

VLOGA ELEKTROPORACIJE PRI PRIPRAVI ZDRAVIL ZA NAPREDNO ZDRAVLJENJE

THE ROLE OF ELECTROPORATION FOR THE PREPARATION OF ADVANCED THERAPY MEDICINAL PRODUCTS

AVTORICI / AUTHORS:

znanst. sod. dr. Maša Kandušer, univ. dipl. biol.
prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Inštitut za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: masa.kanduser@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Napredek znanosti na področju biomedicine omogoča razvoj zdravil za napredno zdravljenje z gensko, celično in tkivno terapijo, ki temelji na vnosu rekombinantnih genov, uporabi modificiranih somatskih celic ali pa je namenjena obnovi, nadomestitvi ali regeneraciji tkiva. Za pripravo izdelkov za napredne terapije lahko uporabimo elektroporacijo, ki jo dosežemo tako, da celice izpostavimo kratkim visokopetostnim električnim pulzom. Rezultat elektroporacije je začasna reverzibilna ali trajna ireverzibilna permeabilizacija celične membrane. Reverzibilno elektroporacijo uporabljamo za elektrokemoterapijo, gensko elektrotransfekcijo in za elektrofuzijo celic. Ireverzibilno elektroporacijo pa uporabljamo za netermalno ablacijo tkiv in odstranjevanje celične vsebine. Za uspešno uporabo elektroporacije je potrebno poznati osnovne mehanizme elektroporacije in ključne parametre, ki določajo uspešnost metode. Zdravila za napredno zdravljenje lahko pripravimo z reverzibilno elektroporacijo, ki jo uporabimo za gensko, celično in tkivno terapijo ter za pripravo nekaterih celičnih cepiv na osnovi imunohibridomov, ki jih pripravimo z elektrofuzijo. Ireverzibilno elektroporacijo lahko uporabimo za pripravo biokompatibilnih opor v tkivni terapiji.

KLJUČNE BESEDE:

zdravila za napredno zdravljenje, elektrofuzija, elektrogenska transfekcija

ABSTRACT

Advances in biomedicine enhanced the development of advanced therapy medicinal products for gene, cell and tissue therapy, based on recombinant gene delivery, modified somatic cells or are used for restoring, replacing or regenerating of tissues. Electroporation is suitable to prepare products for advanced therapies. Electroporation is achieved when we expose cells to short, high-voltage electric pulses that cause temporary, reversible, or permanent, irreversible permeabilization of the cell membrane. Reversible electroporation is used for electrochemotherapy, gene electrotransfection and for electrofusion. Irreversible electroporation is used for non-thermal tissue ablation and for extraction of the cellular contents. For successful use of electro-



poration, we need to understand the mechanisms and parameters that affect the outcome. For the development of advance therapy medicinal products reversible electroporation can be used for gene, cell and tissue therapy and for cell vaccines based on immuno-hybridoma. Irreversible electroporation is suitable for the preparation of biocompatible supports in tissue therapy.

KEY WORDS:

advance therapy medicinal products, electrofusion, electrogene transfer

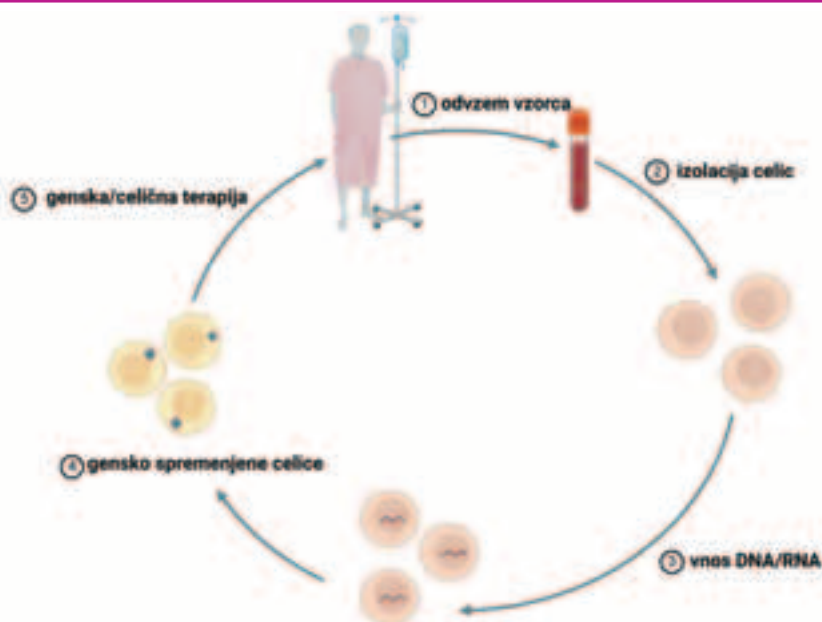
1 UVOD

Napredek na področju medicine, genetike in biotehnologije omogoča razvoj novih načinov zdravljenja bolezni. Med take načine sodijo tudi zdravila za napredno zdravljenje (*advanced therapy medicinal products*, ATMP).

Glede na način delovanja razdelimo terapijo na tri skupine: gensko, ki temelji na vnašanju rekombinantnih genov, celično, ki temelji na uporabi modificiranih ali nemodificiranih somatskih celic, in na tkivno terapijo, ki je namenjena obnovi, nadomestitvi ali regeneraciji tkiva (1, 2).

Priprava zdravil za napredno zdravljenje je dolgotrajen postopek, ki ga sestavlja več različnih faz, med katerimi so ključne: odvzem vzorca periferne krvi, priprava celic in zdravljenje s pripravkom. Za pripravo zdravil za napredno zdravljenje lahko uporabimo celice pacienta (avtologna terapija) ali celice darovalca (alogeno terapija) (1).

