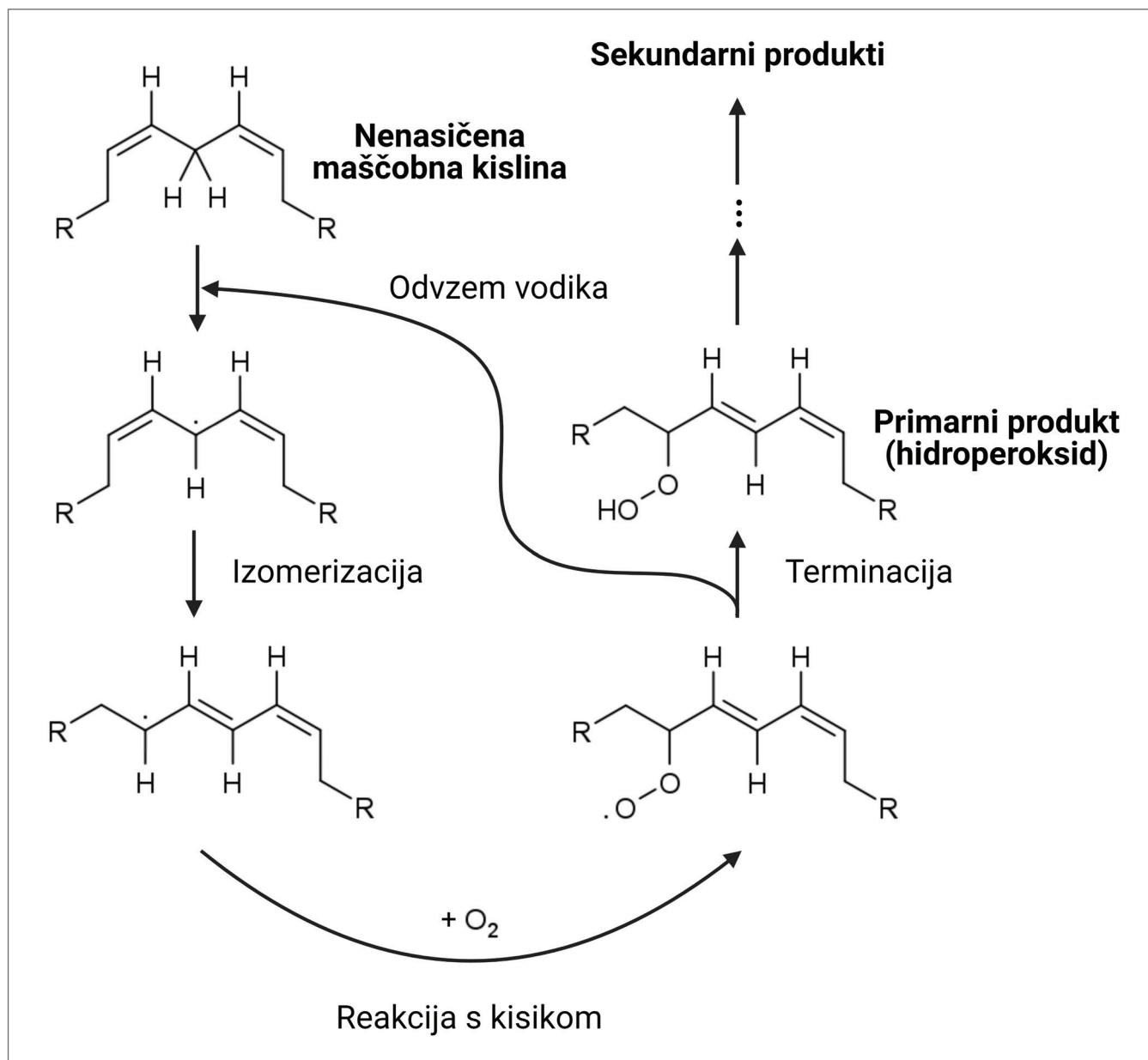
Hidroperoksidi so dovolj stabilni, da so v lipidnem dvosloju prisotni še nekaj časa po oksidaciji. Remi in sod. (26) so s simulacijami molekularne dinamike kvantificirali prepustnost in prevodnost lipidnega dvosloja z različnim deležem hidroperoksidov, tj. primarnih produktov peroksidacije lipidov. Pokazali so, da že majhen delež (okoli 1 %) hidroperoksidov učinkuje na prevodnost dvosloja. Vendar so ugotovili tudi, da je povečanje prevodnosti in prepustnosti lipidnega dvosloja za ione zaradi prisotnosti zgolj hidroperoksidov premajhno, da bi v celoti pojasnilo eksperimentalno določene vrednosti. V lipidnih dvoslojih s hidroperoksidi spontanega nastanka por niso opazili (26,30,31).

Fosfolipidi z aldehydnimi skupinami na acilnih repih (sekundarni produkti peroksidacije fosfolipidov) bolj porušijo lipidni dvosloj od hidroperoksidov. V

Slika 2: Shema elektropremeoma – sprememb in procesov, ki se dogajajo v celici med in po elektroporaciji.

Elektroporacija med drugim povzroči nastanek lipidnih in proteinskih por, peroksidacijo membranskih lipidov, odprtje ionskih kanalov in Na^+/K^+ -ATPaze, vdor Ca^{2+} v citoplazmo, iztekanje ATP in K^+ iz celične notranjosti in posledično osmotsko neravnovesje, nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (RKZ), porušitev citoskeleta, aktivacijo signalnih poti in popravilnih mehanizmov, ter spremembe v izražanju genov in v sintezi proteinov.





Slika 3: Shema reakcij lipidne peroksidacije.

Reakcijo sproži močan oksidant, ki nenasičeni maščobni kislini odvzame šibko vezani alilni vodik - tako nastane alilni radikal maščobne kisline. Adicija molekularnega kisika na alilni radikal vodi do nastanka konjugiranega peroksilnega radikala. Slednji odvzame alilni vodik drugi nenasičeni maščobni kislini, kar vodi do nastanka hidroperoksida, primarnega produkta lipidne peroksidacije, in novega alilnega radikala. Ob zadostni količini molekularnega kisika in neoksidiranih nenasičenih lipidov, se ta korak lahko mnogokrat ponovi, vendar istočasno tudi tekmuje z več terminacijskimi reakcijami. Terminacija vključuje reakcijo med dvema alilnima radikaloma, med dvema peroksilnima radikaloma, med alilnim in peroksilnim radikalom ali reakcijo alilnega/peroksilnega radikala z nelipidnim substratom (npr. fenolnimi antioksidanti, askorbatom, glutationom ali aminokislinskimi ostanki). Nadaljnja razgradnja hidroperoksidov, primarnih produktov lipidne peroksidacije, je zelo kompleksen proces, v katerem nastane veliko sekundarnih produktov, od katerih imajo nekateri pomembne biološke učinke.

eksperimentih (27,32) in simulacijah molekularne dinamike (28,30-33) so opazili znatno povečanje prepustnosti membrane z določenim deležem fosfolipidov z aldehydnimi skupinami, pa tudi spontano organizacijo aldehydov v pore (27,30-34). Pore, ki nastanejo

kot posledica prisotnosti produktov lipidne peroksidacije, niso enake poram, ki nastanejo v neoksidiranem lipidnem dvosloju pod vplivom električnega polja. V simulacijah molekularne dinamike so bile pore iz produktov lipidne peroksidacije z aldehydnimi skupinami

odprte nekaj mikrosekund, ob prisotnosti holesterola pa ves čas trajanja simulacije (tj. 5 μ s) (33).

