

Selma Čorović,¹ Ivan Pavlović,¹ Gregor Serša,² Damijan Miklavčič¹

ELEKTROPORACIJA ČELIJE I NJENA PRIMENA U MEDICINI

Sazetak: Kada se biološko tkivo izloži vrlo kratkim naponskim impulsima visoke amplitude nastaje električno polje. Ukoliko se intenzitet nastalog električnog polja poveća iznad odgovarajuće kritične vrednosti ćelijska membrana postaje propustljivija za jone i molecule, koji inače ne mogu da pređu u ćeliju. Ovakva modulacija propustljivosti ćelijske membrane pod uticajem električnog polja naziva se *elektroporacija* (takođe poznata i pod imenom elektropermeabilizacija) i omogućava pojačan transport jona i molekula u ćeliju. Ovaj fenomen ima široku *in vivo* i *in vitro* biološku i medicinsku primenu u cilju da olakša transfer raznih lekova u ćeliju, kao što su hemoterapeutici i DNA. U ovom radu predstavljamo sledeće oblike primene ćelijske elektroporacije u medicini: elektrohemoterapija, elektrogeni transdermalni transport lekovitih supstanci.

Ključne reči: elektropermeabilizacija, elektroporacija, elektrohemoterapija, matematičko modeliranje.

CILJ RADA: Cilj rada je predstaviti i istaći mogućnost upotrebe elektroporacije za povećanje propustljivosti ćelijske membrane kako bi se olakšao transport lekovitih supstanci u ćeliju. Ova metoda, koju nazivamo i elektropermeabilizacija, je u mnogim istraživačkim studijama pokazala velik potencijal za primenu u medicini. Ovim radom istaknućemo nekoliko osnovnih dostignuća u primeni elektroporacije u elektrohemoterapiji, elektrogenskoj terapiji i transportu lekovitih supstanci transdermalnim putem.

UVOD

Elektropermeabilizacija, poznata i pod imenom elektroporacija, ćelijske membrane je metoda za povećanje propustljivosti ćelijske membrane pod uticajem električnog polja [Neumann *et al.*, 1989, Weaver *et al.*, 1996, Gehl *et al.*, 2003, Miklavcic and Kotnik, 2004].

Ovom metodom olakšava se transport većih molekula kroz ćelijsku membranu, što inače membrana u stabilnom stanju sprečava. Tako se elektropermeabilizacijom olakšava transport mnogih lekovitih supstanci kao i molekula DNK. Zato je ova metoda veoma popularna istraživačka tema, a njena upotreba je pored drugih područja dokazana i na području humane medicine. Na primer u onkologiji se elektroporacijom selektivno povećava transport citostatika u tumorske ćelije, u biotehnologiji se na ovaj način olakšava transport molekula DNK za modifikaciju ćelija, a počela je i primena ove metode u terapiji genima (elektrogenska terapija). Jedan od glavnih faktora u postizanju optimalnih rezultata elektropermeabilizacijom predstavlja električno polje. Zato vrlo bitnu ulogu u razvoju ove metode igra rešavanje mnogih inženjerskih problema, naročito na području elektrotehnike. Tako je jedna od istraživačkih aktivnosti kojom se bave autori ovog rada upravo optimizacija elektropermeabilizacije ćelija i tkiva. Između ostalog istraživanje obuhvata eksperimentalnu optimizaciju u *in vitro* i *in vivo* uslovima, kompjutersku simulaciju pomoću numeričkih modela i razvoj elektronskih komponenata za proizvodnje električnog polja [<http://lbk.fe.uni-lj.si>].

Definicija elektroporacije (elektropermeabilizacije)

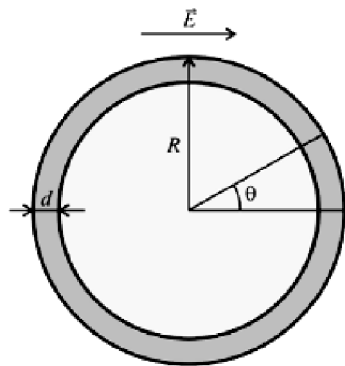
1. Ćelijska membrana je selektivno propustljiva, što ćeliji omogućava da kontroliše razmenu materije i da na, taj način, obavlja svoje funkcije i očuva svoj unutrašnji sastav.

2. Pod uticajem dovoljno jakog električnog polja dolazi do promena u strukturi lipidnog dvosloja i do promene transmembranskog napona, odnosno razlike površinskog i potencijala mirovanja na membrani. Ovo posledično utiče na način na koji ćelija obavlja razmenu materija sa neposrednim okruženjem.

¹ Elektrotehnički fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija.

² Onkološki institut u Ljubljani, Slovenija.

3. Sa elektrotehničkog vidika ćelijska membrana pod uticajem električnog polja ispoljava karakteristike električnog izolatora. Njena specifična provodljivost (S/m) je milion puta manja od provodljivosti izvanćelijskog i unutarćelijskog prostora. Zato je potrebno proizvesti jako električno polje dovoljnog intenziteta da bi se ova barijera prevazišla.



Slika 1: Grafički prikaz ćelije prečnika $2R$, debljine membrane d i ugla θ između električnog polja E i vektora poluprečnika R

Električno polje potrebno za elektropermeabilizaciju postiže se vrlo kratkim naponskim impulsima (trajanja oko $100 \mu\text{s}$) visoke amplitude (high-voltage HV pulses). Ovakve pulseve ćelijama ili tkivu treba dopremiti preko elektroda iz provodnog materijala odgovarajućeg oblika.

Pod uticajem električnog polja, između unutrašnjeg i spoljašnjeg dela membrane indukuje se razlika potencijala, odnosno formira se indukovani transmembranski napon. Ako je posmatrana ćelija okruglog oblika, kao što to prikazuje Slika 1, indukovani transmembranski napon ($\Delta\phi$) određuje se prema sledećoj formuli (1):

$$\Delta\phi = \frac{3}{2} \cdot E \cdot R \cos\theta \quad (1)$$

U navedenoj formuli E je amplituda električnog polja, R je poluprečnik ćelije, a θ je ugao između pravca električnog polja i vektora poluprečnika R koji povezuje centralnu tačku ćelije sa proizvoljnom tačkom na površini membrane. Vrednost indukovano transmembranskog napona je, dakle, srazmerna intenzitetu električnog polja E i dimenzijama ćelije, i zavisi od pozicije posmatrane tačke na membrani (srazmerno kosinusu θ).