Potek priprave zdravila za napredno zdravljenje je prikazan na sliki 1. Najpogosteje pacientu odvzamejo vzorec periferne krvi, izolirajo enojedrne celice (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC), jih z ustreznimi metodami modificirajo in uporabijo za zdravljenje. Biotehnološke metode, ki omogočajo ustrezno modifikacijo celic za pripravo zdravil za napredno zdravljenje v grobem razdelimo na dve skupini: metode virusne transdukcije in fizikalne ali kemične metode transfekcije. Transdukcija temelji na uporabi virusnih vektorjev, med katerimi so za genske in večino celičnih terapij najpogostejši retrovirusni ali lenti-virusni vektorji (3). Za celične terapije z induciranimi plu-



Slika 1: Primer priprave zdravila za napredno zdravljenje *ex vivo* za avtologo gensko ali celično terapijo. Iz vzorca periferne krvi izoliramo enojedrne celice (PBMC), ki jih spremenimo z različnimi virusnimi ali nevirusnimi metodami. V celice vnesemo izbrane rekombinantne gene, da dobimo gensko spremenjene celice, ki jih uporabimo za gensko ali celično terapijo. Slika je bila pripravljena z BioRender.com.

Figure 1: An example of *ex vivo* ATMP preparation for autologous gene or cell therapy. Mononuclear cells are isolated from the peripheral blood sample, which is modified by various viral or non-viral methods. Selected recombinant genes are introduced into cells to obtain genetically modified cells that are used for gene or cell therapy. The image was created with BioRender.com.

ripotentnimi matičnimi celicami (*induced pluripotent stem cells*, iPSC) pa lentivirusne vektorje zamenjuje virus Sendai (4). Zaradi potencialne nevarnosti uporabe virusnih vektorjev razvijajo tudi različne druge metode vnosa nukleinskih kislin v celice.

Med nevirusne metode transfekcije sodi tudi elektroporacija, biofizikalna metoda, ki temelji na uporabi kratkih visokonapetostnih električnih pulzov. Električni pulzi povzročijo strukturne in biokemijske spremembe lipidnega dvosloja celične membrane (5, 6) in omogočijo vnos malih in velikih molekul v celico, zlivanje celic in odstranjevanje celične vsebine. Elektroporacija si je utrla pot v različne biotehnoške aplikacije (5, 7–10) in v klinično prakso (11–14). V onkologiji uporabljajo elektroporacijo za vnos kemoterapevtikov, v postopku, znanem kot elektrokemoterapija (13, 14), ki jo uporabljamo za zdravljenje površinskih tumorjev (11–13, 15). V kliničnem okolju se uveljavlja tudi metoda, ki temelji na odstranjevanju celične vsebine z elektroporacijo, omogoča pa netermalno ablacijo tumorjev, ki jih ne moremo odstraniti kirurško, ker se nahajajo v neposredni bližini vitalnih organov (11, 15–17). Odstranjevanje celične vsebine je primerno tudi za pripravo biokompatibilnih mehanskih opor v tkivni terapiji (16, 18).

Elektroporacijo izvajamo z elektroporatorjem, generatorjem visokonapetostnih električnih pulzov, pomemben pa je tudi izbor elektrod, ki omogočijo ustrezno aplikacijo pulzov na izbrano tkivo. Na tržišču je na voljo več različnih modelov elektroporatorjev in elektrod, ki se razlikujejo po namenu uporabe in omogočajo izbiro različnih električnih pulzov (19). Klinični elektroporatorji za uporabo v medicini morajo ustrezati kriterijem ISO 13485, ki zagotavljajo varnost in kakovost medicinskih naprav (20, 21). Za raziskovalne namene je na voljo več različnih elektroporatorjev, ki se razlikujejo po možnostih nastavljanja elektroporacijskih parametrov in omogočajo uporabo ene ali več različnih vrst elektrod. Elektroporacijski parametri se razlikujejo po obliki, trajanju in številu dovedenih pulzov (20–22). Najpogostejše elektrode so kivete z vgrajenimi elektrodami, ravne kovinske elektrode, žičnate elektrode in različne vrste igelnih elektrod (20). V Sloveniji je bilo razvitih več različnih elektroporatorjev, namenjenih klinični in raziskovalni uporabi (20).

Pogosto za raziskave na področju zdravljenja napredno zdravljenje uporabljamo elektroporatorje, za katere nam ni potrebno poznati elektroporacijskih mehanizmov, ne omogočajo pa optimizacije elektroporacijskih protokolov. Take elektroporatorje tržijo skupaj z elektroporacijskimi mediji, katerih vsebina ni znana (20, 22).

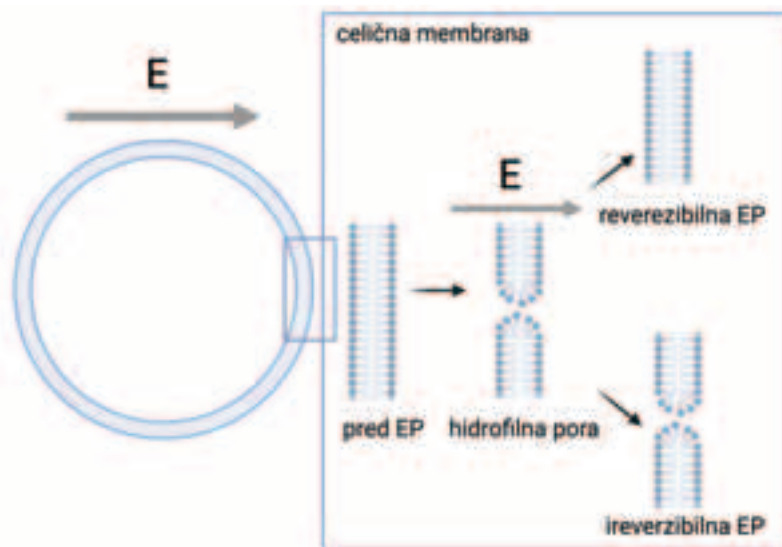
2 OSNOVNI MEHANIZMI ELEKTROPORACIJE IN PARAMETRI, KI VPLIVAJO NA USPEŠNOST METODE