2.1.2 Oksidacija membranskih sterolov

Steroli vplivajo na konformacijski red acilnih lipidnih verig, debelino hidrofobnega dela membrane, lateralno organizacijo in prepustnost membrane. Holesterol močno zmanjša prepustnost membrane za vodo, kisik, ione in ostale majhne molekule. V večini bioloških membran prevladuje en sam sterol. Pri sesalskih celicah je to holesterol (35).

Oksidacija membranskega holesterola spremeni strukturo membrane. Holesterol se lahko oksidira encimsko ali neencimsko zaradi neposrednega napada RKZ. Oksidirane derivate holesterola z eno ali več dodatnimi kisikovimi funkcionalnimi skupinami imenujemo oksisteroli. Oksisterole lahko razdelimo v dve skupini: na tiste, pri katerih je oksidiran kratki nepolarni rep, in tiste, pri katerih je oksidiran tetraciklinski obroč. Oksisteroli z oksidiranim repom podobno učinkujejo na membrane kot holesterol, vendar povzročijo manjšo urejenost repov fosfolipidov in ne kondenzirajo lipidnega dvosloja toliko kot jih holesterol. Hitre preusmeritve oksisterolov z oksidiranimi repi povečajo prepustnost membrane (npr. za 25-hidroksiholesterol je znano, da poveča prepustnost membrane za kalcijeve ione in glukozo). Oksisteroli z oksidiranim tetraciklinskim obročem, ki lahko zavzamejo drugačno konformacijo, pa bolj porušijo strukturo membrane kot oksisteroli z oksidiranimi repi, saj povečajo mobilnost fosfolipidnih repov (35).

Na voljo je le malo poročil raziskav, v katerih so proučevali oksidacijo sterolov pri elektroporaciji. Kazmierska in sod. (36) so opazili sorazmerno nizko povečanje koncentracije oksisterolov (tako tistih z oksidiranim repom kot tistih z oksidiranim tetraciklinskim obročem) v rumenjakih, ki so bili izpostavljeni električnim pulzom. S povečanjem števila električnih pulzov pa so izmerili višjo koncentracijo oksisterolov.

2.2 Modulacija funkcije proteinov

V literaturi lahko zasledimo tudi dokaze o vplivu elektroporacije na proteine in njihovi vlogi pri povečanju prepustnosti membran. Tako eksperimenti na lipidnih dvoslojih kot simulacije molekularne dinamike so nakazale, da prisotnost proteinskega kanalčka v lipidnem dvosloju stabilizira membrano, zaradi česar je potrebna višja jakost električnega polja, da pride do elektroporacije. V simulacijah niso opazili

nastanka večjih por v bližini kanalčka (37,38). Vendar pa so Azan in sod. (39,40) s konfokalno Ramanovo mikrospektroskopijo dokazali modifikacije proteinov v živih celicah, ki so bile izpostavljene elektroporacijskim pulzom. Žal uporabljena metoda ne omogoča razločevati modifikacije membranskih od citoplazemskih proteinov.

2.2.1 Membranski proteini

Submikrosekundni pulzi povzročijo odprtje napetostno odvisnih kalcijevih kanalov preko mehanizma, ki ne vključuje nastanka por v lipidnem dvosloju, segrevanja ali depolarizacije membrane preko napetostno odvisnih natrijevih kanalov (41-43). Mikrosekundni elektroporacijski pulzi pa povzročijo odprtje Na^+/K^+ -ATPaze (44). Zaradi elektroporacije se tudi izgublja kadherin v celičnih stikih (45,46). Kadherini so transmembranski proteini, ki igrajo pomembno vlogo pri tvorbi adherentnih stikov, vrsti medceličnih stikov v epitelnih in endotelih tkivih.

Rems in sod. (47,48) so z uporabo električnih polj, ki povzročijo elektroporacijo, v simulacijah molekularne dinamike opazili nastanek por v domenah za zaznavanje napetosti različnih napetostno odvisnih kanalov. V simulacijah je nastanku pore sledilo odvitje domene za zaznavanje napetosti ter stabilizacija por z glavami membranskih lipidov. Take pore so ostale stabilne tudi do konca simulacije (1 mikrosekundo za tem, ko električno polje ni bilo več prisotno), kar je bistveno dlje od por v lipidnem dvosloju. Rems in sod. (47) sklepajo, da se pri večji porušitvi zgradbe proteinskega kanalčka ta ne more spontano zviti nazaj v nativno konformacijo, temveč celica popravi poškodbo preko mehanizma endocitotskega recikliranja.

2.2.2 Citoskelet

Proteini citoskeleta (aktinski filamenti, intermediarni filamenti in mikrotubuli) in z njimi povezani proteini vplivajo na prepustnost membrane – na nastanek in širjenje por v membrani ter zaceljenje membrane po elektroporaciji. Porušitev omrežja aktinskih filamentov zniža energijsko pregrado za nastanek por v membrani (15). Pri elektroporaciji celic ali orjaških unilamelarnih veziklov z enkapsuliranim aktinom niso opazili velikih por mikrometerskega premera, ki so bile opažene pri elektroporaciji praznih veziklov (49). Pri celicah in veziklih z enkapsuliranim aktinom pa so opazili dlje trajajočo povečano prepustnost lipidnega dvosloja kot pri celicah, ki so bile inkubirane

s toksinom, ki destabilizira aktinske filamente, ali pri praznih veziklih (15,50).

Elektroporacija povzroči popravljivo porušitev tri-dimenzionalnih filamentoznih struktur aktinskih, tubulinskih in intermediarnih filamentov, ne pa tudi razgradnje monomernih proteinov citoskeleta. Citoskelet se ponovno sestavi v nekaj urah po elektroporaciji (45,46,51,52). Ni pa še povsem jasno, ali je porušitev citoskeleta neposredna posledica delovanja električnih pulzov oz. polja na proteine citoskeleta ali pa je posledica odtekanja ATP iz celic, povišane koncentracije kalcijevih ionov v citoplazmi, hidrolize fosfatidilinozitol-4-5-bisfosfata (PIP2) in/ali nabreknjenja celic zaradi elektroporacije (49).

Pakhomov in sod. (53) so namreč pokazali, da je porušitev aktinskih filamentov po elektroporaciji z nanosekundnimi pulzi posledica nabreknjenja celic. Nasprotno pa so raziskave, v katerih so uporabili pulze z drugačnimi parametri, nakazale, da se lahko porušijo aktinski filamenti tudi brez nabreknjenja celic oz. veziklov, kar nakazuje na neposredne učinke električnih pulzov oz. polja na aktin (45,50). Z uporabo mikroskopije na atomsko silo so Louise in sod. (54) pokazali, da je nabreknjenje predvsem posledica destabilizacije interakcije med kortikalnim aktinom in membrano zaradi elektroporacijskih pulzov, ne pa zaradi depolimerizacije aktinskih filamentov. S tem so potrdili izsledke o ločitvi membrane od citoskeleta pod vplivom električnih pulzov oz. polja (55).