Indukovani transmembranski napon formira se u vrlo kratkom vremenskom intervalu (nekoliko μs), a kada prevaziđe određenu kritičnu vrednost struktura ćelijske membrane se menja formirajući proširenja, takozvane pore, u lipidnom dvosloju membrane [Šemrov *et al.*, 1995, Pavlin *et al*, 2002]. Otuda ovaj proces dobija ime elektroporacija. Prema podacima iz litera-

ture, kritični transmembranski napon koji električnim poljem treba obezbediti ćeliji kako bi se membrana elektropermeabilizovala kreće se u rasponu od 200 mV do 1 V . Najzanimljivija činjenica u procesu elektroporacije je ta da je preko ovako nastalih pora moguće preneti bilo koju vrstu jona ili molekula u unutrašnjost ćelije. Upravo zbog ove činjenice elektroporacija ima veliki potencijal na područjima kao što su medicina, biotehnologija i farmacija.

U nastavku uvodnog dela ovog rada predstavice-mo značaj elektropermeabilizacije i raspodele električnog polja za elektrohemoterapiju, EGT i transport lekovitih supstanci transdelmalnim putem. Detaljnije ćemo opisati elektrohemoterapiju, jer se ova metoda već primenjuje na čoveku, odnosno u klinici, kao palijativna metoda za lečenje kožnih i potkožnih tumora različitih histologija.

Elektrohemoterapija

Zahvaljujući elektropermeabilizaciji tkiva hemoterapija može postati lokalna metoda za selektivno odstranjivanje tumora. U tom slučaju citostatik deluje samo na deo tkiva koji je izložen delovanju električnog polja, a to je tkivo između elektroda.

Osnove hemoterapije

Hemoterapija, kao metoda za lečenje rakastih oboljenja, predstavlja korišćenje određenih lekova koji obično deluju na celo telo kako bi se uništile ćelije raka koje su metastazirale ili su se raširile u one delove tela koji se nalaze daleko od primarnog tumora. Postoji više vrsta lekova koji se koriste u hemoterapiji. Iako se svaki od njih može koristiti pojedinačno u lečenju raka, poznato je da je njihovo dejstvo snažnije kada se koristi kombinovano, jer se na taj način uništava više kancerogenih ćelija, a ujedno se i smanjuje verovatnoća da pacijent postane rezistentan na određenu vrstu leka. Iz tog razloga, lekar obično propisuje određenu kombinaciju lekova kao i dužinu trajanja tretmana, koje su za pacijenta najprimerenije. Sve odluke u vezi sa hemoterapijskim lečenjem zavise od tipa raka, njegove lokacije, stadijuma razvoja, kao i od toga kako utiče na normalne telesne funkcije i opšte zdravlje pacijenta.

Sve odluke u vezi lečenja hemoterapijom zavise od tipa raka, njegove lokacije, stadijuma razvoja, kao i toga kako utiče na normalne telesne funkcije i generalno zdravlje pacijenta.

Osnovni princip delovanja lekova koji se koriste u hemoterapiji je takav da uništavaju ćelije koje se brzo razvijaju. Međutim, pošto ovi lekovi putuju kroz celo telo, oni mogu da utiču i na normalne, zdrave, ćelije koje se takođe prirodno brzo dele. Ovakve su, na primer, ćelije koštane srži, ćelije korena kose i ćelije ga-

strointestinalnog trakta. Sporedni efekti se javljaju upravo usled oštećenja zdravih tkiva, koji nestaju nakon završetka tretmana kada se zdrave ćelije oporave.

Konvencionalne kliničke metode za lokalno odstranjivanje glavnog tumora i obližnjeg zaraženog tkiva su hirurgija i radioterapija. Često se nakon operacije glavnog tumora hemoterapija koristi kao metoda za odstranjivanje preostalih ćelija raka u telu. Hemoterapija se primenjuje i kao metoda za smanjivanje tumora, kako bi hirurgu bilo lakše da ga odstrani, isto tako ova metoda se u klinici primenjuje i za olakšavanje simptoma za pacijente čiji je rak neizlečiv.

Osnove elektrohemoterapije:

Za lokalno odstranjivanje kožnih i potkožnih tumora u klinici koristi se i elektrohemoterapija — metoda koja predstavlja kombinaciju tretmana hemoterapijom i električnim poljem [Serša *et al.*, 2003, Serša *et al.*, 2006]. Radi se o odstranjivanju tumora lekovima koji se i inače upotrebljavaju u hemoterapiji, a čija se citotoksičnost može znatno povećati primenom električnog polja. U elektrohemoterapiji se kao citostatiki trenutno koriste bleomicin i cisplatin. Pod uticajem električnog polja citotoksičnost cisplatina može se povećati do 80 puta, dok se citotoksičnost bleomicina na ovaj način može povećati čak i do 8000 puta [Serša *et al.*, 1995, Orlowski *et al.*, 1988]. Zato je jedna od najznačajnijih prednosti elektrohemoterapije ta, da je za uspešan tretman dovoljna vrlo mala koncentracija antitumorskog leka, koja bez aplikacije električnog polja nema nikakvog citotoksičnog efekta, što je činjenica koja je dokazana brojnim studijama [Serša *et al.*, 2000]. Na ovaj način, značajno se mogu redukovati sporedni efekti koji mogu biti izazvani delovanjem antitumorskih lekova na zdrave ćelije. Isto tako, dokazano je da jačina električnog polja koja se koristi u elektrohemoterapiji bez delovanja hemoterapeutika nema efekta u lečenju tumora. Dakle, dok primenom samo hemoterapije ili samo električnog polja nema nikakvog antitumorskog efekta, kombinacijom ta dva tretmana mogu se postići izuzetno dobri rezultati.