Ko celice izpostavimo kratkim visokonapetostnim električnim pulzom, povečamo prepustnost celične membrane. Zaradi povečane prepustnosti postanejo celice dovzetne za privzem manjših ali večjih molekul, vključno z RNA in DNA. Permeabilizirana celična membrana preide tudi v fuzogeno stanje in omogoči zlivanje celic. Če pred dovajanjem električnih pulzov vzpostavimo stik med celicami, se na stiku permeabilnih struktur začne postopek zlivanja lipidnih dvoslojev, ki vodi do nastanka hibridomov, celic z več jedri.

Ključni dejavnik za nastanek permeabilnih struktur v celični membrani je vsiljena transmembranska napetost (*induced transmembrane voltage*, ITV), ki je posledica zunanjega električnega polja. Vsiljena transmembranska napetost nastane zaradi razlik v električnih lastnostih zunanjega medija in celične membrane. Odvisna je od oblike in velikosti celice ter lastnosti električnih pulzov. Najvišje vrednosti vsiljene transmembranske napetosti nastanejo na polih celice, ki so orientirani v smeri zunanjega električnega polja (7), zato na teh mestih opazimo tudi permeabilizacijo membrane. V lipidnem dvosloju nastanejo najprej hidrofobne pore, ki se ob dovolj visoki inducirani transmembranski napetosti reorientirajo v hidrofilne pore, skozi katere poteka transport molekul med celico in okolico. Poenostavljen potek, ki prikazuje reorientacijo lipidnih molekul, je predstavljen na sliki 2. Električni pulzi povzročijo tudi peroksidacijo lipidov, ki vpliva na nastanek permeabilnih struktur (5, 23).

Ločimo med reverzibilno in ireverzibilno elektroporacijo. Pri obeh je pomembno, da dosežemo kritično transmembransko napetost, ki povzroči strukturne spremembe lipidnega dvosloja (slika 2). Pri reverzibilni elektroporaciji ne smemo preseči vrednosti, ki bi preveč poškodovala celično membrano in povzročila celično smrt. Pri ustrezno izbranih električnih pulzih se po prenehanju delovanja električnega polja elektroporacijske pore zacelijo in celica vzpostavi svoje naravno ravnovesje in fiziološke funkcije. Proces celjenja membrane je odvisen od temperature in vrste celic, pri vseh celicah pa se membrane najhitreje zacelijo pri fiziološki temperaturi (7, 23, 24). Namen ireverzibilne elektroporacije pa je preseči kritično vrednost in preprečiti celjenje membrane. Na ta način lahko odstranjujemo celice iz tkiva ali dostopamo do celične vsebine (7).





Slika 2: Poenostavljen shematski prikaz poteka elektroporacije (EP) celične membrane. Pred dovajanjem električnih pulzov je celična membrana v semipermeabilnem stanju in ima fiziološki transmembranski potencial (TMP), ki znaša med -40 in -70 mV. Posledica izpostavljenosti visokonapetostnim električnim pulzom je vsiljena transmembranska napetost (ITV), ki povzroči strukturne in biokemijske spremembe membranskih lipidov. Če ITV preseže kritično vrednost, pride do reorientacije fosfolipidnih molekul in do nastanka hidrofilnih por, skozi katere poteka transport majhnih in velikih molekul. Elektroporacija je reverzibilna ali ireverzibilna, odvisno od parametrov električnih pulzov in velikosti in občutljivosti celice. Slika je bila pripravljena z BioRender.com

Figure 2: Simplified schematic representation of electroporation on the cell membrane. Before application of electric pulses, the cell membrane is in a semi-permeable state and has a physiological transmembrane potential (TMP) between -40 and -70 mV. The consequence of exposure to high-voltage electric pulses is the induced transmembrane voltage (ITV), which causes structural and biochemical changes in membrane lipids. If ITV exceeds the critical value, the reorientation of phospholipid molecules takes place, and hydrophilic pores are formed enabling transport of small and large molecules. Electroporation is reversible or irreversible, depending on the parameters of electric pulses and the size and sensitivity of the cell. The image was created with BioRender.com

Pomembno je vedeti, da so za različne aplikacije elektroporacije primerni različni električni pulzi (10, 15). Za vnos genov v pogojih *in vivo* uporabljamo tudi kombinacijo visokonapetostnih mikrosekundnih pulzov in nizkonapetostnih milisekundnih pulzov (7, 25). Za ireverzibilno elektroporacijo pa je potrebno z matematičnim modeliranjem določiti primerne parametre, da določimo ustrezen elektroporacijski prag in da se izognemo nepotrebni segrevanju tkiva (16, 17).

