

Modeliranje elektroporacije na več ravneh

Janja Dermol-Černe, Damijan Miklavčič

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška 25, 1000 Ljubljana, Slovenija
E-pošta: janja.dermol-cerne@fe.uni-lj.si

Povzetek. Z modeli elektroporacije z enačbami opišemo dogajanje med dovedenimi električnimi pulzi in po njih. Obstajajo številni modeli, ki se med sabo med drugim razlikujejo po tem, katero prostorsko raven opisujejo oz. s kakšnimi podrobnostmi je opisana elektroporacija. Na grobo lahko modele razdelimo na štiri ravni – 1. molekule, atomi in ioni, 2. lipidni dvosloji oz. celične membrane, 3. posamezne celice 4. in tkiva. Čeprav v vsaki izmed naštetih skupin poznamo več modelov, je manj takih, ki povezujejo dogajanje na več ravneh. V članku najprej naredimo pregled obstoječih modelov elektroporacije na več ravneh, nato pa predstavimo naš prispevek k področju. V okviru našega dela smo namreč razvili dva modela na več ravneh. S prvim smo opisali elektroporacijo kože in izračunali spremembo prevodnosti posameznih plasti kože s pomočjo modeliranja nastanka por na celičnih membranah in nastanka lokalnih transportnih območij v roženi plasti. Z drugim pa smo modelirali transport cisplatina v podkožnih tumorjih, pri čemer smo izhajali iz transporta cisplatina prek celične membrane posamezne celice in mikrostrukture tumorja. Ugotovili smo, da lahko z našimi modeli dobro opišemo rezultate, pri čemer izhajamo z ravni posamezne celice, nato pa to dogajanje povežemo z ravnijo tkiv.

Ključne besede: elektroporacija, modeli na več ravneh, transport kemoterapevtika, numerično modeliranje

Multi-scale models electroporation

The electroporation models are used to describe events during and after applying electric pulses based on physical laws. The numerous existing models differ between themselves with respect to their description of the spatial level and the level of details used to describe a particular phenomenon. The models can be roughly divided into 1) molecules, atoms, and ions, 2) lipid bilayers, i.e. cell membranes, 3) single cells, and 4) tissues. Although there are many models available for each of these groups, the multi-scale models to link various phenomena at different spatial scales are but few. The paper presents an overview of the existing multi-scale electroporation models and two developed multi-scale models. One model is used to describe the skin electroporation and to calculate the change in the conductivity of individual skin layers by modeling a formation of the local transport regions in the stratum corneum and of pores on the cell membranes of the lower skin layers. The other model is used to model the transport of cisplatin in a subcutaneous tumor after electroporation. The calculation is based on experimentally determined molecular transport across cell-membrane and microstructure of the tumor, i.e. a volume cell fraction. The models are shown to well describe the results regarding the phenomena at the cell-membrane level and their linking to the tissue level.

Keywords: electroporation, multi-scale model, transport of chemotherapeutics, numerical modeling

1 UVOD

1.1 Kaj je elektroporacija

Elektroporacija je pojav, ko visokonapetostni električni pulzi povečajo prepustnost celične membrane za molekule, ki je po navadi ne morejo prehajati [1]. Elektroporacija je reverzibilna, če si celice po pulzih opomorejo, in ireverzibilna, če je škoda prevelika in celice umrejo [2].

1.2 Kje se uporablja

Elektroporacijo uporabljamo v prehranski industriji [3], biotehnologiji [4], okoljski tehnologiji [5], pri čiščenju vode [6] in v medicini [7], [8]. Področja uporabe v medicini so elektrokemoterapija, netermično odstranjevanje tkiva z ireverzibilno elektroporacijo, genska terapija in vnos zdravilnih učinkovin skozi kožo.

2 MODELIRANJE ELEKTROPORACIJE

Z uporabo matematičnih in fizikalnih zakonov pri modeliranju strnjeno opišemo biološke pojave, omogočimo razumevanje in napovedovanje odziva ter zmanjšamo obseg eksperimentalnega dela. Pri načrtovanju medicinskih posegov elektroporacije z modeliranjem porazdelitve električnega polja napovemo učinkovitost terapij [9], optimiziramo parametre električnih pulzov ter število in postavitev elektrod in razvijamo nove pristope k zdravljenju [10]. Elektroporacijo modeliramo na različnih ravneh: 1.

molekule lipidov, atomi in ioni, 2. lipidni dvosloj oz. celična membrana, 3. celice in 4. tkiva. Trenutno so modeli večinoma omejeni na eno raven, modelov na več ravneh pa je malo.

2.1 Modeli na ravni molekul

Osnovni gradniki celične membrane so fosfolipidi. Obnašanje lipidov in drugih molekul pod vplivom električnega polja lahko ugotavljamo s simulacijami molekularne dinamike [11], [12], ki so zaradi računske zahtevnosti omejene na nekaj tisoč nanosekund in sto molekul lipidov. Raziskave molekularne dinamike predvidevajo, da zaradi električnega polja v lipidnem dvosloju nastanejo hidrofobne pore, ki se razvijejo v hidrofilne pore, pride pa tudi do oksidacije celične membrane in sprememb funkcij membranskih proteinov. Rezultati simulacij molekularne dinamike so bili potrjeni tudi v poskusih, v katerih so ugotovili, da lahko mala interferenčna ribonukleinska kislina (siRNK) v nekaj nanosekundah prečka celično membrano [13].