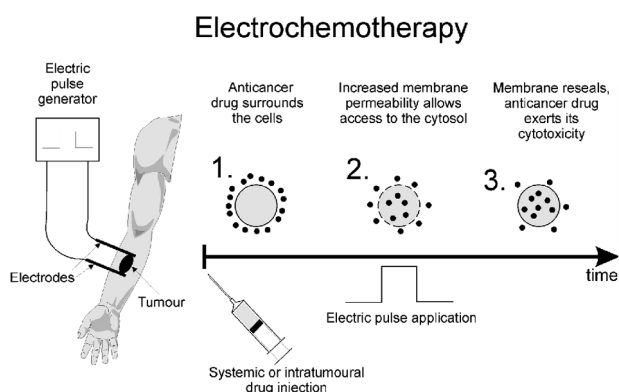
Kako se primenjuje elektrohemoterapija?

Tretman elektrohemoterapijom izvodi se kombinacijom ubrizgavanja antitumorskog leka, odnosno citostatika, koje se može sprovesti sistemskim intravenoznim ili lokalnim intratumorskim putem i primenom električnih (HV-high voltage pulses) impulsa. Kao što je već rečeno, citostatiki koji se koriste u elektrohemoterapiji su bleomicin i cisplatin, a njihova antitumorska efikasnost znatno se povećava aplikacijom električnih impulsa. Aplikacija električnih impulsa, proizvedenih generatorom napona, na tumorsko tkivo vrši se preko

provodničkih elektroda. Oblik elektrode zavisi od oblika i lokacije tumora. Elektrohemoterapija kožnih tumora koji su locirani na površini kože, i zato lako dostupni za neinvazivne elektrode, sprovodi se pločastim elektrodama, dok za tretman potkožnih tumora koji su se razvili daleko od površine kože, koristimo invazivne, odnosno, igličaste elektrode [Miklavčič *et al.*, 2006].

Električni impulsi koji se primenjuju u elektrohemoterapiji pravougaonog su oblika, a protokol pod kojim se ovaj tretman izvodi sastoji se iz niza od 8 pravougaonih impulsa širine 100 μ s, frekvencije 1 Hz ili 5 kHz, dok je proporcija između amplitude impulsa (U) i razdaljine između elektroda (d) obično u opsegu od 1300 V/cm do 1500 V/cm. Ovaj protokol je određen u okviru prekliničkih i kliničkih *in vivo* studija [Marty *et al.*, 2006].

Na Slici 2 ilustrovan je redosled postupaka pri izvođenju elektrohemoterapije; broj jedan (1.) na slici označava injekciju antitumorskog leka (bleomicina ili cisplatina) i njegovu raspodelu u vanćelijskom prostoru, broj dva (2.) označava aplikaciju pravougaonih električnih impulsa i ulazak leka u tumorsku ćeliju kroz elektropermeabilizovanu ćelijsku membranu, dok je brojem tri (3.) ilustrovano vraćanje ćelijske membrane u prvobitno stanje nakon prestanka električnih impulsa. Citostatik ostaje u ćeliji i, aktivirajući proces mitotičke ćelijske smrti, uništava je [Mir *et al.*, 1996].



Slika 2: Ilustracija primene elektrohemoterapije (po S. B. Dev, *Cancer Watch*, 1994): 1. injekcija antitumorskog leka (bleomicina ili cisplatina), 2. aplikacija električnih impulsa na tkivo i ulazak leka u tumorsku ćeliju kroz elektropermeabilizovanu ćelijsku membranu i 3. povratak ćelijske membrane u prvobitno stanje nakon prestanka impulsa.

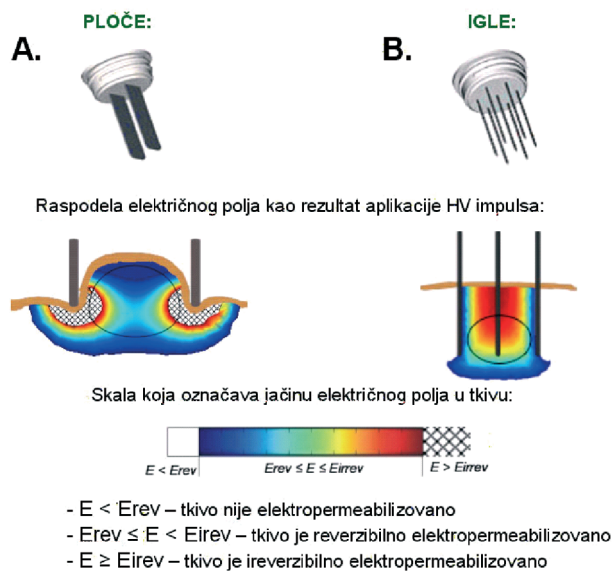
Raspodela električnog polja i elektropermeabilizacija

U cilju uspešnog lečenja tumora elektrohemoterapijom, potrebno je postići uspešnu elektropermeabilizaciju svih ćelija tumorskog tkiva, što znači da elek-

trično polje u celoj zapremini tumora mora prekoračiti kritičnu, odnosno, reverzibilnu, vrednost kojom se postiže elektropermeabilizacija. Ova vrednost električnog polja u literaturi se označava kao E_{rev} . U slučaju kada vrednost električnog polja u tkivu prekorači ireverzibilnu vrednost (u literaturi označenu kao E_{irev}) nastupe permanentna oštećenja u ćelijskoj membrani što dovodi do nekroze ćelije.