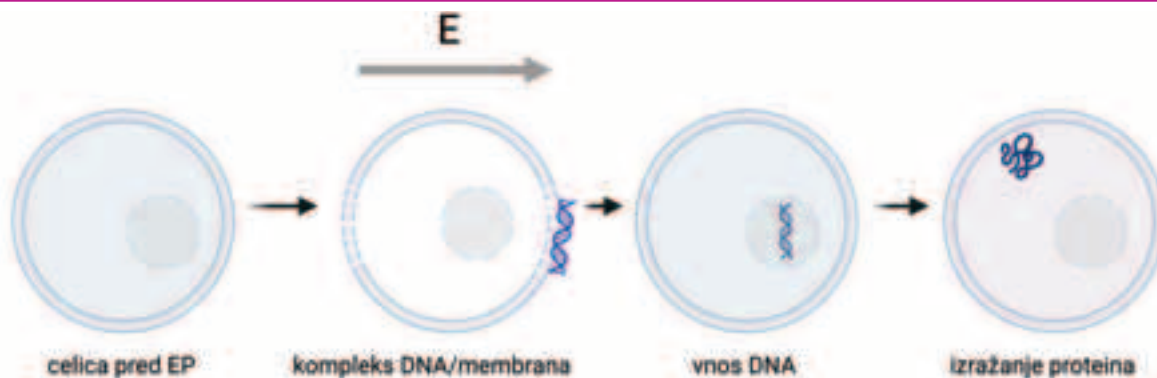
2.1 ELEKTROTRANSFEKCIJA, ELEKTROFUZIJA IN IREVERZIBILNA ELEKTROPORACIJA

Elektroporacijo uporabljamo za gensko, celično ali tkivno terapijo, vendar pri vsaki od terapij uporabimo drugačne parametre. Za vnos rekombinantnih genov in gensko modifikacijo celic uporabljamo električne pulze, ki omogočajo najučinkovitejši vnos genskega materiala, pri pripravi celi-

čnih cepiv na osnovi imunohibridomov uporabimo elektro-fuzijo, za tkivno terapijo pa z ireverzibilno elektroporacijo pripravimo tkivne oporne strukture.

2.2 VNOS NUKLEINSKIH KISLIN

Izraz elektrogenska transfekcija uporabljamo takrat, ko z elektroporacijo v celice ali tkivo vnašamo molekule DNA ali RNA. Za vnos molekul DNA največkrat pripravimo primerne plazmide, ki kodirajo terapevtski protein. Pri elektrogenski transfekciji molekule DNA zaradi svojega negativnega naboja vstopajo v celico pretežno na enem polu permeabilizirane membrane (8, 26–28). Zaradi tega pojava lahko uspešnost vnosa izboljšamo tako, da s primerno frekvenco obračamo smer električnega polja in tako dobimo večjo površino, skozi katero DNA vstopa v celico (27, 28). Raziskave mehanizmov elektrogenske transfekcije so pokazale, da vnos genskega materiala v celico poteka v več fazah. Začne se s permeabilizacijo celične membrane, sledi



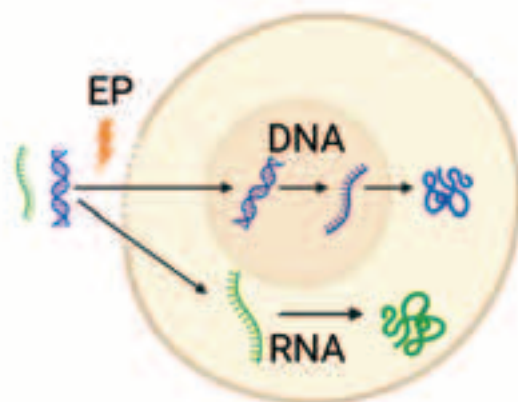
Slika 3: Shematski prikaz vnosa genskega materiala v celico z elektroporacijo. Celico izpostavimo električnim pulzom, ki povzročijo permeabilizacijo celične membrane. Molekula DNA, ki ima negativen naboj, tvori kompleks s permeabilizirano celično membrano. Po reverzibilni elektroporaciji se celična membrana zaceli, DNA vstopi v citoplazmo, preide v jedro in po določenem času se v celici izrazi protein, ki ga kodira vneseni gen. Slika je bila pripravljena z BioRender.com

Figure 3: Schematic representation of the introduction of genetic material into the cell by electroporation. The cell is exposed to electric pulses that cause cell membrane permeabilization. A negatively charged DNA forms a complex with a permeabilized cell membrane. After reversible electroporation the cell membrane reseals, DNA enters the cell, passes into the nucleus and a protein encoded by the introduced gene is expressed in the cell. The image was created with BioRender.com

tvorba kompleksa med DNA in permeabilizirano membrano, nato vstop v celico, transport v jedro in izražanje vnesenega transgena (slika 3). Tvorbo kompleksa lahko izboljšamo tako, da uporabimo kombinacijo visokonapetostnih mikrosekundnih in nizkonapetostnih milisekundnih pulzov, ker nizkonapetostni pulz zaradi elektroforeze omogoči kopičenje DNA na permeabilizirani membrani (25, 26, 29). Kako preide molekula DNA iz kompleksa DNA-membrana v celico, še ni povsem pojasnjeno, možna mehan-

izma pa sta translokacija DNA skozi pore ali z električnimi pulzi stimulirana endocitoza (8). Pot vnesenega genskega materiala v celici je odvisna od vrste molekule. Molekula DNA mora priti v jedro, kjer se vneseni gen prepíše v RNA in nato v funkcionalni protein, molekula RNA pa se že v citoplazmi prepíše v protein (slika 4).

Za uspešno gensko elektrotransfekcijo je potrebno ohraniti čim večji delež živih celic, ker je izražanje vnesenega gena odvisno od stanja celic po elektroporaciji. Pomembno je,



Slika 4: Shematski prikaz razlik med molekulama DNA in RNA, ki smo jih v celico vnesli z elektroporacijo (EP). DNA vstopi v jedro, se prepíše v RNA in nato v protein, RNA pa se v citoplazmi prepíše v protein. Slika je bila pripravljena z BioRender.com

Figure 4: Schematic diagram of the differences between DNA or RNA molecules introduced into the cell by electroporation (EP). DNA must enter the nucleus where it is transcribed into RNA, and then into protein, while RNA is transcribed into a protein in the cytoplasm. The image was created with BioRender.com



da pri izbiri daljših milisekundnih električnih pulzov uporabimo nizkopredvodni elektroporacijski pufer, ki zmanjša Joulovo segrevanje in termične poškodbe celic (17).