2.2 Modeli na ravni lipidnih dvoslojev

V polarnem topilu, kot je voda, se lipidi spontano uredijo v lipidni dvosloj. Modele elektroporacije lipidnih dvoslojev lahko razdelimo v dve skupini [14]. V prvi so deterministični elektromehanski (hidrodinamični, elastični, hidroelastični, viskoelastični) modeli, ki dvosloj obravnavajo kot elastično telo in ga opisujejo z zakoni elektrostatične. Druga skupina so stohastični modeli nastanka por. Temeljijo na energijskih enačbah, združuje pa jih enačba Smoluchowskega, ki opiše nastanek in dinamiko razvoja por. Neu in Krassowska sta jo poenostavila in omogočila njen relativno preprosti numerični izračun [15], vendar pa v njej predvidevata, da se velikost por med pulzom ne spreminja. Asimptotski model elektroporacije je torej primeren le za izračune pri kratkih nanosekundnih pulzih, pri daljših pulzih se namreč že širijo. Tudi širjenje por med elektroporacijo lahko modeliramo, a je računsko zahtevnejše, ker za vsako poro posebej rešujemo diferencialno enačbo spremembe premera v vsaki časovni točki [16]. Med energijske modele spada tudi model, ki nastanek por opiše s kinetično shemo prehajanja membrane med prepustnimi in neprepustnimi stanji [17]. Transport majhnih molekul skozi poro lahko opišemo z elektrodifuzijsko enačbo [18].

2.3 Modeli na ravni posameznih celic

Lipidni dvosloj je skupaj z membranskimi proteini osnova za nastanek biološke celice [19]. Biološka celica je v približku električno slabo prevodna membrana (dielektrik), ki je na obeh straneh obdana z elektrolitom (prevodnik). Na ravni celic obstajajo modeli različnih pojavov: vsiljene transmembranske napetosti, nastanka por, transporta, prepustnosti in električne prevodnosti

celične membrane, smrti. Časovna in prostorska dinamika vsiljene transmembranske napetosti sta analitično rešljivi za preproste oblike osamljenih celic [20], [21], na splošno pa zahtevata numeričen izračun [22]. Ko je vsiljena transmembranska napetost znana, lahko opišemo nastanek por [15]. Celice lahko med drugim modeliramo z ekvivalentnim električnim vezjem [23]. Smrt in prepustnost celic v suspenziji lahko opišemo s statističnimi modeli [24]. V literaturi se pojavljajo štirje modeli prepustnosti celične membrane – simetrična in asimetrična sigmoida, Gompertzova krivulja in hiperbolični tangens [24]. Modelov celične smrti je več [25], večinoma izhajajo iz živilske industrije, kjer z njimi napovedujejo učinkovitost uničevanja patogenih organizmov z namenom pasterizacije in sterilizacije hrane. Električno prevodnost in prepustnost celične membrane lahko modeliramo kot dva ločena pojava [17]. Opišemo lahko tudi deformacijo celične membrane skupaj z elektroporacijo med dovajanjem električnih pulzov [26], [27]. Transport molekul v posamezno celico opišemo z elektrodifuzijsko enačbo skozi prepustno membrano [28]. S kinetičnimi shemami lahko poleg transporta molekul v celice opišemo tudi transport v celične organele, vezavo citostatikov na DNK in popravilo DNK ter eliminacijo citostatikov [29].

2.4 Modeli in lastnosti tkiv

Skupek po obliki in funkciji podobnih celic tvori tkivo. Tkivo po navadi modeliramo kot homogeno snov in računamo električno polje v odvisnosti od oblike in števila elektrod, parametrov električnih pulzov ter električnih lastnosti tkiva in sprememb njegove prevodnosti [30], [31]. Za vsak tip tkiva privzamemo s poskusi določeno kritično vrednost električnega polja, pri kateri pride do povečane prepustnosti membrane ali do celične smrti [32]. Z matematičnimi modeli lahko tudi napovemo verjetnost za ireverzibilno elektroporacijo tkiva [33] ali za termične poškodbe zaradi Joulovega segrevanja [34]. Transport snovi po tkivu lahko dobro opišemo s statističnimi modeli, ki ne vključujejo mehanizmov transporta [35], s kinetično shemo elektroporacije [17], [36], s farmakološkim modelom [37], z elektrodifuzijsko enačbo ali z modelom dvojne poroznosti [38].

Zanimiv organ za modeliranje je koža, saj ima izrazito slojevito strukturo. Pri elektroporaciji kože modeli opisujejo električno polje ali transport v koži kot organu iz posameznih homogenih plasti [39]. Električne lastnosti slojev pred elektroporacijo in po njej so večinoma približki, obenem so več slojem pripisane enake lastnosti [40]. Nekaj modelov vključuje tudi nastanek lokalnih transportnih območij [39], [41], a so omejeni le na procese v roženi plasti in ne zajemajo elektroporacije celic v spodnjih slojih kože. Transport molekul skozi roženo plast kože lahko dobro opišemo z Nernst-Planckovo enačbo [42].

2.5 Modeli elektroporacije na več ravneh

Modeli elektroporacije na več ravneh elektroporacijo opisujejo na različnih prostorskih ravneh, ki se med sabo razlikujejo v velikostnih razredih (od nanometrov do centimetrov).

Nekaj modelov povezuje raven molekularne dinamike z ravnijo lipidnih dvoslojev. V [43], [44] so primerjali rezultate spremembe prevodnosti por, pridobljene s simulacijami molekularne dinamike in teoretičnimi modeli, ki sistem opisujejo na podlagi zveznih teorij. Ugotovili so, da je vrednost električne prevodnosti posamezne pore, izračunana z molekularno dinamiko ali zveznimi teorijami, primerljiva. Rezultati kvazistatične analize električnega polja so se dobro ujemali z rezultati molekularne dinamike [45].