Na Slici 3 prikazana je raspodela električnog polja, kao rezultat dovođenja impulsa pločastim (Slika 3A) i igličastim elektrodama (Slika 3B) koje se najčešće koriste u kliničnoj elektrohemoterapiji. Intenzitet električnog polja u tkivu označen je skalom koja se nalazi u donjem delu Slike 3. Mnogim *in vivo* i *in vitro* studijama je dokazano da je efikasnost elektropermeabilizacije ćelija u korelaciji sa vrednošću električnog polja, na osnovu čega tvrdimo da i uspešnost elektrohemoterapije zavisi od raspodele električnog polja u tumoru [Gehl *et al.* 1999, Miklavčič *et al.*, 2000, Pavšelj *et al.*, 2005, Miklavčič *et al.*, 2006]. Vrednost električnog polja u tretiranom tkivu može se regulisati parametrima koji određuju njegovu jačinu, a to su dimenzije, orijentacija i oblik upotrebljenih elektroda, kao i amplituda dovedenih električnih impulsa. Pomenuti parametri moraju se odrediti u skladu sa električnim karakteristikama i geometrijom tumorskog tkiva, kao i zdravog tkiva u njenoj neposrednoj blizini, kako bi se u tumoru postiglo odgovarajuće lokalno električno polje ($E > E_{rev}$), a ujedno i zaštitilo zdravo tkivo. Za dizajniranje odgovarajućih elektroda i električnih impulsa za tretman elektrohemoterapijom veliki značaj predstavljaju matematičke numeričke simulacije. U Laboratoriji za biokibernetiku, na Elektrotehničkom fakultetu u Ljubljani, bavimo se dizajnom i takozvanim predtretmanskim (pre-treatment) planiranjem. U saradnji sa Onkološkim institutom u Ljubljani i drugim istraživačkim centrima razvijamo optimizacijske metode kako bi elektrohemoterapija bila što efikasnija i prihvaćena kao uobičajena metoda u lečenju rakastih oboljenja [Miklavčič *et al.*, 2006, Šel *et al.*, 2007]. Matematičko modeliranje koristi se takođe, za optimizaciju elektropermeabilizacije u elektrogenskoj terapiji i transportu lekovitih supstancija transdermalnim putem. U modeliranju za numeričko rešavanje bioloških problema najčešće koristimo metodu konačnih elemenata [Šel *et al.*, 2005]. Validacija matematičkih modela vrši se na osnovu usklađivanja rezultata numeričkih simulacija sa odgovarajućim *in vivo* ili *in vitro* eksperimentima [Miklavčič *et al.*, 2000].

Kao što je pokazano na Slici 3 jačina električnog polja određuje stepen, odnosno režim, elektropermeabilizacije u tkivu: električno polje slabije od E_{rev} (područje na slici označeno kao $E < E_{rev}$) ne povećava propusnost ćelijske membrane; polje jačine između E_{rev} i



Slika 3: Jačina električnog polja — stepen odnosno režim elektropermeabilizacije: A. Pločaste (plate) elektrode; B. Igličaste (needle) elektrode.

E_{irev} reverzibilno elektropermeabilizuje ćelije tako da su nakon prestanka električnih impulsa sposobne da se oporave; dok električno polje nad ireverzibilnim pragom E_{irev} (šrafirano područje) prouzrokuje ablaciju ćelija. U elektrohemoterapiji je poželjno da se električni parametri dizajniraju tako da na ćelije tumora deluje električno polje reverzibilne elektropermeabilizacije, jer se na taj način obezbeđuje da tumorske ćelije umiru usled delovanja citostatika. Reverzibilnom elektropermeabilizacijom i citostaticima tj. elektrohemoterapijom postiže se vrlo brzo zarastanje tkiva i dobar kozmetički efekat, dok se ireverzibilno električno polje bez primene citostatika koristi za ablaciju tkiva kao alternativa hirurškim metodama odstranjivanja tumora [Davalos *et al.*, 2005].

Treba istaći da je kod korišćenja električnog polja u terapiji genima i transdermalnom transportu lekova obavezna primena reverzibilne elektropermeabilizacije, jer nam je cilj da sve elektropermeabilizovane ćelije prežive.

DISKUSIJA

1. Primena elektrohemoterapije u klinici

Prva klinička studija elektrohemoterapije objavljena je 1991 godine [Mir *et al.*, 1991]. Nakon toga sledile su brojne kliničke studije faze I i II, koje su pokazale vrlo pozitivnu kliničku primenu elektrohemoterapije bleomicinom i cisplatinom. U tim studijama lečeni su kožni i potkožni tumorski noduli pacijenata sa mnogim napredovanim malignitetima, kao što su sarkomi, karcinomi, a najčešće maligni melanomi. Tako je ovom metodom lečeno ukupno 247 pacijenata u svim

objavljenim kliničkim studijama od 1991. do 2003. godine (ukupno je bilo lečenih 1009 tumorskih nodula). U svim tim studijama je pokazano da je elektrohemoterapija praktična, jednostavna i efikasna metoda za lokalno lečenje kožnih i potkožnih tumorskih nodula, pri čemu su nepoželjni efekti uglavnom zanemarljivi [Gothelf *et al.*, 2003, Serša *et al.*, 2003, Burian *et al.*, 2003, Byrne *et al.*, 2005].

Ovi tretmani sprovedeni su prema protokolima koji su bili posebno prilagođeni za svaki od pojedinačnih onkoloških centara, što znači da se elektrohemoterapija u svakom od njih izvodila upotrebljavajući različite citostatike, različite parametre električnih impulsa (frekvencija i amplituda), različite generatore električnih impulsa, kao i različite konfiguracije elektroda [Puc *et al.*, 2004]. 2003. godine pokrenut je evropski projekat (ESOPE — European Standard Operating procedures of Electrochemotherapy) u cilju određivanja standardnog protokola za sprovođenje elektrohemoterapije. Ovim projektom izvršila se procena i potvrdila efikasnost i bezbednost elektrohemoterapije kožnih i potkožnih tumorskih nodula primenom bleomicina i cisplatina na pacijentima sa različitim malignim melanomima i drugim malignitetima u četiri onkološka istraživačka centra primenjujući jednake protokole. U kliničkoj studiji učestvovali su sledeći onkološki centri: Institut Gustave-Roussy (IGR), Villejuif, Francuska; Onkološki institut u Ljubljani, Slovenija; Univerzitet u Kopenhagenu Harlev bolnica, Herlev, Danska i Bolnica univerziteta Mercy (National University of Ireland (CCRC), Cork, Irland.

Glavni ciljevi kliničke studije bili su sledeći: odrediti objektivni i kompletan odgovor na lečenje (objective OR and complete response rate) nakon samo jednog tretmana; ispitati efikasnost bleomicina i cisplatina, kao i optimalan način njihove primene; odrediti rezultat terapije u odnosu na histologiju tumora, konfiguraciju primenjenih elektroda, frekvenciju i amplitudu električnih impulsa; odrediti rezultat terapije u odnosu na centar u kome se terapija sprovodila kao i oceniti toksičnost i bezbednost elektrohemoterapije.