2.3 ELEKTROFUZIJA

Elektroporacijo uporabljamo tudi za zlivanje celic z elektrofuuzijo. O celični fuziji govorimo takrat, ko pride do zlivanja dveh ali več celic v celico, ki vsebuje več jeder. Proces zlivanja celic je naravni del razvoja nekaterih tkiv, je pa tudi sestavni del biotehnoloških postopkov za pripravo monoklonskih protiteles ali celičnih cepiv (30). Raziskave mehanizmov elektrofuuzije kažejo, da tudi ta proces poteka v več fazah, pomembno vlogo pa igrajo kakovost celičnega stika (9, 31), permeabilizacija, ki omogoči prehod membrane v fuzogeno stanje (31), in lipidna sestava celične membrane (32). Shematski potek elektrofuuzije je prikazan na sliki 5. Enako kot pri elektrogenski transfekciji je tudi za uspešno elektrofuuzijo pomembno, da fuzijska partnerja, to sta celici v postopku zlivanja, preživita.

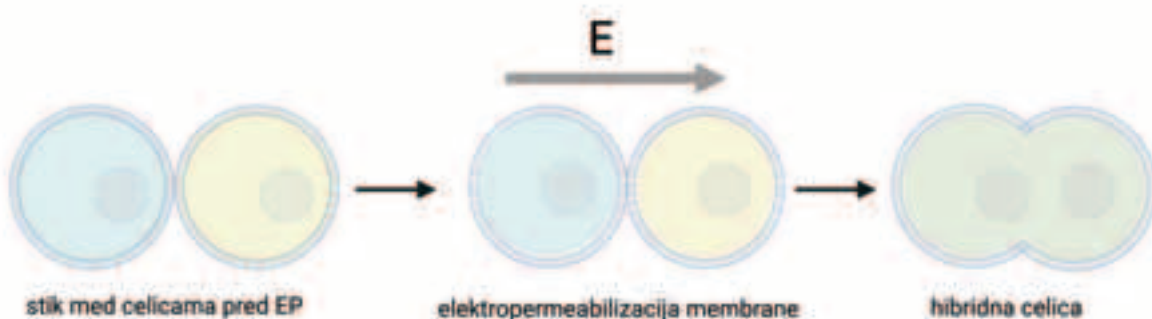
2.4 IREVERZIBILNA ELEKTROPORACIJA

Za razliko od elektrogenske transfekcije in elektrofuuzije, za kateri je ključnega pomena dobro preživetje celic, pa pri ireverzibilni elektroporaciji želimo doseči permeabilizacijo celične membrane, ki bo vodila v celično smrt. V tem primeru morajo izbrani električni pulzi preseči vrednost, pri

kateri bi celica po elektroporaciji lahko zacelila svojo membrano. Leta 2005 so odkrili, da je ireverzibilna elektroporacija primerna metoda za ablacijo mehkih tkiv in takrat si je utrla pot v klinično prakso, uporablja pa se za netermalno ablacijo tumorjev in tkiv (11, 17, 33), za zdravljenje srčnih aritmij (34) in za pripravo tkivnih opor. Pri tej aplikaciji je še bolj pomembno, da uporabimo električne pulze, ki zmanjšajo Joulovo segrevanje na najnižjo možno vrednost. Pri ireverzibilni elektroporaciji je potrebno poznati lastnosti tkiva in z matematičnim modeliranjem določiti električne parametre in geometrijo elektrod (17).

3 UPORABA ELEKTROPORACIJE PRI PRIPRAVI ZDRAVIL ZA NAPREDNO ZDRAVLJENJE

Elektroporacijo uporabljajo za pripravo vseh različic zdravil za napredno zdravljenje. Primerna je kot ne-virusna metoda vnosa genskega materiala v celico v pogojih *ex vivo* ali *in vivo*, za pripravo induciranih pluripotentnih matičnih celic, celičnih cepiv s celično fuzijo ali za pripravo tkivnih opornih struktur *ex vivo*. Večina kliničnih raziskav na tem področju je namenjena zdravljenju raka (10, 35, 36). Za gensko terapijo je značilno vnašanje genov, ki sprožijo profilaktični ali diagnostični učinek. Namenjena je predvsem zdravljenju genskih bolezni, imunoterapiji raka, med pan-



Slika 5: Shematski prikaz elektrofuuzije. Z ustrežno metodo vzpostavimo stik med celicama. Celici izpostavimo električnim pulzom, ki povzročijo permeabilizacijo celične membrane. Permeabilna celična membrana preide v fuzogeno stanje, ki omogoči zlivanje lipidnih dvoslojev sosednjih celic. Sledi tvorba enotne celične membrane, zlivanje citoplazem obeh fuzijskih partnerjev in nastanek hibridne celice. Slika je bila pripravljena z BioRender.com

Figure 5: Schematic diagram of electrofusion. Contact between the cells is established by appropriate method. The cells are exposed to electric pulses that cause cell membrane permeabilization. The permeable cell membrane becomes fusogenic which allows lipid bilayers of adjacent cells to fuse. This is followed by the formation of a single cell membrane, fusion of the cytoplasm of both fusion partners and the formation of a hybrid cell. The image was created with BioRender.com

demijo covid-19 pa so različni proizvajalci razvili tudi cepiva za to infekcijsko bolezen (3).