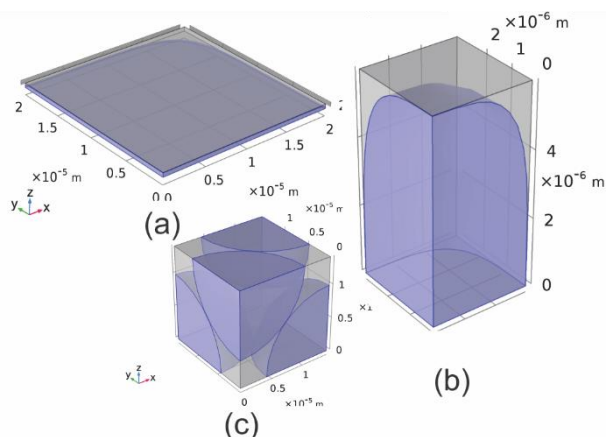
Nekaj modelov povezuje raven lipidnih dvoslojev oz. celičnih membran z ravnijo posameznih celic ali tkiv. Model dvojne poroznosti, ki temelji na difuzijski enačbi, povezuje nastanek por s prepustnostjo celične membrane in omogoča modeliranje transporta med več razdelki, npr. celicami, zunajcelično tekočino in sosednjimi tkivi [38]. Transport ionov skozi celično membrano med pulzi lahko numerično ali z načelom ekvivalence izračunamo iz tokovno-napetostnih meritev prevodnosti celične suspenzije [46].

Več modelov, ki vključujejo tudi geometrijo posameznih celic, povezuje raven posameznih celic z ravnijo tkiva. V dveh dimenzijah lahko presek tkiva vzorčimo s kartezijskimi transportnimi mrežami in s Kirchoffovimi zakoni izračunamo tok, napetost ter električni naboj po celi mreži [47]. Podobno metodo ekvivalentnega vezja so uporabili v literaturi [48], kjer so najprej analizirali učinke elektroporacije na ravni celic, nato pa prek enakovrednih električnih lastnosti celic prešli na tkiva. V dveh dimenzijah odziv tkiva ponazorimo z modeliranjem celic z Voronojevim diagramom in izračunom vsiljene transmembranske napetosti v vsakem poligonu oz. celici [49]. Slabost zgornjih modelov je, da so v dveh dimenzijah, kjer je obnašanje celic drugačno kot v tridimenzionalnih tkivih. V tkivu so celice namreč gosto skupaj, povezane, pride do zastiranja električnega polja in posledično do nižje vsiljene transmembranske napetosti [50], [51], prisotna sta krvni obtok in imunski sistem. Povezavo med celicami in tkivom lahko ponazorimo s tridimenzionalnimi numeričnimi modeli mrež okroglih celic [52]. Simulacije so bile narejene za enako velike, popolnoma okrogle, pravilno razporejene in električno nepovezane celice, obenem pa je bil največji prostorninski delež celic omejen na nižje vrednosti kot v tkivih. Z numeričnim modeliranjem tridimenzionalnih okroglih različno velikih celic, naključno razporejenih po prostoru, lahko opišemo spremembo električne prevodnosti celične membrane in delež prepustnih celic [53]. S tridimenzionalnim modelom skupka posameznih celic različnih oblik so opisali tudi elektroporacijo lista špinače [54].

2.5.1 Mehanistični model električnih lastnosti kože

Elektroporacija vpliva na električno prevodnost celične membrane [55], sloja celic [56] in tkiv [57], kar lahko uporabimo za napoved odziva na zdravljenje z elektroporacijo. Na splošno se med pulzi prevodnost tkiv poveča, saj se poveča prevodnost celičnih membran. Po pulzih pa je sprememba prevodnosti posledica uhajanja ionov iz celic, osmotskega večanja celic, vaskularne okluzije, nastanka edema ter je lahko večja ali manjša kot pred elektroporacijo.

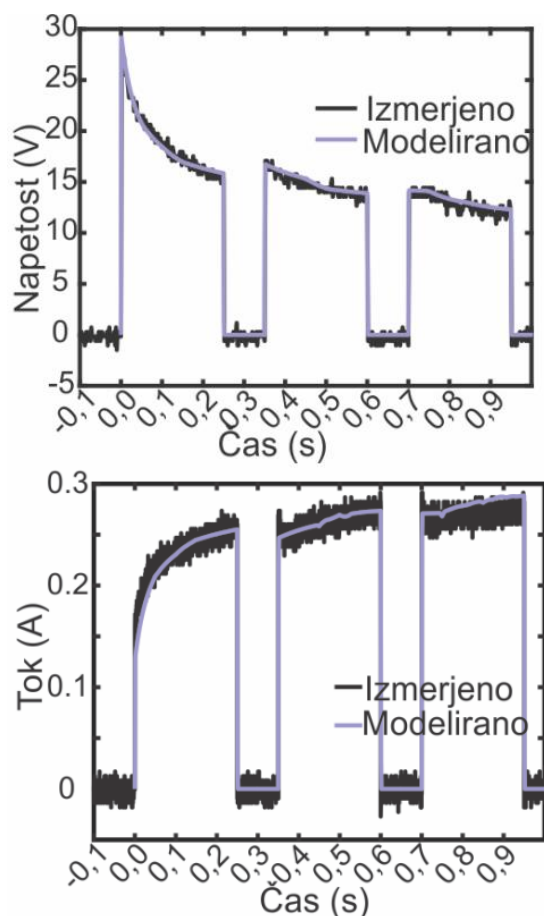
Z metodo končnih elementov smo zgradili numeričen model električnih lastnosti kože med elektroporacijo [58]. Kot model kože pred elektroporacijo smo uporabili že obstoječi model [59], kjer so lastnosti posameznih slojev kože izračunane prek električnih in geometrijskih lastnosti posameznih celic. Električne lastnosti slojev z majhnim prostorninskim deležem celic smo izračunali s Hanai-Bruggemanovo formulo, ki spada med t. i. enačbe mešanja, lastnosti slojev s prostorninskim deležem nad 80 % pa numerično. Geometrija bioloških celic (na sliki 1) je bila opisana s t. i. superformulo [60], s katero lahko opišemo tako rekoč katero koli obliko v naravi. Celični membrani, znotraj- in zunajcelični tekočini ene biološke celice smo pripisali ustrezno električno prevodnost in dielektričnost in celico izpostavili sinusni napetosti različnih frekvenc v vseh treh koordinatnih oseh (x, y, z). Z upoštevanjem admitance smo nato izračunali frekvenčno odvisen kompleksen tenzor električnih lastnosti enotske celice ($\vec{\epsilon}^*$). Posameznim plastem v homogenemu modelu kože smo pripisali izračunane električne lastnosti ene enotske celice in numerične izračune poenostavili na raven homogenih modelov tkiva, kjer so izračuni hitrejši in preprostejši.