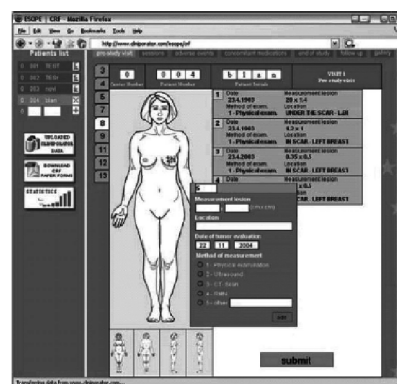
Svi onkološki centri koristili su jednak generator električnih impulsa koji je u okviru projekta Cliniporator (koji je prethodio projektu ESOPE) bio posebno dizajniran za primenu elektrohemoterapije u klinici. Generator je nazvan istim imenom, dakle CliniporatorTM, a sada ga komercijalno proizvodi italijansko preduzeće IGEA S.r.l., u Karpiju, Italija.

Za potrebe ESOPE projekta razvijen je centralizovani elektronski sistem za sakupljanje podataka o pacijentima koji su učestvovali u kliničkoj studiji. (Web-based electronic data collection system [Pavlović *et al.*, 2007]). Sakupljeni podaci su uključivali informacije o stanju pacijenta pre tretmana, opis tretmana, kao i

podatke o rezultatima elektrohemoterapije u periodu (follow-up period) 60 dana nakon terapije. Dimenzije tumorskih nodula pre tretmana i tokom follow-up-a merene su i praćene prema kriterijumima propisanim u WHO Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment [WHO Handbook].

Na kraju follow-up perioda stanje svakog od tretiranih tumorskih nodula određeno je prema pomenutim WHO kriterijumima: CR — complete response rate za potpuni nestanak nodula; PR — partial response rate za redukciju nodula za više od 50%; NC — no change za uvećanje nodula do 25% ili PD — progressive disease za uvećanje nodula za više od 25%.

Unos podataka iz svakog pojedinačnog centra u elektronski sistem vršio se preko elektronskih formulara (case report forms — CRF) dostupnih na Internetu. Informacije iz svih onkoloških centara sakupljane su u centralnoj bazi podataka, što je omogućilo neprekidno praćenje toka studije, kao i ažurnu statističku obradu sakupljenih podataka tokom same studije i po završetku studije. Struktura i sadržaj CRF formulara su interaktivni. Oni, na primer, sadrže interaktivnu mapu tela čoveka na kojoj je moguće označiti lokaciju tumorskog nodula i uneti odgovarajuće podatke o karakteristikama tumora (Slika 4). U obrasce je takođe moguće dodati digitalne fotografije tumorskih nodula, podatke o načinu tretmana i postignutim rezultatima tokom follow-up-a.

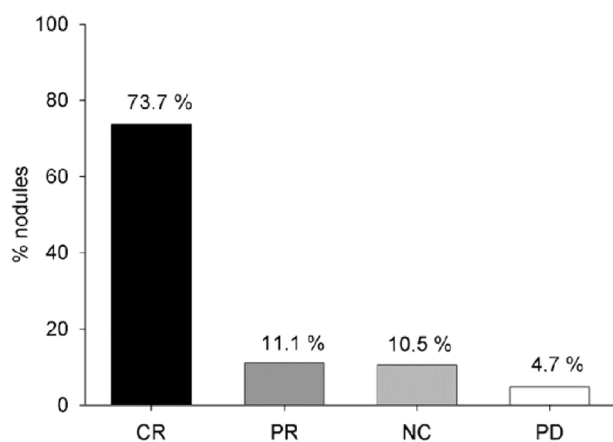


Slika 4: Interaktivna mapa čoveka urađena u Macro-media Flash-u. Označivši lokaciju tumorskog nodula lekaru se automatski nudi mogućnost za unos odgovarajućih podataka u digitalnu mapu.

Kao i u prethodnim sličnim studijama i u toku ESOPE studije takođe lečeni su, takođe, kožni i potkožni tumorski noduli pacijenata sa mnogim napredovanim malignitetima različite histologije: maligni melanomi, sarkomi i karcinomi. Projekat je trajao od 31. marta 2003. do 20. aprila 2005. godine.

U određivanje efikasnosti elektrohemoterapije (overall treatment response), u skladu sa definisanim protokolom, uključen je bio 41 pacijent, što ukupno iz-

nosi 171 tumorski nodul. Od toga je odgovor na elektrohemoterapiju postignut u tretmanu 145 nodulova (84.8%), pri čemu je potpuno ozdravljenje (complete response) postignuto kod 73.7% nodula, a delimično ozdravljenje (partial response) kod 11.1%. Negativan odgovor (negative response) imalo je 15.2% nodula, a procenat napredovanih tumora bio je 4.7%. Opisani rezultati prikazani su grafikonom na Slici 5.



Slika 5: Efikasnost elektrohemoterapije kožnih i potkožnih tumora različitih histologija: CR — complete response rate; PR — partial response rate; NC — no change and PD — progressive disease

Rezultati postignuti u toku ESOPE projekta potvrdili su prethodna dostignuća na području elektrohemoterapije [Marty *et al.*, 2006].

Broj pacijenata i broj lečenih tumorskih nodula u objavljenim studijama pre ESOPE studije kao i onih lečenih tokom ESOPE studije, te uspešnost lečenja elektrohemoterapijom dati su u tabeli 1.

Rezultati tretmana elektrohemoterapijom	Broj Pacijenata	Broj tumorskih nodula	Rezultat (Response rate) %				
			OR	CR	PR	NC	PD
Pre ESOPE studija	247	1009	83	64	19	11	6
ESOPE studija	41	171	85	74	11	10	5

Tabela 1: Efikasnost elektrohemijoterapije u objavljenim studijama pre ESOPE projekta i tokom ESOPE projekta

Na osnovu postignutih rezultata tokom ovog projekta, uzimajući u obzir znanje i iskustvo postignuto pre ove studije propisani su protokoli (Standard Operating Procedures SOP) za primenu elektrohemoterapije u klinici. Ovim protokolima precizno su definisani parametri kao što su primena anestezije, koncentracija i način davanja citostatika (bleomicina ili cisplatina), izbor odgovarajućih elektroda, amplituda i frekvencija električnih impulsa u odnosu na karakteristike tumorskih nodula (dimenzije pojedinačnog tumora, broj tumora i njihova lokacija), kao i propisi u vezi sa praće-

njem toka lečenja (follow-up period). Protokol je detaljno definisan u [Mir *et al.*, 2006].