Pri izdelavi genskih zdravil za napredno zdravljenje je pomembna izbira terapevtskega gena, vektorja in metode vnosa. Elektroporacija je primerna izbira, kadar se želimo izogniti virusnim vektorjem. Gensko terapijo lahko izvedemo na dva načina; terapevtski gen vnesemo *in vivo* ali pa najprej pripravimo gensko modificirane celice *ex vivo* in jih pozneje uporabimo za zdravljenje. Agencije za zdravila v Evropi, ZDA, na Japonskem, v Kanadi, Južni Koreji in drugih državah so v zadnjih 20 letih odobrile več zdravil za napredno zdravljenje, namenjenih genski terapiji (37, 38), za pripravo katerih so proizvajalci največkrat uporabili virusne vektorje (37). Potekajo pa tudi številne klinične raziskave na področju onkologije, pri katerih za vnos genov uporabljajo elektrogensko transfekcijo *in vivo*, metodo pa imenujemo elektrogenska terapija (11–14, 17, 39).

Elektrogensko transfekcijo lahko uporabimo tudi v pogojih *in vitro*, za vnos plazmidne DNA, različnih vrst RNA (mRNA, siRNA), proteinov ali sistema CRISPER/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) v celice (38, 40). Tehnologijo CRISPER/Cas9, ki omogoča urejanje genoma, so preizkusili v kliničnih raziskavah za zdravljenje genetskih bolezni, raka, srčno-žilnih bolezni in fibroze jeter (40). Elektrogenska transfekcija je zanimiva tudi za celično terapijo s somatskimi celicami. Pri celični terapiji pripravimo modificirane celice *ex vivo* in jih pozneje uporabimo za zdravljenje (slika 2). Za imunoterapijo raka uporabljajo gensko modificirane celice CAR-T (*chimeric antigen receptor T-cell*) (3). Metodologijo priprave CAR-T še razvijajo in izboljšujejo, med metodami, s katerimi pripravljajo CAR-T, pa najdemo tudi elektroporacijo (41, 42). Čeprav je manj učinkovita od virusne transdukcije, pa je primerna za proizvodnjo večjih količin CAR-T v pretočnem sistemu, kar je velika prednost za industrijsko proizvodnjo (42).

Na področju celične terapije je elektroporacija zanimiva za pripravo celičnih cepiv, namenjenih imunoterapiji raka. Za celična cepiva največkrat uporabljajo dendritične celice, ki jih gensko modificirajo z različnimi metodami. Dendritične celice imajo pomembno vlogo v imunskem odzivu. Elektroporacijo lahko uporabimo tako za gensko modifikacijo dendritičnih celic (43) kot tudi za elektrofuzijo (9). Z zlivanjem dendritičnih in tumorskih celic bolnika pripravijo imunohidrome, ki združujejo imunostimulatorne lastnosti dendritične celice in celoten spekter antigenov tumorske celice (35, 44) in tako povečajo odziv imunskih celic, ki je ključen za uspešno imunoterapijo raka (35).

Elektroporacija je zanimiva tudi za pripravo induciranih pluripotentnih matičnih celic. Od revolucionarnega odkritja

leta 2006, ko so prvič opisali zmožnost dediferenciacije somatskih celic v pluripotentne matične celice, so te celice postale zanimive za celične in tkivne terapije. Ker so sposobne diferenciacije v celice treh zarodnih plasti, možnost njihove uporabe preizkušajo v različnih kliničnih raziskavah, predvsem na Japonskem in v Združenih državah Amerike (45). Večino pluripotentnih matičnih celic sicer pripravijo z virusno transdukcijo somatskih celic, elektroporacija pa je primerna za vnos episomalnih vektorjev, v primerih, ko se želimo izogniti uporabi virusnih vektorjev (4).

Tkivna terapija, ki temelji na uporabi modificiranih celic ali tkiv in je namenjena popravilu, regeneracij ali nadomestitvi človeških tkiv, predstavlja najmanjši delež vseh terapij z zdravili za napredno zdravljenje, ki so prišle do stopnje kliničnega preskušanja. Največ raziskav na tem področju je namenjenih zdravljenju mišično-skeletnih, srčno-žilnih bolezni in za regeneracijo kožno-vezivno-tkivnih poškodb (46). Tudi tkivno terapijo lahko izvajamo *ex vivo* ali *in situ*. Za tkivno terapijo *ex vivo* pripravijo tkivne opore, ki jih sestavljajo oporne strukture, celice in aktivne biomolekule. V nekaterih primerih izdelajo celično-tkivni konstrukt, ki ga uporabijo za implantacijo, in s tem omogočijo rekonstrukcijo poškodovanega tkiva. Za pristop *in situ* pa uporabljajo različne biokompatibilne materiale, ki pospešijo funkcionalno regeneracijo poškodovanega tkiva (47).

Poleg polimerov, keramičnih, kovinskih in kompozitnih biokompatibilnih materialov (47) raziskujejo tudi primernost tkivnih opor biološkega izvora, ki imajo za osnovo trodimenzionalno strukturo zunajceličnega ogrodja (48). Zunajcelično ogrodje omogoča strukturno oporo in predstavlja naravno mikrookolje za tkivne matične celice, zato ima pomembno vlogo v regeneraciji poškodovanega tkiva. Za pripravo podporne strukture iz zunajceličnega ogrodja je treba odstraniti celice, za kar se uveljavljajo različne metode odstranjevanja celic iz tkiva. Na tak način pridobijo bazično ogrodje (*decellularised extracellular matrix*, dECM), ki je primerno za pripravo tkivnih opor (48). Med fizikalne metode, ki jih uporabljajo za pripravo bazičnega ogrodja sodi tudi netermalna ireverzibilna elektroporacija tkiva (48). Parametre električnih pulzov izberejo tako, da presežejo prag ireverzibilne elektroporacije, kar povzroči celično smrt. Ireverzibilna permeabilizacija membrane omogoči, da se ohrani samo struktura zunajceličnega ogrodja. Poskusi na živalskih modelih so pokazali, da na tak način pridobijo primerno oporo za regeneracijo poškodovanega tkiva arterije (18). Ireverzibilna elektroporacija v kombinaciji z različnimi drugimi metodami odstranjevanja celic iz tkiva se je izkazala kot učinkovita metoda tudi pri zahtevnejših pripravah bazičnega ogrodja. Tak primer je priprava bazičnega



ogrodja iz tkiva z gosto, kompleksno strukturo in visoko vsebnostjo lipidov (49). Za izdelavo celično-tkivnega konstrukta tridimenzionalno ogrodje ponovno naselijo s primernimi celicami, ki so zmožne diferenciacije (50).