Marracino in sod. (56) so s simulacijami molekularne dinamike pokazali, da visokonapetostni nanosekundni električni pulzi povzročijo spremembe v konformaciji C-terminalnega konca β -tubulina in spremembe v lokalnih elektrostatskih lastnostih GTP-azne domene ter vezavnega mesta za večino molekul, ki se vežejo na β -tubulin. Njihovi izsledki nakazujejo, da nanosekundni električni pulzi lahko fizično vplivajo na dinamiko mikrotubulov. Chafai in sod. (57) so tudi eksperimentalno pokazali, da nanosekundni električni pulzi spremenijo konformacijo C-terminalnega dela tubulina, ki zato polimerizira v različne strukture; od parametrov električnih pulzov pa je odvisno, ali je modulacija samoorganizacije tubulina reverzibilna ali ireverzibilna. Tudi modulacija s tubulinom povezanih proteinov (npr. kinezina) bi lahko spremenila dinamično omrežja mikrotubulov. S simulacijami molekularne dinamike so Průša in sod. (58) pokazali, da 30 ns trajajoči električni pulz spremeni kontaktno površino med kinezinom in tubulinom ter vezavna mesta za tubulin in mesta za hidrolizo nukleotidov na kinezinu.

3 Spremembe v izražanju genov in sintezi proteinov po elektroporaciji

Elektroporacija sproži vrsto fizioloških dogovorov celic, kar se kaže tudi v spremembah izražanja genov in sinteze proteinov. Ker elektroporacijski pulzi povzročijo nastanek RKZ, se pričakuje, da se celice odzovejo na oksidativni stres. Pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* je izpostavitve električnim pulzom povečala izražanje genov za proteine, ki sodelujejo pri odgovoru na oksidativni stres (GLR1, SOD1, SOD2 in GSH1) (59). Michel in sod. (60) pa so opazili povečano imunocitokemijsko obarvanje s protitelesi proti superoksidni dismutazi SOD-2 po elektroporaciji, inkubaciji s cisplatinom ter kombinaciji elektroporacije in cisplatin (elektrokemoterapiji) pri metastaznih celicah raka trebušne slinavke. Povečanje izražanja gena za SOD-2 po elektroporaciji so izmerili tudi Dovgan in sod. (61) pri mezenhimskih stromalnih celicah iz popkovnične krvi in stromalnih celicah iz maščobnega tkiva.

Morotomi-Yano in sod. (62) so s spremljanjem izražanja različnih genov po elektroporaciji pokazali, da nanosekundni električni pulzi predstavljajo za celice drugačno vrsto stresa kot poškodbe endoplazemskega retikuluma, ultravijolična svetloba ali toplotni šok. Celice se na fiziološki stres odzovejo z aktivacijo različnih mehanizmov. Ker sinteza proteinov porabi znaten delež celičnih gradnikov in energije, je med odzivi na različne vrste stresa zelo regulirana. Elektroporacija povzroči fosforilacijo evkariontskega faktorja za iniciacijo translacije eIF2a ter defosforilacijo proteina 4EBP1, kar nakazuje na supresijo translacije proteinov oz. sinteze proteinov nasploh (62), ter na zmanjšano izražanje genov, ki sodelujejo pri sintezi proteinov (63). Hojman in sod. (64) so po elektroporaciji v mišjih mišicah zaznali zmanjšano izražanje genov, vključenih v metabolizem (npr. genov za fosfoenolpiruvat karboksikinazo in dipeptidazo), kar nakazuje na zmanjšanje katabolizma. Elektroporacija povzroči tudi druge spremembe: zmanjšano izražanje histonov H2A in H4, ki so ključni za organizacijo kromatina (63,65), zmanjšano izražanje genov za citoskeletne proteine (64) ter spremembe v genih oz. proteinih, ki so povezani s celično smrtjo in imunskim odzivom (66).

3.1 Celična smrt in imunski odziv

Celično smrt lahko v grobem razdelimo na patološko (nekrozo) in programirano. Do nedavnega je apoptoza veljala za sinonim programirane celične smrti,

vendar so v zadnjih letih odkrili tudi druge vrste programirane celične smrti, npr. piroptozo in nekroptozo. Apoptoza se v celici lahko sproži po več poteh, ki jih v glavnem razdelimo na ekstrinzično in intrinzično pot. Ekstrinzična pot se posreduje preko receptorjev na površini celične membrane (t.i. receptorji smrti). Pri ekstrinzični poti se kaspaza-8 aktivira ob celični membrani in nato neposredno aktivira efektorske kaspaze (kaspaza-3,-6 in -7). Intrinzična pot pa se posreduje preko mitohondrijev in je še posebej hitra, saj so vsi faktorji že prisotni in potrebujejo le še aktivacijo. Pri intrinzični poti se zaradi porušitve ravnotežja med proapoptičnimi (npr. Bid, Bax in Bak) in antiapoptičnimi (npr. Bcl-2) proteini iz mitohondrijev sprostijo proteini, ki sprožijo apoptozo (npr. citokrom c in inducirajoči dejavnik apoptoze, AIF), kar aktivira kaspaze. Za razliko od apoptoze je pri piroptozni ključna aktivacija kaspaze-1, -4, 5- ali -11, ki nato sprožijo proces programirane celične smrti s cepitvijo proteina tvorca por gasdermina D. Ključni označevalci piroptoze so aktivacija kaspaze-1 in neaktivacija kaspaze-3 (slednja se povezuje z apoptozo). Na aktivacijo nekroptoze pa vpliva aktivacija kinaz RIPK3 in MLKL (67).

Sprožitev apoptoze po elektroporaciji omenjajo predvsem v povezavi z nanosekundnimi pulzi (68-70), vendar so jo opazili tudi pri elektroporaciji celic z daljšimi pulzi. Ford in sod. (69) so v celicah mišjega melanoma po elektroporaciji s pulzi dolžine 3 ns zaznali od električnega polja odvisno povišanje količine aktiviranih kaspaz-3,-6,-7,-8 in -9. Niso pa opazili sprostitve citokroma c, AIF ali Smac/DIABLO iz mitohondrija. Njihovi izsledki nakazujejo, da nanosekundni pulzi sprožijo apoptozo po poti, ki je podobna ekstrinzični poti aktivacije. Nasprotno pa so Beebe in sod. (68) pri elektroporaciji s 60 ns pulzi opazili, da je sprožitev apoptoze odvisna tako od aktivacije kaspaz kot od mitohondrijev, saj so pri celični liniji limfocitov T zaznali sprostitve citokroma c v citoplazmo. Zhang in sod. (71) so spremljali izražanje 17 genov, povezanih z apoptozo. Že dve uri po elektroporaciji celic raka dojke z mikrosekundnimi pulzi so opazili spremembe v izražanju kaspaz in genov, povezanih z receptorji smrti. Izražanje kaspaze-3 se je povečalo, izražanje kaspaze-6, -7 in -9 ter Bcl-2, Bid in FASLG pa se je zmanjšalo. Zaključili so, da je aktivacija apoptoze po elektroporaciji potekala pretežno preko intrinzične poti.

Ker je kaspaza-3 vključena tako pri intrinzični kot ekstrinzični poti sprožitve apoptoze, lahko povečano izražanje kaspaze-3 nakazuje, da se je v celicah sprožil proces apoptoze, ne moremo pa določiti po kateri poti. Zhang in sod. (72) so zaznali več kaspaze-3 v celicah

raka trebušne slinavke, ki so bile izpostavljene elektroporacijskim pulzom, O'Brien in sod. (73) so po elektroporaciji opazili imunohistokemijsko obarvanje cepljene kaspaze-3 le na robu cone ablacije trebušne slinavke, Siddiqui in sod. (74) so zaznali cepljeno kaspazo-3 na celotni coni ablacije jeter, Mercadal in sod. (75) pa so zabeležili povečano izražanje kaspaze-3 oz. -7 pri adenokarcinomskih celicah trebušne slinavke. Vse tri raziskave nakazujejo, da gre za sprožitev apoptoze. Michel in sod. (60) so opazili povečano imunocitokemijsko obarvanje s protitelesi proti kaspazi-3 po inkubaciji s cisplatinom, elektroporaciji z mikrosekundnimi pulzi ter kombinaciji elektroporacije in cisplatina (elektrokemoterapiji) pri metastaznih celicah raka trebušne slinavke.