Na osnovu iskustva stečenog u elektrohemoterapiji do sada, obuhvatajući rezultate ESOPE studije, prednosti koje ovaj tretman pruža mogu se rezimirati na sledeći način [Serša *et al.*, 2006, Marty *et al.*, 2006]:

— CR — complete response rezultat lečenja tumora moguće je postići nakon samo jednog tretmana elektrohemoterapijom.

— Efikasnost metode ne zavisi od histologije tumora: terapijom melanoma, kao i tretmanom karcinoma i sarcoma postignuti su jednaki rezultati u efikasnosti elektrohemoterapije (OR — objective response 81%).

— Minimalni sporedni efekti: usled primene vrlo niske doze citostatika i lokalnog delovanja električnog polja ne dolazi do sistemskih sporednih efekata, nakon tretmana nije potrebna posebna nega pacijenta, prema rezultatima evaluacijskog testa o bolnosti ovog tretmana 93% ispitanih pacijenata ponovilo bi ovaj tretman ako bi to bilo potrebno.

— Jednostavna primena: elektrohemoterapija se uglavnom primenjuje pod lokalnom anestezijom i nije potrebna hospitalizacija, primena je kratkotrajna (trajanje: do 25 min) i daleko jednostavnija u poređenju sa radijoterapijom ili metodama isolated extremity perfusion i infusion (prema SOP protokolu obuka medicinskog osoblja može se izvesti u toku jednog dana).

— Moguće je ponavljanje terapije sa jednakom efikasnošću u lečenju tumora većih dimenzija kao i većeg broja tumora. U ovom slučaju tumor se može ponovo pojaviti u marginalnim područjima koja nisu bila dovoljno elektropermeabilizovana usled upotrebe elektroda čije dimenzije su manje od dimenzija tumora. I u ovakvim slučajevima, kada je tretman trebalo ponoviti, rezultat terapije bio je pozitivan, što takođe znači da pacijent usled ponavljanja tretmana ne postaje rezistentan na citostatik [Mir *et al.*, 1998], [Serša *et al.*, 2000]. Navedimo i slučaj efikasnosti tretmana nodula Kaposi sarkoma ponavljajućom elektrohemoterapijom [Garbay *et al.*, 2006].

— Metoda je efikasna i u tretmanu tumora koji su se pojavili nakon tretmana konvencionalnim metodama. Naime, elektrohemoterapija primenjena na pacijenatima (u terminalnoj fazi), naročito u slučaju kada su se tumori pojavili nakon hirurgije [Mir *et al.*, 1998] i radioterapije [Serša *et al.*, 1998], pokazala se vrlo efikasnom u odstranjivanju tumorskih nodula. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da se elektrohemoterapijom može uspešno intervenisati u slučajevima kada ostale konvencionalne metode više nije moguće primeniti i na taj način doprineti u olakšavanju simptoma pacijentima kod kojih je rak neizlečiv.

Prema do sada postignutim rezultatima možemo zaključiti da elektrohemoterapija u klinici može biti izuzetno korisna u sledećim slučajevima [Serša *et al.*, 2006]:

— kao paliјativni tretman (paliative treatment) poodmakle bolesti (melanom u fazi IV), naročito kod stariјih osoba.

— kao neoadjuvantni tretman (neoadjuvant treatment), odnosno citoreduktivna terapiја pre hirurške intervencije, kako bi se očuvao što veći deo organa, a uјedno i njegova funkcionalnost. Navedimo primer uspešnog odstranjivanja analnog melanoma, gde je kombinacijom elektrohemoterapiје i hirurgije sačuvan sfinkter [Snoj *et al.*, 2005]. Isto tako, kombinacijom elektrohemoterapiје i hirurgije postižu se dobri rezultati digital chondrosarcoma, gde se prst spasava od amputacije, koja bi bez primene elektrohemoterapiје bila neizbežna [Shimizu *et al.*, 2003].

— u očuvanju organa i njihove funkcije (organ and function sparing), budući da je elektrohemoterapiју moguće primeniti na bilo kojem delu tela ukljućujući lobanju, lice, usnu duplju, kao i analno područje. Za terapiју tumora na pomenutim delovima tela elektrohemoterapiја bila bi adekvatnija od radioterapiје ili hirurgije. Navedimo primer uspešne elektrohemoterapiје bazalnih karcinoma na području lica [Heller *et al.*, 1998].

— kao tretman hemoragićnih i bolnih tumorskih nodula. Pod uticajem elektrićnog polја dolazi do vaskularnih promena u tkivu, odnosno dolazi do redukcije protoka krvi u tumoru. Usled ovog fenomena, takozvanog »vascular lock«-a, produćava se delovanje citostatika, zaustavlја krvarenje i ublaćava bol. Navedimo primer efikasnog paliјativnog tretmana hemoragićnih koćnih metastaza, gde je elektrohemoterapiјom zaustavljeno krvarenje [Ghel *et al.*, 2000] i slućaj pacijenta (sa vrlo bolnim squamous carcinoma of supraglotis) kome je elektrohemoterapiјom ublaćen bol [Serša *et al.*, 1998].

Opšti zakljućak: Elektrohemoterapiја je jednostavna, bezbedna i efikasna metoda koja moće dati vrlo dobre rezultate nakon jednog samog tretmana. Trenutno se u klinici koristi kao paliјativna metoda za odstranjivanju koćnih maligniteta razlićitih histologija. Razvoјem endoluminarnih elektroda u kombinaciji sa hirurškom intervencijom ova metoda trebala bi da poćne da se primenjuje i za lećenje tumora na unutrašnjim organima. Oćekuje se da će se budućim razvoјem, kao i širenјem stećenog znanja i iskustva, indikacije za primenu elektrohemoterapiје u klinici raširiti.