4 SKLEP

Za pripravo različnih vrst naprednih terapij je elektroporacija primerna nevirusna metoda, ko želimo vnašati genski material, utišati določene gene, reprogramirati somatske celice ali pripraviti celična cepiva. V vseh naštetih primerih je potrebno izbrati električne parametre in elektroporacijski medij, kar omogoči, da celice lažje preživijo. Za tkivno terapijo lahko uporabimo ireverzibilno elektroporacijo za pripravo biokompatibilnih tkivnih opor, z reverzibilno elektroporacijo pa pripravljamo celice, s katerimi ponovno naselimo tridimenzionalno strukturo. Poznavanje osnovnih mehanizmov elektroporacije omogoča prilagajanje metode različnim namenom uporabe.

5 IZJAVA

Nastanek preglednega članka je omogočilo financiranje projekta OP20.05187 RI-SI-EATRIS, ki sta ga sofinancirala Republika Slovenija, Ministrstvo za visoko šolstvo, znanost in inovacije in Evropska unija iz Evropskega sklada za regionalni razvoj.

6 LITERATURA

- Goula A, Gkioka V, Michalopoulos E, Katsimpoulas M, Noutsias M, Sarri EF, et al. *Advanced Therapy Medicinal Products Challenges and Perspectives in Regenerative Medicine*. *J Clin Med Res*. 2020;12(12):780–6.
- Silva DN, Chrobok M, Ahlén G, Blomberg P, Sällberg M, Pasetto A. *ATMP development and pre-GMP environment in academia: a safety net for early cell and gene therapy development and manufacturing*. *Immuno-Oncology and Technology*. 2022 Dec;16:100099.
- Sterner RC, Sterner RM. *CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies*. *Blood Cancer J*. 2021 Apr 6;11(4):69.
- Huang CY, Liu CL, Ting CY, Chiu YT, Cheng YC, Nicholson MW, et al. *Human iPSC banking: barriers and opportunities*. *J Biomed Sci*. 2019 Dec;26(1):87.
- Kotnik T, Rems L, Tarek M, Miklavčič D. *Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models*. *Annu Rev Biophys*. 2019 May 6;48(1):63–91.
- Kanduser M, Kokalj Imsirovic M, Usaj M. *The Effect of Lipid Antioxidant α -Tocopherol on Cell Viability and Electrofusion Yield of B16-F1 Cells In Vitro*. *J Membr Biol*. 2019 Feb;252(1):105–14.
- Kandušar M, Miklavčič D. *Electroporation in Biological Cell and Tissue: An Overview*. In: *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2009 [cited 2016 Nov 15]. p. 1–37. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-79374-0_1
- Pavlin M, Kanduser M. *New Insights into the Mechanisms of Gene Electrotransfer - Experimental and Theoretical Analysis*. *Sci Rep*. 2015 Mar 16;5:9132.
- Kandušar M, Ušaj M. *Cell electrofusion: past and future perspectives for antibody production and cancer cell vaccines*. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2014 Dec;11(12):1885–98.
- Muralidharan A, Boukany PE. *Electrotransfer for nucleic acid and protein delivery*. *Trends in Biotechnology*. 2024 Jun;42(6):780–98.
- 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 May;295(2):254–72.
- Campana LG, Testori A, Curatolo P, Quaglino P, Mocellin S, Framarini M, et al. *Treatment efficacy with electrochemotherapy: A multi-institutional prospective observational study on 376 patients with superficial tumors*. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2016 Dec;42(12):1914–23.
- Heller R, Heller LC. *Gene Electrotransfer Clinical Trials*. In: *Advances in Genetics* [Internet]. Elsevier; 2015 [cited 2018 Feb 19]. p. 235–62. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065266014000078>
- Cemazar M, Sersa G, Frey W, Miklavcic D, Teissie J. *Recommendations and requirements for reporting on applications of electric pulse delivery for electroporation of biological samples*. *Bioelectrochemistry*. 2018 Aug;122:69–76.
- Campana LG, Daud A, Lancellotti F, Arroyo JP, Davalos RV, Di Prata C, et al. *Pulsed Electric Fields in Oncology: A Snapshot of Current Clinical Practices and Research Directions from the 4th World Congress of Electroporation*. *Cancers*. 2023 Jun 25;15(13):3340.
- Edd JF, Horowitz L, Davalos RV, Mir LM, Rubinsky B. *In Vivo Results of a New Focal Tissue Ablation Technique: Irreversible Electroporation*. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2006 Jul;53(7):1409–15.
- Davalos R, Rubinsky B. *Electrical Impedance Tomography of Cell Viability in Tissue With Application to Cryosurgery*. *Journal of Biomechanical Engineering*. 2004;126(2):305.
- Phillips M, Maor E, Rubinsky B. *Principles of Tissue Engineering With Nonthermal Irreversible Electroporation*. *Journal of Heat Transfer*. 2011 Jan 1;133(1):011004.
- Markov M. *Dosimetry in Bioelectromagnetics*. *Dosimetry in Bioelectromagnetics*.
- Cvetkoska A, Pirc E, Rebersek M, Magjarevic R, Miklavcic D. *Towards standardization of electroporation devices and protocols*. *IEEE Instrum Meas Mag*. 2020 Apr;23(2):74–81.