Slika 1: Geometrija posameznih gradnikov plasti kože v numeričnem modelu: a) keratinocita, b) korneocita in c) krogel lipidov v papilarnem dermisu, s katerimi smo izračunali ekvivalentne električne lastnosti rožene plasti, epidermisa in papilarnega dermisa. Prikazana je osmina enotske celice, saj so bili zaradi simetrije bioloških celic izračuni lahko narejeni na osmini celic. Povzeto po [58].

Pri elektroporaciji kože pride do dveh pojavov – v vrhni roženi plasti nastanejo lokalna transportna območja ('luknje' s premerom do več sto mikrometrov), na membranah celicah spodnjih plasti pa pore. Zaradi elektroporacije se spremeni električna prevodnost vseh plasti kože, kar lahko opazujemo s tokovno-napetostnimi meritvami. Pri elektroporaciji kože z dolgimi nizkonapetostnimi pulzi se spreminja velikost lokalnih transportnih območij, saj Joulovo segrevanje povzroči topljenje lipidov. Spremembo velikosti lokalnih transportnih območij med nizkonapetostnimi pulzi smo privzeli iz literature [61], kjer so širjenje por izračunali iz termičnega obnašanja lipidov. Obenem smo z asimptotsko enačbo por [62] izračunali gostoto por na celičnih membranah celic spodnjih plasti.

Ugotovili smo, da lahko dobro opišemo elektroporacijo z dolgimi nizkonapetostnimi pulzi, če upoštevamo spremembe prevodnosti posameznih plasti kože. Modelirana in izmerjena [61] tok in napetost vidimo na sliki 2.



Slika 2: Z modelom električnih lastnosti kože smo opisali tokovno-napetostne meritve pri elektroporaciji kože z dolgimi nizkonapetostnimi pulzi. Povzeto po [58].

Naš model je primer večnivojskega modela, ki je povezal procese, ki se med elektroporacijo dogajajo na ravni celic (nastanek por v celični membrani), plasti v koži (nastanek lokalnih transportnih območij v roženi plasti), s tkivi (plasti kože) in celo organom (koža). Zgradili smo

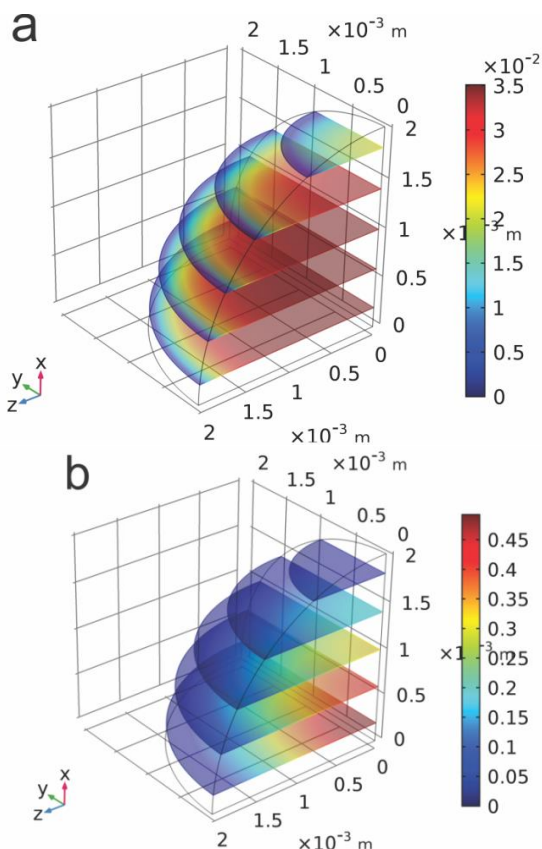
torej ne le večnivojski model elektroporacije kože, temveč smo v model vključili mehanizme elektroporacije. Mogoči nadgradnji modela sta merjenje in določitev časovne odvisnosti števila lokalnih transportnih območij v koži ter njihove velikosti in električne prevodnosti, saj so vrednosti teh parametrov trenutno le ocenjene. Podoben model bi lahko zgradili še za druga tkiva, ki jih pogosto zdravimo z elektroporacijo, npr. jetra ali mišice.