Električni tok, ki teče skozi prevodnik (npr. suspenzijo celic, tkivo ...), povzroči njegovo segrevanje (t.i. Joulova toplota). Z ustrezno izbranimi parametri električnih pulzov je mogoče doseči, da je povišanje temperature dovolj majhno, da ne pride do termičnih poškodb celic/tkiva. Faroja in sod. (76) so želeli ugotoviti, ali visokoenergijski pulzi (tj. veliko število pulzov in/ali velika jakost električnega polja) lahko povzročijo termične poškodbe jetrnega tkiva. Kadar temperatura pri elektroporaciji ni presegla 39 °C, so opazili apoptotične celice s cepljeno kaspazo-3 in praktično niso zaznali proteinov toplotnega šoka HSP70, za katere je značilno, da se njihovo izražanje močno poveča zaradi toplotnega stresa ali toksičnih kemikalij. Nasprotno so pri celicah, podvrženih elektroporacijskemu postopku, pri katerem je temperatura presegla 60° C, opazili izrazito izražanje HSP70 in le minimalno izražanje kaspaze-3. Ben-David in sod. (77) pa so po elektroporaciji opazili razlike v imunohistokemijskem obarvanju cepljene kaspaze-3 in HSP70 v različnih tkivih: v jetrih so zaznali močno obarvanje za cepljeno kaspazo-3 in omejeno izražanje HSP70, v mišičnih celicah obarvanja pa sploh niso zaznali, medtem ko so v ledvicah opazili minimalno obarvanje za cepljeno kaspazo-3 in znatno povišanje HSP70 v tkivu v okolici predela, kjer so dovedli električne pulze. Kanthou in sod. (45) niso zaznali povečane akumulacije HSP70 po elektroporaciji endotelnih celic žil popkovine, Mlakar in sod. (63) in Dogan in sod. (61) pa so po elektroporaciji celic malignega melanoma oz. mezenhimskih stromalnih celicah iz popkovične krvi in stromalnih celicah iz maščobnega tkiva opazili povečano izražanje proteinov iz družine proteinov toplotnega šoka HSP70.

V nasprotju z večino literature so v raziskavi Mercadal in sod. (75) celice adenokarcinoma trebušne slinavke po elektroporaciji umirale po poti, ki je neodvisna od kaspaze-3 oz. -7, Zhang in sod. (67) pa so 6 ur po

elektroporaciji jeter opazili povečano izražanje cepljene kaspaze-1, gasdermina D, RIPK3 in MLKL ter zmanjšano izražanje cepljene kaspaze-3. Zaključili so, da rezultati nakazujejo na aktivacijo procesa piroptoze in nekroptoze, ne pa na apoptozo. Ringel-Scaia in sod. (78) so takoj po elektroporaciji celic raka mlečne žleze opazili spremembe v izražanju genov, ki so skladne z apoptozo. Čez čas pa so opazili spremembo v izražanju genov v smeri proti vnetnim vrstam celične smrti in nekroze – po 24 urah so zabeležili povečano izražanje genov, povezanih z nekrozo in piroptozo. Piroptozo povezujejo tudi z reguliranjem vzorčno prepoznavnih receptorjev (*angl.* pattern recognition receptors, PRR), zato ni presenetljivo, da so opazili tudi povečano izražanje treh omrežij, ki so povezana z molekularnimi vzorci, povezanimi s poškodbami (*angl.* damage associated molecular patterns, DAMPs): signalizacijo RKZ, signalizacijo ATP in signalizacijo HMGB1. Zaznali pa so zmanjšano izražanje genov, povezanih s supresijo imunskega sistema, ter povečano izražanje genov, povezanih z vnetnim odzivom. Avtorji so opazili tudi zmanjšano izražanje genov, povezanih s celičnimi poškodbami ter povečano izražanje genov, povezanih z regeneracijo.

Peng in sod. (79) so 4 ure po elektroporaciji zaznali povečano izražanje genov, povezanih z apoptozo/ nekrozo (kaspaza-8, bcl-w, Mt2 ter 7 genov iz družine citokromov P450) ter povečano izražanje več genov za kemokine, vključno z MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 γ , IP-10 in MCP-2 v skeletni mišici miši. Heller in sod. (80) so po elektroporaciji mišjih melanomov izmerili povišano raven mRNA za več vnetnih kemokinov in citokinov (MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, IL-6 in inducibilne sintaze dušikovega oksida). Zaznali so tudi povišano raven proteinov IL-1 β in IL-6 po elektroporaciji. Goswami in sod. (81) pa so proučevali vpliv mikrosekundnih elektroporacijskih pulzov na trojno negativne celice raka dojke 4T1. Izmerili so povišano raven mRNA genov za IL-6, in za tumor nekrozni faktor TNF ter nižjo raven mRNA gena za TSLP po elektroporaciji. Nižje izražanje TSLP, ki ima pomembno vlogo pri napredovanju raka, so potrdili tudi na proteinski ravni. Zhang in sod. (71) so po elektroporaciji celic raka dojke opazili zmanjšano izražanje proteinov Ki-67 in TGF- β . Ki-67 se uporablja kot označevalec za deleče se celice in je povezan z rastjo in invazijo tumorjev, izražanje TGF- β pa korelira z invazivnostjo tumorjev. Mlakar in sod. (63) pa so pokazali, da elektroporacija celic malignega melanoma ne spremeni izražanja glavnih tumor supresorskih genov in onkogenov. Vse te raziskave nakazujejo, da je elektroporacija varna in nerakotvorna metoda.

4 Zaključek

Elektroporacija je pojav, ki povzroči povečanje prepustnosti celične membrane zaradi izpostavitve celic/ tkiv električnemu polju. Povzroči vrsto sprememb v celici, med drugim: strukturne spremembe v celični membrani, peroksidacijo membranskih lipidov, vdor Ca²⁺ v citoplazmo, iztekanje ATP in K⁺ iz celične notranjosti, osmotsko neravnovesje, porušitev citoskeleta, spremembe v izražanju genov in v sintezi proteinov, nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti, aktivacijo signalnih poti in popravljalnih mehanizmov; ob določenih pogojih sproži tudi celično smrt. S pojmom elektropermeom označujemo takó permeabilizirano celico in dogajanje med ali tik po dovajanju električnih pulzov kot tudi vse poznejše procese, ki ostanejo aktivni še nekaj časa potem, ko ni več opaziti povečanega transmembranskega transporta snovi, za katere je celična membrana običajno neprepustna, torej tudi po času, ko že ugotavljamo, da se je membrana zacelila.