21. Pirc E, Reberšek M, Miklavčič D. Functional Requirements and Quality Assurance Necessary for Successful Incorporation of Electroporation-Based Therapies Into Clinical Practice. *Journal of Medical Devices*. 2020 Mar 1;14(1):014701.
22. Pakhomov AG, Miklavcic D, Markov MS. *Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine [Internet]*. 0 ed. CRC Press; 2010 [cited 2024 Mar 5]. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781439819074>
23. Rems L, Viano M, Kasimova MA, Miklavcic D, Tarek M. The contribution of lipid peroxidation to membrane permeability in electroporation: A molecular dynamics study. *Bioelectrochemistry*. 2019 Feb;125:46–57.
24. Muralidharan A, Rems L, Kreutzer MT, Boukany PE. Actin networks regulate the cell membrane permeability during electroporation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2021 Jan;1863(1):183468.
25. Pavlin M, Flisar K, Kandušer M. The Role of Electrophoresis in Gene Electrotransfer. *The Journal of Membrane Biology*. 2010 Jul 18;236(1):75–9.
26. Golzio M, Teissié J, Rols MP. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(3):1292–7.
27. Faurie C, Reberšek M, Golzio M, Kandušer M, Escoffre JM, Pavlin M, et al. Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation. *The Journal of Gene Medicine*. 2010 Jan;12(1):117–25.
28. Reberšek M, Faurie C, Kandušer M, Čorović S, Teissié J, Rols MP, et al. Electroporator with automatic change of electric field direction improves gene electrotransfer in-vitro. *BioMedical Engineering OnLine*. 2007;6(1):25.
29. Kandušer M, Miklavčič D, Pavlin M. Mechanisms involved in gene electrotransfer using high- and low-voltage pulses — An in vitro study. *Bioelectrochemistry*. 2009 Feb;74(2):265–71.
30. Gong J, Koido S, Calderwood SK. Cell fusion: from hybridoma to dendritic cell-based vaccine. *Expert Review of Vaccines*. 2008 Sep;7(7):1055–68.
31. Zimmermann U. Electrical Breakdown, Electroporation and Electrofusion. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1986;105:175–256.
32. Chernomordik LV, Kozlov MM. Mechanics of membrane fusion. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2008 Jul;15(7):675–83.
33. Aycock KN, Davalos RV. Irreversible Electroporation: Background, Theory, and Review of Recent Developments in Clinical Oncology. *Bioelectricity*. 2019 Dec 1;1(4):214–34.
34. Sugrue A, Maor E, Ivorra A, Vaidya V, Witt C, Kapa S, et al. Irreversible electroporation for the treatment of cardiac arrhythmias. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2018 May 4;16(5):349–60.
35. Hawlina S, Chowdhury HH, Smrkolj T, Zorec R. Dendritic cell-based vaccine prolongs survival and time to next therapy independently of the vaccine cell number. *Biol Direct*. 2022 Feb 23;17(1):5.
36. Hawlina S, Zorec R, Chowdhury HH. Potential of Personalized Dendritic Cell-Based Immunohybridoma Vaccines to Treat Prostate Cancer. *Life*. 2023 Jul 1;13(7):1498.
37. Arabi F, Mansouri V, Ahmadbeigi N. Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 Sep;153:113324.
38. Kohn DB, Chen YY, Spencer MJ. Successes and challenges in clinical gene therapy. *Gene Ther*. 2023 Nov;30(10–11):738–46.
39. Hadzialjevic B, Omerzel M, Trovsek B, Cemazar M, Jesenko T, Sersa G, et al. Electrochemotherapy combined with immunotherapy – a promising potential in the treatment of cancer. *Front Immunol*. 2024 Jan 15;14:1336866.
40. Li T, Yang Y, Qi H, Cui W, Zhang L, Fu X, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Sig Transduct Target Ther*. 2023 Jan 16;8(1):36.
41. Zhang J, Hu Y, Yang J, Li W, Zhang M, Wang Q, et al. Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL. *Nature*. 2022 Sep 8;609(7926):369–74.
42. Vanderburgh JA, Corso TN, Levy SL, Craighead HG. Scalable continuous-flow electroporation platform enabling T cell transfection for cellular therapy manufacturing. *Sci Rep*. 2023 Apr 26;13(1):6857.
43. Lin MJ, Svensson-Arvelund J, Lubitz GS, Marabelle A, Melero I, Brown BD, et al. Cancer vaccines: the next immunotherapy frontier. *Nat Cancer*. 2022 Aug 23;3(8):911–26.
44. Lu YT, Pendharkar GP, Lu CH, Chang CM, Liu CH. A microfluidic approach towards hybridoma generation for cancer immunotherapy. *Oncotarget*. 2015 Oct 7;6(36):38764–76.
45. Kim JY, Nam Y, Rim YA, Ju JH. Review of the Current Trends in Clinical Trials Involving Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev and Rep*. 2022 Jan;18(1):142–54.
46. Joyce K, Buljovic Z, Rosic G, Kaszkin-Bettag M, Pandit A. Issues with Tissues: Trends in Tissue-Engineered Products in Clinical Trials in the European Union. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2023 Feb 1;29(1):78–88.
47. Gaharwar AK, Singh I, Khademhosseini A. Engineered biomaterials for in situ tissue regeneration. *Nat Rev Mater*. 2020 Jul 6;5(9):686–705.
48. Crapo PM, Gilbert TW, Badyrak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(12):3233–43.
49. Koo MA, Jeong H, Hong SH, Seon GM, Lee MH, Park JC. Preconditioning process for dermal tissue decellularization using electroporation with sonication. *Regenerative Biomaterials*. 2022 Apr 8;9:rbab071.
50. Saini A, Breen I, Alzubaidi S, Pershad Y, Sheth R, Naidu S, et al. Irreversible Electroporation in Liver Cancers and Whole Organ Engineering. *JCM*. 2018 Dec 25;8(1):22.