2.5.2 Mehanistični model transporta kemoterapevtika v celice in po tkivih

Transport zaradi elektroporacije prek celične membrane je posledica treh mehanizmov: difuzije [28], elektroforeze [63] in endocitoze [64], na ravni tkiva sta prisotna difuzija in konvekcijski transport po intersticijskem prostoru, k transportu pa prispeva še limfni sistem. Znotraj tumorjev je transport v primerjavi z drugimi tkivi dodatno otežen, saj imajo tumorji abnormalno ožilje, povišan intersticijski tlak, ki pripomore k izpiranju zdravil iz tumorjev, in okvarjen limfni sistem [65]. Pri zdravljenju tumorjev z elektrokemoterapijo je pomembno, da je na tumorju vzpostavljeno dovolj visoko električno polje [66], obenem pa mora v celice priti dovolj molekul kemoterapevtika, da zagotovimo celično smrt [67]. Pri načrtovanju posegov je torej poleg porazdelitve električnega polja smiselno modelirati tudi transport kemoterapevtika. Trenutno pri načrtovanju posegov in napovedovanju uspešnosti zdravljenja upoštevamo le izračun električnega polja, ne pa tudi transporta kemoterapevtika v tumorske celice, kar lahko pripelje do precenitve učinkovitosti zdravljenja.

S ciljem, da bi upoštevali transport kemoterapevtika pri načrtovanju posegov elektrokemoterapije, smo zasnovali naslednji model. Zgradili smo numeričen model tumorja [68], kjer smo z modelom dvojne poroznosti [38] izračunali koeficient prepustnosti celične membrane v odvisnosti od parametrov električnega polja. V numeričnem modelu tumorja smo s koeficientom prepustnosti izračunali transport po tumorju pri elektrokemoterapiji ter rezultate modela primerjali z meritvami znotrajcelične mase kemoterapevtika cisplatina v podkožnih tumorjih na miših. Upoštevali smo tudi, da je v tkivu zaradi bližine celic, visokega volumskega deleža celic ter prisotnosti celičnega matriksa za transport na voljo manjša površina membrane. Ugotovili smo, da se rezultati modela dobro ujemajo z meritvami. Prostorska koncentracija kemoterapevtika v tumorju eno uro po dovedenih električnih pulzih je nehomogena (slika 3), kar lahko vpliva na učinkovitost zdravljenja, če je v določenem delu tumorja koncentracija prenizka. Naš model ponuja korak naprej pri modeliranju transporta po elektroporaciji tkiv, upoštevajoč transport na ravni ene celice. S tem modelom bi lahko zmanjšali število poskusov ter napovedali ali izboljšali učinkovitost zdravljenja pri elektrokemoterapiji. Z modeli transporta

kemoterapevtikov po tumorju bi lahko parametre zdravljenja optimizirali tako, da bi dosegli želeno znotrajcelično koncentracijo cisplatina oz. točno število molekul v posameznih celicah. Mogoči nadgradnji modela sta vključitev konvekcijskega transporta v tumorju in modeliranje začetne porazdelitve cisplatina po intratumorski injekciji, za izboljšanje natančnosti modela pa bi potrebovali še natančne meritve prostorske porazdelitve cisplatina v tumorjih pred elektroporacijo in po njej ter meritve hitrosti vezave cisplatina na druge netačne molekule.



Slika 3: Izračunana porazdelitev a) znotrajcelične in b) zunajcelične koncentracije cisplatina v tumorju v mol/m³. Koncentracija obeh je najvišja v sredini tumorja, saj je bil cisplatin doveden intratumorsko, nato pa postopoma upada do roba tumorja. Zaradi simetrije problema smo lahko modelirali le osmino tumorja. Povzeto po [68].

3 SKLEP

Modele elektroporacije uporabljamo za opis in preverjanje svojega znanja ter razumevanja pojava, zmanjševanje števila potrebnih poskusov, povečanje učinkovitosti terapij ter njihovo optimizacijo in načrtovanje. Ker modeli omogočajo strnjen opis elektroporacije, je smiselno dopolnjevati in nadgrajevati obstoječe ter razvijati nove. Osnova za dobre modele so dobre meritve, zato je v prihodnosti treba izboljšati obstoječe meritve, povečati njihovo število in načrtovati nove. Eden od problemov obstoječih modelov

elektroporacije je namreč ravno pomanjkanje meritev. Nekateri obstoječi modeli so izjemno kompleksni, vrednosti njihovih parametrov so večinoma le ocenjene na velikostni razred. Z optimizacijo parametrov modelov lahko torej najdemo več lokalnih minimumov, ne pa nujno globalnega.

ZAHVALA

Raziskave je podprla Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) v okviru programov P2-0249 in IP-0510. Raziskave so bile izvedene v okviru Evropskega laboratorija za aplikacije pulznih električnih polj v biologiji in medicini (LEA EBAM). Avtorja se za pomoč in ideje pri nastanku opisanega dela zahvaljujeta dr. S. Huclovi, dr. L. Rems in dr. M. Reberšku.

LITERATURA

[1] T. Kotnik, L. Rems, M. Tarek in D. Miklavčič, „Membrane Electroporation and Electroporability: Mechanisms and Models“, *Annual Review of Biophysics*, let. 48, 2019.

[2] C. Jiang, R. V. Davalos in J. C. Bischof, „A Review of Basic to Clinical Studies of Irreversible Electroporation Therapy“, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, let. 62, št. 1, str. 4–20, jan. 2015.