Elektroporacija se uporablja na številnih področjih, vključno z elektrokemoterapijo, ablacijo tkiv ter gensko elektrotransfekcijo. Elektrokemoterapija se v klinični praksi uporablja že dobrih 15 let in se v številnih evropskih državah vključuje v smernice in standardno klinično prakso za zdravljenje različnih površinskih tumorjev, vključno z melanomom, skvamoznim karcinomom in metastazami vseh histologij. V kliničnih raziskavah se je pokazalo, da je elektrokemoterapija izvedljiva, varna in učinkovita tudi za globokoležeče tumorje (2,3). Za ablacijo mehkih tkiv se sicer rutinsko uporabljajo termične tehnike (ablacija z radiofrekvencami in mikrovalovi, krioblacija), vendar vse bolj narašča zanimanje za ablacijo z ireverzibilno elektroporacijo. Slednja je še zlasti zanimiva za uporabo na anatomskih mestih, kjer operacija in termične metode ablacije ne pridejo v poštev, npr. zaradi bližine vitalnih struktur, kot so velike krvne žile, črevesje, žolčne ali sečne poti. Zaradi pretežno netermičnega mehanizma delovanja ablacija z ireverzibilno elektroporacijo namreč ne poškoduje okoliškega tkiva. Uspešnost in varnost ablacije z ireverzibilno elektroporacijo sta se izkazali v številnih kliničnih študijah za odstranjevanje globlje ležečih tumorjev v jetrih, ledvicah, trebušni slinavki in prostati, pa tudi za izoliranje pljučnih ven pri zdravljenju fibrilacije preddvorov (4,82). Klinične študije preučujejo tudi možnost uporabe elektroporacije kot metodo vnosa nukleinskih kislin za gensko terapijo: za zdravljenje raka, za vnos cepiv na osnovi DNA ali RNA proti nalezljivim boleznim in raku, za vnos komponent sistema CRISPR-Cas9 za urejanje genoma itd. (83).

Aplikacije elektroporacije v medicini so učinkovite in varne, vendar so zaradi delovanja električnih pulzov lahko prisotni tudi določeni neželeni stranski učinki, predvsem mišično krčenje in akutna bolečina. Za optimizacijo parametrov elektroporacije in rezultatov na elektroporaciji temeljčih aplikacijah je ključna nadaljnja razjasnitev osnovnih mehanizmov elektroporacije in vplivov posameznih parametrov električnega polja na elektropermeom.

Izjava o navzkrižju interesov

D. Miklavčič je svetovalec podjetju Medtronic. A. Vižintin nima navzkrižja interesov.

Zahvala

Raziskave so bile opravljene v okviru programa P2-0249, Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS). Avtorja se zahvalujeta za finančno podporo tudi podjetjema Medtronic in Pulse Biosciences ter M. Tareku za sliko, kako nastane pora. A. Vižintin je prejemnica štipendije Univerzitetne ustanove inženirja Lenarčič Milana.

Literatura

- Kotnik T, Rems L, Tarek M, Miklavčič D. Membrane Electroporation and Electropermeabilization: mechanisms and Models. *Annu Rev Biophys.* 2019;48(1):63-91. DOI: [10.1146/annurev-biophys-052118-115451](https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115451) PMID: [30786231](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30786231/)
- Geboers B, Scheffer HJ, Graybill PM, Ruarus AH, Nieuwenhuizen S, Puijk RS, et al. High-Voltage Electrical Pulses in Oncology: Irreversible Electroporation, Electrochemotherapy, Gene Electrotransfer, Electrofusion, and Electroimmunotherapy. *Radiology.* 2020;295(2):254-72. DOI: [10.1148/radiol.2020192190](https://doi.org/10.1148/radiol.2020192190) PMID: [32208094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32208094/)
- Stepišnik T, Jarm T, Grošelj A, Edhemović I, Đokić M, Ivanec A, et al. Elektrokemoterapija – učinkovita metoda zdravljenja tumorjev s kombinacijo kemoterapevtikain električnega polja. *Zdrav Vestn.* 2016;86(1):41-55. DOI: [10.6016/ZdravVestn.1453](https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.1453)
- Cindrič H, Kos B, Miklavčič D. Irreverzibilna elektroporacija kot metoda ablacije mehkih tkiv: pregled in izzivi pri uporabi v kliničnem okolju. *Zdrav Vestn.* 2021(1-2):38-53. DOI: [10.6016/ZdravVestn.2954](https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.2954)
- Kim V, Gudvangen E, Kondratiev O, Redondo L, Xiao S, Pakhomov AG. Peculiarities of Neurostimulation by Intense Nanosecond Pulsed Electric Fields: How to Avoid Firing in Peripheral Nerve Fibers. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):7051. DOI: [10.3390/ijms22137051](https://doi.org/10.3390/ijms22137051) PMID: [34208945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34208945/)
- Schoenbach KH, Beebe SJ, Buescher ES. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics.* 2001;22(6):440-8. DOI: [10.1002/bem.71](https://doi.org/10.1002/bem.71) PMID: [11536285](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11536285/)
- Siddiqui IA, Latouche EL, DeWitt MR, Swet JH, Kirks RC, Baker EH, et al. Induction of rapid, reproducible hepatic ablations using next-generation, high frequency irreversible electroporation (H-FIRE) in vivo. *HPB (Oxford).* 2016;18(9):726-34. DOI: [10.1016/j.hpb.2016.06.015](https://doi.org/10.1016/j.hpb.2016.06.015) PMID: [27593589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27593589/)
- Dong S, Yao C, Zhao Y, Lv Y, Liu H. Parameters Optimization of Bipolar High Frequency Pulses on Tissue Ablation and Inhibiting Muscle Contraction. *IEEE Trans Dielectr Electr Insul.* 2018;25(1):207-16. DOI: [10.1109/TDEI.2018.006303](https://doi.org/10.1109/TDEI.2018.006303)
- O'Brien TJ, Passeri M, Lorenzo MF, Sulzer JK, Lyman WB, Swet JH, et al. Experimental high-frequency irreversible electroporation using a single-needle delivery approach for nonthermal pancreatic ablation in vivo. *J Vasc Interv Radiol.* 2019;30(6):854-862.e7. DOI: [10.1016/j.jvir.2019.01.032](https://doi.org/10.1016/j.jvir.2019.01.032) PMID: [31126597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31126597/)
- Vernier PT, Sun Y, Gundersen MA. Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization. *BMC Cell Biol.* 2006;7(1):37. DOI: [10.1186/1471-2121-7-37](https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-37) PMID: [17052354](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17052354/)
- Levine ZA, Vernier PT. Life cycle of an electropore: field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation. *J Membr Biol.* 2010;236(1):27-36. DOI: [10.1007/s00232-010-9277-y](https://doi.org/10.1007/s00232-010-9277-y) PMID: [20623350](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20623350/)
- Pakhomov AG, Shevin R, White JA, Kolb JF, Pakhomova ON, Joshi RP, et al. Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks. *Arch Biochem Biophys.* 2007;465(1):109-18. DOI: [10.1016/j.abb.2007.05.003](https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.05.003) PMID: [17555703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17555703/)
- Pucihar G, Kotnik T, Miklavčič D, Teissié J. Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electropermeabilized cells. *Biophys J.* 2008;95(6):2837-48. DOI: [10.1529/biophysj.108.135541](https://doi.org/10.1529/biophysj.108.135541) PMID: [18539632](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18539632/)
- Pakhomov AG, Kolb JF, White JA, Joshi RP, Xiao S, Schoenbach KH. Long-lasting plasma membrane permeabilization in mammalian cells by nanosecond pulsed electric field (nsPEF). *Bioelectromagnetics.* 2007;28(8):655-63. DOI: [10.1002/bem.20354](https://doi.org/10.1002/bem.20354) PMID: [17654532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17654532/)
- Muralidharan A, Rems L, Kreutzer MT, Boukany PE. Actin networks regulate the cell membrane permeability during electroporation. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2021;1863(1):183468. DOI: [10.1016/j.bbamem.2020.183468](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183468) PMID: [32882211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32882211/)
- Sözer EB, Levine ZA, Vernier PT. Quantitative limits on small molecule transport via the electropermeome measuring and modeling single nanosecond perturbations. *Sci Rep.* 2017;7(1):57. DOI: [10.1038/s41598-017-00092-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-00092-0) PMID: [28246401](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28246401/)
- Maccarrone M, Rosato N, Agrò AF. Electroporation enhances cell membrane peroxidation and luminescence. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;206(1):238-45. DOI: [10.1006/bbrc.1995.1033](https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1033) PMID: [7818526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7818526/)
- Maccarrone M, Bladergroen MR, Rosato N, Finazzi Agrò AF. Role of lipid peroxidation in electroporation-induced cell permeability. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209(2):417-25. DOI: [10.1006/bbrc.1995.1519](https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1519) PMID: [7733908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7733908/)
- Gabriel B, Teissié J. Generation of reactive-oxygen species induced by electropermeabilization of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability. *Eur J Biochem.* 1994;223(1):25-33. DOI: [10.1111/j.1432-1033.1994.tb18962.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18962.x) PMID: [8033899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8033899/)
- Gabriel B, Teissié J. Spatial compartmentation and time resolution of photooxidation of a cell membrane probe in electropermeabilized Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem.* 1995;228(3):710-8. DOI: [10.1111/j.1432-1033.1995.tb20314.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20314.x) PMID: [7737168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7737168/)
- Nuccitelli R, Lui K, Kreis M, Athos B, Nuccitelli P. Nanosecond pulsed electric field stimulation of reactive oxygen species in human pancreatic cancer cells is Ca(2+)-dependent. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;435(4):580-5. DOI: [10.1016/j.bbrc.2013.05.014](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.014) PMID: [23680664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23680664/)