2. Elektroporacija u transferu DNK:

Sa dešifrovanјem ljudskog genoma dolazi do revolucionarnog napretka u istraćivanјima na području farmacije i medicine, jer se transferom gena, pruća mogućnost za lećenje mnogih naslednih i infektivnih bolesti. Uprkos obećavajućim rezultatima postignutih uspešnom terapiјom gena koji su unešeni pomoću virusnih vektora, postoji joć mnogo nerešenih pitanja u vezi sa neželjenim efektima koji mogu nastupiti usled

negativnog odgovora imunskog sistema. Zato se u naući puno paćnje posvećuje nevirusnim metodama transfera terapiјskih gena u ciljna tkiva i organe [Parker *et al.*, 2003; Mehier-Humbert and Guy, 2005]. Jedno od mogućih nevirusnih rećenja za transfer gena u ćelije je primena elektrićnih impulsa, odnosno elektrićnog polја, kako bi se povećala propustljivost membrane. Ovu metodu nazivamo *elektrogenska terapiја* [Ćemaćar *et al.*, 2006]. Eksperimenti potvrćuju da se najbolji rezultati transfera genetskog materijala kroz ćeliјsku membranu mogu postići kombinacijom kratkih impulsa visoke amplitude i dugotrajnih impulsa niske amplitude. Na taj naćin, prvim impulsom postiћemo povećanje propustljivosti ćeliјske membrane, odnosno njenu elektropermeabilizaciju. Naredni, dući impuls manјeg intenziteta, vrći elektroforezu, pri ćemu negativno naelektrisani molekuli DNK bivaju potisnuti prema prethodno elektropermeabilizovanoј membrani i unutrašnjosti ćelije [Šatkauskas *et al.*, 2002; Šatkauskas *et al.*, 2005]. Pri unosu gena ovom metodom moramo biti jako oprezni kod dizajniranja elektrićnog polја koje ne sme da bude previsoko kako bi reverzibilno elektropermeabilizovali ćeliјske membrane, i time očuvali ćelije. Sa druge strane, ireverzibilna elektropermeabilizacija pri elektrohemoterapiји nije naroćito opasna, jer je uništavanje tumorskih ćelija cilj ove terapiје.

Prva klinićka ispitivanja (odnosno klinićeke studije faze I i II) za primenu elektropermeabilizacije u gensoćjoj terapiји već su u toku.

3. Elektroporacija u transdermalnom transportu lekovitih supstanci

Lekovite supstance moguće je unositi u telo i transdermalnim putem, koji u odnosu na primenu lekova invazivnim intravenoznim putem ima odrećene prednosti meću kojima su sprećavanje nepoćželjnog delovanja probavnih encima na supstance koje se unose, kao i postepen, konstantan unos lekovite supstance u telo, nasuprot brzom intravenoznom unosu. Za unos lekova transdermalnim putem koriste se sleće metode: ultrazvuk, iontoforeza i elektropermeabilizacija (elektroporacija) [Prausnitz, 1997; Barry, 2001; Denet and Préat, 2003; Prausnitz *et al.*, 2004]. Zbog svoje zaštitne funkcije i velikog elektrićnog otpora, koća predstavlја veliku barijeru za transdermalni transport supstanci. Pod uticajem elektrićnog polја, odnosno procesom elektropermeabilizacije, moguće je privremeno smanјiti elektrićni otpor koće i na taj naćin privremeno povećati propustljivost koće kako bi se omogućio transport leka u telo. Elektropermeabilizacija koće moće se postići bez nastanka nepoćželjnih i štetnih efekata, a treba istaknuti da elektrićna struja tokom ovog procesa dodatno ubrza transdermalni prenos jona i naelektrisanih molekula [Prausnitz, 1996; Prausnitz, 1999].

Summary

APPLICATION OF CELL ELECTROPORATION IN MEDICINE

Selma Čorović,¹ Ivan Pavlović,¹ Gregor Serša,² Damijan Miklavčič¹

1 — School of Electrical Engineering, University of Ljubljana; 2 — Institute of Oncology, in Ljubljana

When a biological tissue is exposed to the high voltage pulses a local electric field distribution within its volume is created. If the magnitude of the local electric field exceeds a critical threshold value the cell membranes become more permeable for ions and molecules, which otherwise can not enter the cell. Such a modality of cell membrane permeabilization by means of electric field is named electroporation (also termed electropermeabilization) and allows for increased en-

trance of any type of ions and molecules into the cell. This phenomenon is being widely used in many in vivo and in vitro biological and medical applications in order to facilitate the transfer of diverse therapeutic into cells, such as chemotherapeutics and DNA. In this paper we present the following medical applications of cell electroporation process: electrochemotherapy, electrogene transfection and transdermal drug delivery.

Literatura

- Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2001; 14: 101–114.
- Burian M, Formanek M, Regele H. Electroporation therapy in head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 2003; 123 : 264–8.
- Byrne CM, Thompson JF, Johnston H, et al. Treatment of metastatic melanoma using electroporation therapy with bleomycin (electrochemotherapy). *Melanoma Res* 2005; 15 : 45–51.
- Čemažar M, Golzio M, Serša G, Rols MP, Teissie J. Electrically-assisted nucleic acids delivery to tissues in vivo: Where do we stand? *Curr Pharm Design* 2006; 12 : 3817–25.
- Davalos R, Mir LM, Rubinsky B. Tissue ablation with reversible electroporation. *Ann Biomed Eng* 2005; 33(2) : 223–231.
- Denet A-R, Pr  at V. Transdermal delivery of timolol by electroporation through human skin. *J Control Release* 2003; 88 : 253–262.
- Garbay J, Billard V, Bernat C, Mir LM, Morsli N, Robert C. Successful repetitive treatments by electrochemotherapy of multiple unresectable Kaposi sarcoma nodules. *Eur J Cancer Suppl* 2006; 4 : 29–31.
- Gehl J, Sorensen TH, Nielsen K, Reskmark P, Nielsen SL, Skovsgaard T, Mir LM. In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1428 : 233–240.
- Gehl J, Geertsens PF. Efficient palliation of hemorrhaging malignant melanoma skin metastasis by electrochemotherapy. *Melanoma Res* 2000; 10 : 585–9.
- Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiologica Scand* 2003; 177 : 437–447.
- Gothelf A, Mir LM, J. Mir. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treatment Rev* 2003; 29 : 371–87.
- Heller R, Jaroszeski MJ, Reintgen DS, Puleo CA, DeConti RC, Gilbert R, Glass LF. Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin. *Cancer* 1998; 83 : 148–157.
- Marty M, Serša G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M 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.
- 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) : 733–753.
- Miklavčič D, Čorović S, Pucihar G, Pavšelj N. Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy. *Eur J Cancer Suppl* 2006; 4 : 45–51.
- Miklavčič D, Pucihar G, Pavlovec M, Ribarič S, Mali M, Maček-Lebar A, Petkovšek M, Nastran J, Kranjc S, Čemažar M, Serša G. 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 : 121–128.
- Miklavčič D, Šemrov D, Mekid H, Mir LM. 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.
- Miklavčič D, Kotnik T. Electroporation for Electrochemotherapy and Gene Therapy. *Bioelectromagnetic Medicine, Marcel Dekker, New York* 2004; 637–656.
- Mir LM, Banoun H, Paoletti C. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electropermeabilization: Direct access to the cytosol. *Exp Cell Res* 1988; 175 : 15–25.
- Mir LM, Glass LF, Serša G, Teissie J, Domenge C, Miklavčič D et al., Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1998; 77 : 2336–2342. OK
- Mir LM, Orlowski S, Belehradek J, Paoletti C. Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 1991; 27(1) : 68–72.
- Mir LM, Tounetki O, Orlowski S. Bleomycin: revival of an old drug. *General Pharmacol* 1996; 27 : 745–748.
- Mir LM, Gehl J, Serša G et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy : Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or lo-