[3] S. Toepfl, C. Siemer, G. Saldaña-Navarro in V. Heinz, „Overview of Pulsed Electric Fields Processing for Food“, v *Emerging Technologies for Food Processing*, Elsevier, 2014, str. 93–114.

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

[5] A. Golberg in sod., „Energy-efficient biomass processing with pulsed electric fields for bioeconomy and sustainable development“, *Biotechnology for Biofuels*, let. 9, št. 1, dec. 2016.

[6] M. H. Dryzer in sod., „Electroporability of nematode eggs for parasite deactivation“, *Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development*, let. 9, št. 1, str. 49–55, mar. 2019.

[7] M. L. Yarmush, A. Golberg, G. Serša, T. Kotnik in D. Miklavčič, „Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges“, *Annual Review of Biomedical Engineering*, let. 16, št. 1, str. 295–320, jul. 2014.

[8] L. G. Campana in sod., „Electrochemotherapy - Emerging applications technical advances, new indications, combined approaches, and multi-institutional collaboration“, *Eur J Surg Oncol*, let. 45, št. 2, str. 92–102, 2019.

[9] D. Pavliha, B. Kos, A. Županič, M. Marčan, G. Serša in D. Miklavčič, „Patient-specific treatment planning of electrochemotherapy: Procedure design and possible pitfalls“, *Bioelectrochemistry*, let. 87, str. 265–273, 2012.

[10] H. Cindrič, B. Kos, G. Tedesco, M. Cadossi, A. Gasbarrini in D. Miklavčič, „Electrochemotherapy of Spinal Metastases Using Transpedicular Approach—A Numerical Feasibility Study“, *Technology in Cancer Research & Treatment*, let. 17, str. 153303461877025, jan. 2018.

[11] L. Delemotte in M. Tarek, „Molecular dynamics simulations of lipid membrane electroporation“, *J. Membr. Biol.*, let. 245, št. 9, str. 531–543, sep. 2012.

[12] P. Kramar, D. Miklavcic in A. M. Lebar, „Determination of the lipid bilayer breakdown voltage by means of linear rising signal“, *Bioelectrochemistry*, let. 70, št. 1, str. 23–27, jan. 2007.

[13] M. Breton, L. Delemotte, A. Silve, L. M. Mir in M. Tarek, „Transport of siRNA through Lipid Membranes Driven by Nanosecond Electric Pulses: An Experimental and Computational Study“, *Journal of the American Chemical Society*, let. 134, št. 34, str. 13938–13941, avg. 2012.

[14] C. Chen, S. W. Smye, M. P. Robinson in J. A. Evans, „Membrane electroporation theories: a review“, *Medical & Biological Engineering & Computing*, let. 44, št. 1–2, str. 5–14, mar. 2006.