22. Breton M, Mir LM. Investigation of the chemical mechanisms involved in the electropulsation of membranes at the molecular level. *Bioelectrochemistry*. 2018;119:76-83. DOI: [10.1016/j.bioelechem.2017.09.005](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.09.005) PMID: 28917184
23. Frankel EN. Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance. *J Am Oil Chem Soc*. 1984;61(12):1908-17. DOI: [10.1007/BF02540830](https://doi.org/10.1007/BF02540830)
24. Benov LC, Antonov PA, Ribarov SR. Oxidative damage of the membrane lipids after electroporation. *Gen Physiol Biophys*. 1994;13(2):85-97. PMID: 7806071
25. Vernier PT, Levine ZA, Wu YH, Joubert V, Ziegler MJ, Mir LM, et al. Electroporating fields target oxidatively damaged areas in the cell membrane. *PLoS One*. 2009;4(11):e7966. DOI: [10.1371/journal.pone.0007966](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007966) PMID: 19956595
26. Rems L, Viano M, Kasimova MA, Miklavčič D, Tarek M. The contribution of lipid peroxidation to membrane permeability in electroporation: A molecular dynamics study. *Bioelectrochemistry*. 2019;125:46-57. DOI: [10.1016/j.bioelechem.2018.07.018](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.07.018) PMID: 30265863
27. Runas KA, Malmstadt N. Low levels of lipid oxidation radically increase the passive permeability of lipid bilayers. *Soft Matter*. 2015;11(3):499-505. DOI: [10.1039/C4SM01478B](https://doi.org/10.1039/C4SM01478B) PMID: 25415555
28. Wong-Ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, Monticelli L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J*. 2007;93(12):4225-36. DOI: [10.1529/biophysj.107.112565](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112565) PMID: 17766354
29. Sabatini K, Mattila JP, Megli FM, Kinnunen PK. Characterization of two oxidatively modified phospholipids in mixed monolayers with DPPC. *Biophys J*. 2006;90(12):4488-99. DOI: [10.1529/biophysj.105.080176](https://doi.org/10.1529/biophysj.105.080176) PMID: 16581831
30. Boonnoy P, Jarerattanachai V, Karttunen M, Wong-Ekkabut J. Bilayer Deformation, Pores, and Micellation Induced by Oxidized Lipids. *J Phys Chem Lett*. 2015;6(24):4884-8. DOI: [10.1021/acs.jpcclett.5b02405](https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.5b02405) PMID: 26673194
31. Van der Paal J, Neyts EC, Verlact CC, Bogaerts A. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress. *Chem Sci (Camb)*. 2016;7(1):489-98. DOI: [10.1039/C5SC02311D](https://doi.org/10.1039/C5SC02311D) PMID: 28791102
32. Lis M, Wizert A, Przybylo M, Langner M, Swiatek J, Jungwirth P, et al. The effect of lipid oxidation on the water permeability of phospholipid bilayers. *Phys Chem Chem Phys*. 2011;13(39):17555-63. DOI: [10.1039/c1cp21009b](https://doi.org/10.1039/c1cp21009b) PMID: 21897935
33. Wiczew D, Szulc N, Tarek M. Molecular dynamics simulations of the effects of lipid oxidation on the permeability of cell membranes. *Bioelectrochemistry*. 2021;141:107869. DOI: [10.1016/j.bioelechem.2021.107869](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107869) PMID: 34119820
34. Cwiklik L, Jungwirth P. Massive oxidation of phospholipid membranes leads to pore creation and bilayer disintegration. *Chem Phys Lett*. 2010;486(4-6):99-103. DOI: [10.1016/j.cplett.2010.01.010](https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.01.010)
35. Kulig W, Olżyńska A, Jurkiewicz P, Kantola AM, Komulainen S, Manna M, et al. Cholesterol under oxidative stress—How lipid membranes sense oxidation as cholesterol is being replaced by oxysterols. *Free Radic Biol Med*. 2015;84:30-41. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.006](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.006) PMID: 25795515
36. Kazmierska M, Rudzinska M, Jarosz B, Dobrzanski Z, Trziszka T. Changes of the fatty acid composition, cholesterol and cholesterol oxide contents in whole egg after pulsed electric field treatment. *Arch Geflugelkd*. 2012;76(4):246-53.
37. Troiano GC, Stebe KJ, Raphael RM, Tung L. The effects of gramicidin on electroporation of lipid bilayers. *Biophys J*. 1999;76(6):3150-7. DOI: [10.1016/S0006-3495\(99\)77466-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77466-7) PMID: 10354439
38. Tarek M. Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. *Biophys J*. 2005;88(6):P4045-53. DOI: [10.1529/biophysj.104.050617](https://doi.org/10.1529/biophysj.104.050617) PMID: 15764667
39. Azan A, Untereiner V, Descamps L, Merla C, Gobinet C, Breton M, et al. Comprehensive Characterization of the Interaction between Pulsed Electric Fields and Live Cells by Confocal Raman Microspectroscopy. *Anal Chem*. 2017;89(20):10790-7. DOI: [10.1021/acs.analchem.7b02079](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02079) PMID: 28876051
40. Azan A, Untereiner V, Gobinet C, Sockalingum GD, Breton M, Piot O, et al. Demonstration of the Protein Involvement in Cell Electroporation using Confocal Raman Microspectroscopy. *Sci Rep*. 2016;2017(7):1-10. PMID: 28102326
41. Craviso GL, Choe S, Chatterjee P, Chatterjee I, Vernier PT. Nanosecond electric pulses: a novel stimulus for triggering Ca²⁺ influx into chromaffin cells via voltage-gated Ca²⁺ channels. *Cell Mol Neurobiol*. 2010;30(8):1259-65. DOI: [10.1007/s10571-010-9573-1](https://doi.org/10.1007/s10571-010-9573-1) PMID: 21080060
42. Semenov I, Xiao S, Kang D, Schoenbach KH, Pakhomov AG. Cell stimulation and calcium mobilization by picosecond electric pulses. *Bioelectrochemistry*. 2015;105:65-71. DOI: [10.1016/j.bioelechem.2015.05.013](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.05.013) PMID: 26011130
43. Burke RC, Bardet SM, Carr L, Romanenko S, Arnaud-Cormos D, Leveque P, et al. Nanosecond pulsed electric fields depolarize transmembrane potential via voltage-gated K⁺, Ca²⁺ and TRPM8 channels in U87 glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017;1859(10):2040-50. DOI: [10.1016/j.bbame.2017.07.004](https://doi.org/10.1016/j.bbame.2017.07.004) PMID: 28693898
44. Teissié J, Tsong TY. Evidence of voltage-induced channel opening in Na/K ATPase of human erythrocyte membrane. *J Membr Biol*. 1980;55(2):133-40. DOI: [10.1007/BF01871155](https://doi.org/10.1007/BF01871155) PMID: 6251222
45. Kanthou C, Kranjc S, Serša G, Tozer G, Županič A, Čemažar M. The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(12):3145-52. DOI: [10.1158/1535-7163.MCT-06-0410](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0410) PMID: 17172418
46. Meulenber CJ, Todorović V, Čemažar M. Differential cellular effects of electroporation and electrochemotherapy in monolayers of human microvascular endothelial cells. *PLoS One*. 2012;7(12):e52713. DOI: [10.1371/journal.pone.0052713](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052713) PMID: 23300747
47. Rems L, Kasimova MA, Testa I, Delemotte L. Pulsed Electric Fields Can Create Pores in the Voltage Sensors of Voltage-Gated Ion Channels. *Biophys J*. 2020;119(1):190-205. DOI: [10.1016/j.bpj.2020.05.030](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.05.030) PMID: 32559411
48. Ruiz-Fernández AR, Campos L, Villanelo F, Gutiérrez-Maldonado SE, Perez-Acle T. Exploring the conformational changes induced by nanosecond pulsed electric fields on the voltage sensing domain of a Ca²⁺ channel. *Membranes (Basel)*. 2021;11(7):473. DOI: [10.3390/membranes11070473](https://doi.org/10.3390/membranes11070473) PMID: 34206827
49. Graybill PM, Davalos RV. Cytoskeletal Disruption after Electroporation and Its Significance to Pulsed Electric Field Therapies. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5):29-32. DOI: [10.3390/cancers12051132](https://doi.org/10.3390/cancers12051132) PMID: 32366043
50. Perrier DL, Vahid A, Kathavi V, Stam L, Rems L, Mulla Y, et al. Response of an actin network in vesicles under electric pulses. *Sci Rep*. 2019;9(1):8151. DOI: [10.1038/s41598-019-44613-5](https://doi.org/10.1038/s41598-019-44613-5) PMID: 31148577
51. Harkin DG, Hay ED. Effects of electroporation on the tubulin cytoskeleton and directed migration of corneal fibroblasts cultured within collagen matrices. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1996;35(4):345-57. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1996\)35:4<345::AID-CM6>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1996)35:4<345::AID-CM6>3.0.CO;2-5) PMID: 8956005
52. Thompson GL, Roth CC, Kuipers MA, Tolstykh GP, Beier HT, Ibey BL. Permeabilization of the nuclear envelope following nanosecond pulsed electric field exposure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;470(1):35-40. DOI: [10.1016/j.bbrc.2015.12.092](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.092) PMID: 26721436
53. Pakhomov AG, Xiao S, Pakhomova ON, Semenov I, Kuipers MA, Ibey BL. Disassembly of actin structures by nanosecond pulsed electric field is a downstream effect of cell swelling. *Bioelectrochemistry*. 2014;100:88-95. DOI: [10.1016/j.bioelechem.2014.01.004](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.01.004) PMID: 24507565
54. Louise C, Etienne D, Marie-Pierre R. AFM sensing cortical actin cytoskeleton destabilization during plasma membrane electroporation. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2014;71(10):587-94. DOI: [10.1002/cm.21194](https://doi.org/10.1002/cm.21194) PMID: 25308626