cally and electric pulses delivered by Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *Eur J Cancer Suppl* 2006; 4 : 14–25.

Neumann E, Sowers A E, Jordan C A. *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. Plenum Press, New York 1989.

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 : 1319–1321.

Orlowski S, Belehradek Jr J, Paoletti C, Mir LM. Transient electroporation of cells in culture. Increase in the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem Pharmacol* 1998; 37 : 4724–33.

Parker AL, Newman C, Briggs S, Seymour L, Sheridan PJ. Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2003; 5: 1–15. OK

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) : 605–612

Pavlovic I, Miklavcic D. Web-based electronic data collection system to support electrochemotherapy clinical trial. *IEEE Trans. Inform. Tech. Biomed.* 11 : 222–230, 2007.

Pavšelj N, Bregar Z, Cukjati D, Batiuskaite D, Mir LM, Miklavčič D. The course of tissue permeabilization studied on a mathematical model of a subcutaneous tumor in small animals. *IEEE Trans Biomed Eng* 2005; 52 : 1373–1381.

Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(2) : 115–124.

Prausnitz MR. A practical assessment of transdermal drug delivery by skin electroporation. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 35 : 61–76.

Prausnitz MR. Reversible skin permeabilization for transdermal delivery of macromolecules. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1997; 14(4) : 455–483.

Prausnitz MR. The effects of electric current applied to skin: A review for transdermal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1996; 18 : 395–425.

Puc M, Čorović S, Flisar K, Petkovšek M, Nastran J, Miklavčič D. Techniques of signal generation required for electroporation. *Survey of electroporation devices*. *Bioelectrochemistry* 2004; 64 : 113–124.

Šatkauskas S, Andre F, Bureau MF, Scherman D, Miklavčič D, Mir LM. Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of in vivo DNA electrotransfer. *Hum Gene Ther* 2005; 16 : 1194–1201.

Šatkauskas S, Bureau M, Puc M, Mahfoudi A, Scherman D, Miklavčič D, Mir LM. Mechanisms of in vitro DNA electro-

transfer: Respective contributions of cell electroporation and DNA electrophoresis. *Mol Ther* 2002; 5(2) : 133–140.

Šel D, Cukjati D, Batiuskaite D, Slivnik T, Mir LM, Miklavčič D. Sequential finite element model of tissue electroporation. *IEEE Trans Biomed Eng* 2005; 52 : 816–827.

Šemrov D, Miklavčič D. Vsiljeni transmembranski potencial zaradi zunanje električnega polja v odvisnosti od oblike in orientacije ter gostote celic. *Elektrotehniški vestnik* 1995; 62(1) : 35–42.

Serša G, Čemažar M, Miklavčič D, Chaplin DJ. Tumor blood flow modifying effect of electrochemotherapy with bleomycin. *Anticancer Res* 1999; 19(5B) : 4017–22.

Serša G, Čemažar M, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum (II) in mice. *Cancer Res* 1995; 55 : 3450–3455.

Serša G, Čemažar M, Miklavčič D. Tumor blood flow modifying effects of electrochemotherapy: a potential vascular targeted mechanism. *Radiol Oncol* 2003; 37 : 43–8.

Serša G, Štabuc B, Čemažar M, Jančar B, Miklavčič D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: potentiation of local cisplatin antitumor effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *Eur J Cancer* 1998; 34 : 1213–8.

Serša G, Čemažar M, Parkins CS, Chaplin DJ. Tumor blood flow changes induced by application of electric pulses. *Eur J Cancer* 1999; 35 : 672–677.

Serša G, Čemažar M, Rudolf Z. Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients. *Cancer Therapy* 2003; 1 : 133–142.

Serša G, Kržič M, Šentjerc M, Ivanuša T, Beravs K, Kotnik V, Coer A, Swartz HM, Čemažar M. Reduced blood flow and oxygenation in SA-1 tumours after electrochemotherapy with cisplatin. *Br J Cancer* 2002; 87 : 1047–54.

Serša G, Štabuc B, Čemažar M, Miklavčič D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: Clinical experience in malignant melanoma patients. *Clinical Cancer Research* 2000; 6 : 863–867.

Serša G. The state-of-the-art of electrochemotherapy before the ESOPE study; advantages and clinical uses. *Eur J Cancer Suppl* 2006; 4 : 52–59.

Shimizu T, Nikaido T, Gomyo H et al. Electrochemotherapy for digital Chondrosarcoma. *J Orthop Sci* 2003; 8 : 248–51.

Snoj M, Rudolf Z, Čemažar M, Jančar B, Serša G. Successful sphincter-saving treatment of anorectal malignant melanoma with electrochemotherapy, local excision and adjuvant brachytherapy. *Anti-Cancer Drugs* 2005; 16 : 345–348.

Weaver J C, Chimadzhiev Y A. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1996; 41 : 135–60.

WHO Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment, vol. 48. Geneva; 1997. p. 22–7.