- [15] J. C. Neu in W. Krassowska, „Asymptotic model of electroporation“, *Physical Review E*, let. 59, št. 3, str. 3471–3482, mar. 1999.
- [16] L. Rems in D. Miklavčič, „Različni modeli elektroporacije in transporta molekul prek celične membrane“, *Elektrotehniški vestnik*, let. 81, št. 1–2, str. 64–72, 2014.
- [17] D. Miklavčič in L. Towhidi, „Numerical study of the electroporation pulse shape effect on molecular uptake of biological cells“, *Radiology and Oncology*, let. 44, št. 1, jan. 2010.
- [18] J. Li in H. Lin, „Numerical simulation of molecular uptake via electroporation“, *Bioelectrochemistry*, let. 82, št. 1, str. 10–21, avg. 2011.
- [19] T. Kotnik, D. Miklavčič, T. Bajd, U. Lamprecht Tratar in T. Jarm, *Biološki sistemi*. Ljubljana: Fakulteta za elektrotehniko, 2016.
- [20] T. Kotnik, D. Miklavčič in T. Slivnik, „Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields—a method for theoretical analysis and its application“, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, let. 45, št. 1, str. 3–16, mar. 1998.
- [21] T. Kotnik in D. Miklavčič, „Analytical Description of Transmembrane Voltage Induced by Electric Fields on Spheroidal Cells“, *Biophysical Journal*, let. 79, št. 2, str. 670–679, avg. 2000.
- [22] G. Pucihar, T. Kotnik, B. Valič in D. Miklavčič, „Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells“, *Annals of Biomedical Engineering*, let. 34, št. 4, str. 642–652, 2006.
- [23] T. R. Gowrishankar in J. C. Weaver, „An approach to electrical modeling of single and multiple cells“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, let. 100, št. 6, str. 3203–3208, mar. 2003.
- [24] J. Dermol in D. Miklavčič, „Predicting electroporation of cells in an inhomogeneous electric field based on mathematical modeling and experimental CHO-cell permeabilization to propidium iodide determination“, *Bioelectrochemistry*, let. 100, str. 52–61, dec. 2014.
- [25] J. Dermol in D. Miklavčič, „Mathematical Models Describing Cell Death Due to Electroporation“, v *Handbook of Electroporation*, D. Miklavčič, Ur. Cham: Springer International Publishing, 2016, str. 1–20.
- [26] D. Shamon in *sod.*, „Assessing the electro-deformation and electro-poration of biological cells using a three-dimensional finite element model“, *Applied Physics Letters*, let. 114, št. 6, str. 063701, feb. 2019.
- [27] E. Goldberg, C. Suárez, M. Alfonso, J. Marchese, A. Soba in G. Marshall, „Cell membrane electroporation modeling: A multiphysics approach“, *Bioelectrochemistry*, let. 124, str. 28–39, dec. 2018.
- [28] G. Pucihar, T. Kotnik, D. Miklavčič in J. Teissié, „Kinetics of Transmembrane Transport of Small Molecules into Electroporated Cells“, *Biophysical Journal*, let. 95, št. 6, str. 2837–2848, sep. 2008.
- [29] P. D. Sadowitz in *sod.*, „Kinetics of cisplatin binding to cellular DNA and modulations by thiol-blocking agents and thiol drugs“, *Drug Metab. Dispos.*, let. 30, št. 2, str. 183–190, feb. 2002.
- [30] S. Čorović, I. Lacković, P. Šuštarčič, T. Šuštar, T. Rodič in D. Miklavčič, „Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation“, *BioMedical Engineering OnLine*, let. 12, št. 1, str. 16, 2013.
- [31] D. Miklavčič, K. Beravs, D. Šemrov, M. Čemažar, F. Demšar in G. Serša, „The Importance of Electric Field Distribution for Effective in Vivo Electroporation of Tissues“, *Biophysical Journal*, let. 74, št. 5, str. 2152–2158, maj 1998.
- [32] D. Šel, D. Cukjati, D. Batiuskaite, T. Slivnik, L. M. Mir in D. Miklavčič, „Sequential Finite Element Model of Tissue Electroporation“, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, let. 52, št. 5, str. 816–827, maj 2005.
- [33] M. Kranjc, S. Kranjc, F. Bajd, G. Serša, I. Serša in D. Miklavčič, „Predicting irreversible electroporation-induced tissue damage by means of magnetic resonance electrical impedance tomography“, *Sci Rep*, let. 7, št. 1, str. 10323, sep. 2017.
- [34] A. Županič in D. Miklavčič, „Tissue heating during tumor ablation with irreversible electroporation“, *Elektrotehniški vestnik, English Edition*, let. 78, št. 1–2, str. 42–47, 2011.
- [35] P. J. Canatella in M. R. Prausnitz, „Prediction and optimization of gene transfection and drug delivery by electroporation“, *Gene Ther.*, let. 8, št. 19, str. 1464–1469, okt. 2001.
- [36] E. Neumann, K. Toensing, S. Kakorin, P. Budde in J. Frey, „Mechanism of electroporative dye uptake by mouse B cells“, *Biophys. J.*, let. 74, št. 1, str. 98–108, jan. 1998.
- [37] M. Puc, T. Kotnik, L. M. Mir in D. Miklavčič, „Quantitative model of small molecules uptake after in vitro cell electroporation“, *Bioelectrochemistry*, let. 60, št. 1–2, str. 1–10, avg. 2003.
- [38] S. Mahnič-Kalamiza, D. Miklavčič in E. Vorobiev, „Dual-porosity model of solute diffusion in biological tissue modified by electroporation“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, let. 1838, št. 7, str. 1950–1966, jul. 2014.
- [39] N. Pavšelj in D. Miklavčič, „Numerical Models of Skin Electroporation Taking Into Account Conductivity Changes and the Presence of Local Transport Regions“, *IEEE Transactions on Plasma Science*, let. 36, št. 4, str. 1650–1658, avg. 2008.
- [40] N. Pavšelj, V. Prát in D. Miklavčič, „A Numerical Model of Skin Electroporation Based on In Vivo Experiments“, *Annals of Biomedical Engineering*, let. 35, št. 12, str. 2138–2144, nov. 2007.
- [41] S. Becker, „Transport modeling of skin electroporation and the thermal behavior of the stratum corneum“, *International Journal of Thermal Sciences*, let. 54, str. 48–61, apr. 2012.
- [42] U. Pliquett, „Mechanistic studies of molecular transdermal transport due to skin electroporation“, *Advanced Drug Delivery Reviews*, let. 35, št. 1, str. 41–60, jan. 1999.
- [43] M. Casciola, M. A. Kasimova, L. Rems, S. Zullino, F. Apollonio in M. Tarek, „Properties of lipid electropores I: Molecular dynamics simulations of stabilized pores by constant charge imbalance“, *Bioelectrochemistry*, let. 109, str. 108–116, jun. 2016.
- [44] L. Rems, M. Tarek, M. Casciola in D. Miklavčič, „Properties of lipid electropores II: Comparison of continuum-level modeling of pore conductance to molecular dynamics simulations“, *Bioelectrochemistry*, let. 112, str. 112–124, dec. 2016.
- [45] S. Kohler in *sod.*, „Electrical Analysis of Cell Membrane Poration by an Intense Nanosecond Pulsed Electric Field Using an Atomistic-to-Continuum Method“, *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, let. 63, št. 6, str. 2032–2040, jun. 2015.
- [46] M. Pavlin in D. Miklavčič, „Effective conductivity of a suspension of permeabilized cells: a theoretical analysis“, *Biophys. J.*, let. 85, št. 2, str. 719–729, avg. 2003.
- [47] D. A. Stewart Jr., T. R. Gowrishankar, K. C. Smith in J. C. Weaver, „Cylindrical Cell Membranes in Uniform Applied Electric Fields: Validation of a Transport Lattice Method“, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, let. 52, št. 10, str. 1643–1653, okt. 2005.
- [48] A. Ramos, „Effect of the electroporation in the field calculation in biological tissues“, *Artif Organs*, let. 29, št. 6, str. 510–513, jun. 2005.
- [49] R. P. Joshi, A. Mishra in K. H. Schoenbach, „Model Assessment of Cell Membrane Breakdown in Clusters and Tissues Under High-Intensity Electric Pulsing“, *IEEE Transactions on Plasma Science*, let. 36, št. 4, str. 1680–1688, avg. 2008.
- [50] M. Pavlin in D. Miklavčič, „The Effective Conductivity and the Induced Transmembrane Potential in Dense Cell System Exposed to DC and AC Electric Fields“, *IEEE Transactions on Plasma Science*, let. 37, št. 1, str. 99–106, jan. 2009.
- [51] R. Susil, D. Šemrov in D. Miklavčič, „Electric field induced transmembrane potential depends on cell density and organization“, *Electro- and Magnetobiology*, let. 17, št. 3, str. 391–399, 1998.
- [52] A. Ramos, „Improved numerical approach for electrical modeling of biological cell clusters“, *Medical & Biological Engineering & Computing*, let. 48, št. 4, str. 311–319, apr. 2010.
- [53] M. Essone Mezeme, G. Pucihar, M. Pavlin, C. Brosseau in D. Miklavčič, „A numerical analysis of multicellular environment for modeling tissue electroporation“, *Applied Physics Letters*, let. 100, št. 14, str. 143701, 2012.
- [54] K. Dymek, L. Rems, B. Zorec, P. Dejmeč, F. G. Galindo in D. Miklavčič, „Modeling electroporation of the non-treated and vacuum impregnated heterogeneous tissue of spinach leaves“, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, let. 29, str. 55–64, maj 2015.
- [55] M. Pavlin in *sod.*, „Effect of Cell Electroporation on the Conductivity of a Cell Suspension“, *Biophysical Journal*, let. 88, št. 6, str. 4378–4390, jun. 2005.
- [56] T. García-Sánchez, A. Azan, I. Leray, J. Rosell-Ferrer, R. Bragós in L. M. Mir, „Interpulse multifrequency electrical impedance measurements during electroporation of adherent differentiated myotubes“, *Bioelectrochemistry*, let. 105, str. 123–135, okt. 2015.