55. Titushkin I, Cho M. Regulation of cell cytoskeleton and membrane mechanics by electric field: role of linker proteins. *Biophys J*. 2009;96(2):717-28. DOI: [10.1016/j.bpj.2008.09.035](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.09.035) PMID: [19167316](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19167316/)
56. Marracino P, Havelka D, Průša J, Liberti M, Tuszyński J, Ayoub AT, et al. Tubulin response to intense nanosecond-scale electric field in molecular dynamics simulation. *Sci Rep*. 2019;9(1):10477. DOI: [10.1038/s41598-019-46636-4](https://doi.org/10.1038/s41598-019-46636-4) PMID: [31324834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31324834/)
57. Chafai DE, Sulimenko V, Havelka D, Kubínová L, Dráber P, Cifra M. Reversible and Irreversible Modulation of Tubulin Self-Assembly by Intense Nanosecond Pulsed Electric Fields. *Adv Mater*. 2019;31(39):e1903636. DOI: [10.1002/adma.201903636](https://doi.org/10.1002/adma.201903636) PMID: [31408579](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31408579/)
58. Průša J, Cifra M. Molecular dynamics simulation of the nanosecond pulsed electric field effect on kinesin nanomotor. *Sci Rep*. 2019;9(1):19721. DOI: [10.1038/s41598-019-56052-3](https://doi.org/10.1038/s41598-019-56052-3) PMID: [31873109](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31873109/)
59. Tanino T, Sato S, Oshige M, Ohshima T. Analysis of the stress response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* toward pulsed electric field. *J Electrostat*. 2012;70(2):212-6. DOI: [10.1016/j.elstat.2012.01.003](https://doi.org/10.1016/j.elstat.2012.01.003)
60. Michel O, Kulbacka J, Sączko J, Mączyńska J, Błasiak P, Rossowska J, et al. Electroporation with Cisplatin against Metastatic Pancreatic Cancer: In Vitro Study on Human Primary Cell Culture. *BioMed Res Int*. 2018;2018:7364539. DOI: [10.1155/2018/7364539](https://doi.org/10.1155/2018/7364539) PMID: [29750170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29750170/)
61. Dovgan B, Miklavčič D, Knežević M, Zupan J, Barlič A. Intracellular delivery of trehalose renders mesenchymal stromal cells viable and immunomodulatory competent after cryopreservation. *Cytotechnology*. 2021;73(3):1-21. DOI: [10.1007/s10616-021-00465-4](https://doi.org/10.1007/s10616-021-00465-4) PMID: [33875905](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33875905/)
62. Morotomi-Yano K, Oyadomari S, Akiyama H, Yano K. Nanosecond pulsed electric fields act as a novel cellular stress that induces translational suppression accompanied by eIF2 α phosphorylation and 4E-BP1 dephosphorylation. *Exp Cell Res*. 2012;318(14):1733-44. DOI: [10.1016/j.yexcr.2012.04.016](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.04.016) PMID: [22652449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22652449/)
63. Mlakar V, Todorović V, Čemažar M, Glavač D, Serša G. Electric pulses used in electrochemotherapy and electrogene therapy do not significantly change the expression profile of genes involved in the development of cancer in malignant melanoma cells. *BMC Cancer*. 2009;9(1):299. DOI: [10.1186/1471-2407-9-299](https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-299) PMID: [19709437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19709437/)
64. Hojman P, Zibert JR, Gissel H, Eriksen J, Gehl J. Gene expression profiles in skeletal muscle after gene electrotransfer. *BMC Mol Biol*. 2007;8(1):56. DOI: [10.1186/1471-2199-8-56](https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-56) PMID: [17598924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17598924/)
65. Mittal L, Camarillo IG, Varadarajan GS, Srinivasan H, Aryal UK, Sundararajan R. High-throughput, Label-Free Quantitative Proteomic Studies of the Anticancer Effect of Electrical Pulses with Turmeric Silver Nanoparticles: an in vitro Model Study. *Sci Rep*. 2020;10(1):7258. DOI: [10.1038/s41598-020-64128-8](https://doi.org/10.1038/s41598-020-64128-8) PMID: [32350346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32350346/)
66. Batista Napotnik T, Polajžer T, Miklavčič D. Cell death due to electroporation - A review. *Bioelectrochemistry*. 2021;141:107871. DOI: [10.1016/j.bioelechem.2021.107871](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107871) PMID: [34147013](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34147013/)
67. Zhang Y, Liu C, Liu Y, Lv Y, Chang TT, Rubinsky B. Molecular and histological study on the effects of non-thermal irreversible electroporation on the liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;500(3):665-70. DOI: [10.1016/j.bbrc.2018.04.132](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.132) PMID: [29678581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29678581/)
68. Beebe SJ, Fox PM, Rec LJ, Willis EL, Schoenbach KH. Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. *FASEB J*. 2003;17(11):1493-5. DOI: [10.1096/fj.02-0859fje](https://doi.org/10.1096/fj.02-0859fje) PMID: [12824299](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12824299/)