- [57] A. Ivorra, B. Al-Sakere, B. Rubinsky in L. M. Mir, „In vivo electrical conductivity measurements during and after tumor electroporation: conductivity changes reflect the treatment outcome“, *Physics in Medicine and Biology*, let. 54, št. 19, str. 5949–5963, okt. 2009.
- [58] J. Dermol-Černe in D. Miklavčič, „From Cell to Tissue Properties—Modeling Skin Electroporation With Pore and Local Transport Region Formation“, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, let. 65, št. 2, str. 458–468, feb. 2018.
- [59] S. Huclova, D. Erni in J. Fröhlich, „Modelling and validation of dielectric properties of human skin in the MHz region focusing on skin layer morphology and material composition“, *Journal of Physics D: Applied Physics*, let. 45, št. 2, str. 025301, jan. 2012.
- [60] J. Gielis, „A generic geometric transformation that unifies a wide range of natural and abstract shapes“, *American Journal of Botany*, let. 90, št. 3, str. 333–338, mar. 2003.
- [61] B. Zorec, S. Becker, M. Reberšek, D. Miklavčič in N. Pavšelj, „Skin electroporation for transdermal drug delivery: The influence of the order of different square wave electric pulses“, *International Journal of Pharmaceutics*, let. 457, št. 1, str. 214–223, nov. 2013.
- [62] K. A. DeBruin in W. Krassowska, „Modeling Electroporation in a Single Cell. I. Effects of Field Strength and Rest Potential“, *Biophysical Journal*, let. 77, št. 3, str. 1213–1224, sep. 1999.
- [63] M. M. Sadik, J. Li, J. W. Shan, D. I. Shreiber in H. Lin, „Quantification of propidium iodide delivery using millisecond electric pulses: experiments“, *Biochim. Biophys. Acta*, let. 1828, št. 4, str. 1322–1328, apr. 2013.
- [64] M. P. Rols, P. Femenia in J. Teissié, „Long-Lived Macropinocytosis Takes Place in Electroporabilized Mammalian Cells“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, let. 208, št. 1, str. 26–35, mar. 1995.
- [65] A. I. Minchinton in I. F. Tannock, „Drug penetration in solid tumours“, *Nature Reviews Cancer*, let. 6, št. 8, str. 583–592, avg. 2006.
- [66] D. Miklavčič, S. Čorović, G. Pucihar in N. Pavšelj, „Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy“, *European Journal of Cancer Supplements*, let. 4, št. 11, str. 45–51, 2006.
- [67] O. Tounekti, G. Pron, J. Belehradek in L. M. Mir, „Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized“, *Cancer Res.*, let. 53, št. 22, str. 5462–5469, nov. 1993.
- [68] J. Dermol-Černe, J. Vidmar, J. Ščančar, K. Uršič, G. Serša in D. Miklavčič, „Connecting the in vitro and in vivo experiments in electrochemotherapy - a feasibility study modeling cisplatin transport in mouse melanoma using the dual-porosity model“, *J Control Release*, let. 286, str. 33–45, sep. 2018.

Janja Dermol-Černe je doktorirala leta 2018 na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani in je zdaj zaposlena v Laboratoriju za biokibernetiko. Raziskovalno se ukvarja z numeričnim modeliranjem učinka elektromagnetnih polj na biološke sisteme s poudarkom na dogajanju med elektroporacijo.

Damijan Miklavčič je doktoriral leta 1993 na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, kjer je trenutno zaposlen kot redni profesor in predstojnik Laboratorija za biokibernetiko. Njegovo raziskovalno delo je v zadnjih letih povezano s prenosom genov in zdravilnih učinkovin pri zdravljenju raka z elektroporacijo, razvojem strojne opreme in numeričnim modeliranjem bioloških procesov.