69. Ford WE, Ren W, Blackmore PF, Schoenbach KH, Beebe SJ. Nanosecond pulsed electric fields stimulate apoptosis without release of pro-apoptotic factors from mitochondria in B16f10 melanoma. *Arch Biochem Biophys*. 2010;497(1-2):82-9. DOI: [10.1016/j.abb.2010.03.008](https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.008) PMID: [20346344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20346344/)
70. Beebe SJ, Fox PM, Rec LJ, Somers K, Stark RH, Schoenbach KH. Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition. *IEEE Trans Plasma Sci*. 2002;30(1):286-92. DOI: [10.1109/TPS.2002.1003872](https://doi.org/10.1109/TPS.2002.1003872)
71. Zhang H, Liu K, Xue Z, Yin H, Dong H, Jin W, et al. High-voltage pulsed electric field plus photodynamic therapy kills breast cancer cells by triggering apoptosis. *Am J Transl Res*. 2018;10(2):334-51. PMID: [29511429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29511429/)
72. Zhang Z, Li W, Procissi D, Tyler P, Omary RA, Larson AC. Rapid dramatic alterations to the tumor microstructure in pancreatic cancer following irreversible electroporation ablation. *Nanomedicine (Lond)*. 2014;9(8):1181-92. DOI: [10.2217/nnm.13.72](https://doi.org/10.2217/nnm.13.72) PMID: [24024571](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24024571/)
73. O'Brien TJ, Passeri M, Lorenzo MF, Sulzer JK, Lyman WB, Swet JH, et al. Experimental high-frequency irreversible electroporation using a single-needle delivery approach for nonthermal pancreatic ablation in vivo. *J Vasc Interv Radiol*. 2019;30(6):854-862.e7. DOI: [10.1016/j.jvir.2019.01.032](https://doi.org/10.1016/j.jvir.2019.01.032) PMID: [31126597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31126597/)
74. Siddiqui IA, Latouche EL, Dewitt MR, Swet JH, Kirks RC, Baker EH, et al. Induction of rapid, reproducible hepatic ablations using next-generation, high frequency irreversible electroporation (H-FIRE) in vivo. *HPB (xford)*. 2016;18(9):726-34. DOI: [10.1016/j.hpb.2016.06.015](https://doi.org/10.1016/j.hpb.2016.06.015) PMID: [27593589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27593589/)
75. Mercadal B, Beitel-White N, Aycock KN, Castellví Q, Davalos RV, Ivorra A. Dynamics of Cell Death After Conventional IRE and H-FIRE Treatments. *Ann Biomed Eng*. 2020;48(5):1451-62. DOI: [10.1007/s10439-020-02462-8](https://doi.org/10.1007/s10439-020-02462-8) PMID: [32026232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32026232/)
76. Faroja M, Ahmed M, Appelbaum L, Ben-David E, Moussa M, Sosna J, et al. Irreversible electroporation ablation: is all the damage nonthermal? *Radiology*. 2013;266(2):462-70. DOI: [10.1148/radiol.12120609](https://doi.org/10.1148/radiol.12120609) PMID: [23169795](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23169795/)
77. Ben-David E, Ahmed M, Faroja M, Moussa M, Wandel A, Sosna J, et al. Irreversible electroporation: treatment effect is susceptible to local environment and tissue properties. *Radiology*. 2013;269(3):738-47. DOI: [10.1148/radiol.13122590](https://doi.org/10.1148/radiol.13122590) PMID: [23847254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23847254/)
78. Ringel-Scaia VM, Beitel-White N, Lorenzo MF, Brock RM, Huie KE, Coutermarsh-Ott S, et al. High-frequency irreversible electroporation is an effective tumor ablation strategy that induces immunologic cell death and promotes systemic anti-tumor immunity. *EBioMedicine*. 2019;44:112-25. DOI: [10.1016/j.ebiom.2019.05.036](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.036) PMID: [31130474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31130474/)
79. Peng B, Zhao Y, Xu L, Xu Y. Electric pulses applied prior to intramuscular DNA vaccination greatly improve the vaccine immunogenicity. *Vaccine*. 2007;25(11):2064-73. DOI: [10.1016/j.vaccine.2006.11.042](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.042) PMID: [17239494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17239494/)
80. Heller LC, Cruz YL, Ferraro B, Yang H, Heller R. Plasmid injection and application of electric pulses alter endogenous mRNA and protein expression in B16.F10 mouse melanomas. *Cancer Gene Ther*. 2010;17(12):864-71. DOI: [10.1038/cgt.2010.43](https://doi.org/10.1038/cgt.2010.43) PMID: [20706286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20706286/)
81. Goswami I, Coutermarsh-Ott S, Morrison RG, Allen IC, Davalos RV, Verbridge SS, et al. Irreversible electroporation inhibits pro-cancer inflammatory signaling in triple-negative breast cancer cells. *Bioelectrochemistry*. 2017;113:42-50. DOI: [10.1016/j.bioelechem.2016.09.003](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.09.003) PMID: [27693939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27693939/)
82. Štublar J, Žižek D, Jan M, Jarm T, Miklavčič D. Zdravljenje atrijske fibrilacije s katetsko ablacijo. *Zdrav Vestn*. 2021;90:410-9.
83. Sachdev S, Potočnik T, Rems L, Miklavčič D. Revisiting the role of pulsed electric fields in overcoming the barriers to in vivo gene electrotransfer. *Bioelectrochemistry*. 2022;144:107994. DOI: [10.1016/j.bioelechem.2021.107994](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107994) PMID: [34930678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34930678/)