

Elektrokemoterapija – učinkovita metoda zdravljenja tumorjev s kombinacijo kemoterapevtika in električnega polja

Electrochemotherapy – an effective method for the treatment of tumors with a combination of chemotherapeutic agent and electric field

Tina Stepišnik,¹ Tomaž Jarm,¹ Aleš Grošelj,² Ibrahim Edhemović,³ Mihajlo Đokić,⁴ Arpad Ivanecz,⁵ Blaž Trotošek,⁴ Erik Breclj,³ Stojan Potrč,⁵ Maja Čemažar,³ Nebojša Glumac,³ Tjaša Pečnik,³ Biserka Verberič,² Eldar Gadžijev,³ Primož Strojan,³ Marko Snoj,³ Damijan Miklavčič,¹ Gregor Serša³

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Ljubljana, Slovenija

² Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Slovenija

³ Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

⁴ Klinični oddelek za abdominalno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

⁵ Oddelek za splošno in abdominalno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Maribor, Slovenija

Korespondenca/ Correspondence:

prof. dr. Damijan Miklavčič,
e: damijan.miklavcic@fe.uni-lj.si
prof. dr. Gregor Serša, dr. med.
e: gserša@onko-i.si

KLjučne besede:
elektrokemoterapija;

Izvleček

Elektrokemoterapija je lokalna terapija za zdravljenje kožnih in tudi globlje ležečih tumorjev in zasevkov. Deluje na principu povečanja citotoksičnega učinka bleomicina ali cisplatina, ki ga dosežemo z dajanjem električnih pulzov, ki povečajo vnos molekul citostatika v celice. Uvršča se med ablativne terapevtske pristope. Učinkovitost elektrokemoterapije se kaže z več kot 80 % objektivnih odgovorov na zdravljenje pri tumorjih različnega histološkega porekla. Trenutno se uporablja predvsem v paliativne namene, ko so ostali postopki zdravljenja že izčrpani. Za razvoj in uvedbo te tehnologije v klinično prakso je v prvi vrsti zaslužen tehnološki razvoj, ki omogoča, da so danes v središču raziskovalnega zanimanja globoko ležeči tumorji. V Sloveniji prednjačimo pri razvoju zdravljenja tumorjev v jetrih in v področju glave in vratu, po svetu pa razvijajo postopke za zdravljenje tako kostnih zasevkov in možganskih tumorjev kot tudi endoluminalnih tumorjev.

Abstract

Electrochemotherapy is a local treatment for skin tumors as well as for deep-seated tumors and metastases. Electrochemotherapy is based on enhanced cytotoxic effectiveness of bleomycin or cisplatin by electroporation, which increases drug delivery into tumor cells. Electrochemotherapy is a highly effective ablative technique with over 80 % objective responses of electrochemotherapy treated tumors. Its advantage is the simplicity of the procedure that can be utilized in the treatment of different tumor histotypes. Currently, it is predominantly used with palliative intent when other treatment options have been exhausted. For the implementation of electrochemotherapy into the clinical practice the technological development that is now focusing on the treatment of deep-seated tumors was also important. In Slovenia we are at the forefront in the treatment of liver tumors and head and neck tumors, while others are developing electrochemotherapy for the treatment of bone and brain metastases as well as endoluminal tumors.

Elektroporacija v elektrokemoterapiji

Elektrokemoterapija je način lokalnega zdravljenja raka, ki združuje uporabo farmacevtskih sredstev in električnih pulzov v območju tumorja. Namen tovrstnega zdravljenja je uničenje tumorjev.

Elektrokemoterapija temelji na pojavu elektroporacije (tudi elektropermeabilizacije), ki ob izpostavitvi celic in tkiv električnem polju začasno destabilizira celične membrane. Te v električnem po-

elektroporacija;
kemoterapevtik; tumor;
zdravljenje raka

Key words:

electrochemotherapy;
electroporation;
chemotherapeutic agent;
tumor; cancer treatment

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2016;
86: 41–55

Prispelo: 24. nov. 2015,
Sprejeto: 6. jan. 2016

lju postanejo pod vplivom ustvarjenega električnega polja zelo prepustne za različne snovi,¹⁻⁶ med drugim tudi za hidrofilne molekule citostatikov, ki se jim na ta način znotraj celice poveča koncentracija in s tem citotoksičnost.⁷⁻⁹ Za učinkovit odgovor tumorja na zdravljenje zadostuje že nizka sistemska koncentracija kemoterapevtika, ki je nižja kot pri standardnih protokolih zdravljenja samo s kemoterapijo.

Pri elektroporaciji v biomedicinske namene uporabljamo kratke enosmerne visokonapetostne električne pulze. O reverzibilni elektroporaciji govorimo, kadar amplituda in trajanje električnih pulzov nista prevelika. Čez čas pride do zacelitve celične membrane ter vnovične vzpostavitve njene selektivne prepustnosti. V tem primeru celica preživi. Celica odmre, kadar so električni pulzi predolgi in/ali je napetost električnih pulzov prevelika. Takrat govorimo o ireverzibilni elektroporaciji.

Reverzibilna elektroporacija se poleg zdravljenja v elektrokemoterapiji uporablja tudi za gensko transfekcijo (metoda nevirusnega vnosa gole DNA ali RNA v celice *in vitro* in *in vivo*),¹⁰⁻¹³ elektro-zlivanje oz. elektrofuzijo (nekemična metoda zlivanja celic)¹⁴ ali za transdermalni vnos (metoda vnosa učinkovin ter gole DNA ali RNA v in preko kože).^{15,16} Ireverzibilna elektroporacija se kot netermična metoda uporablja za ablacijo tumorjev in mehkih tkiv kot je npr. srčna mišica.¹⁷⁻²⁸

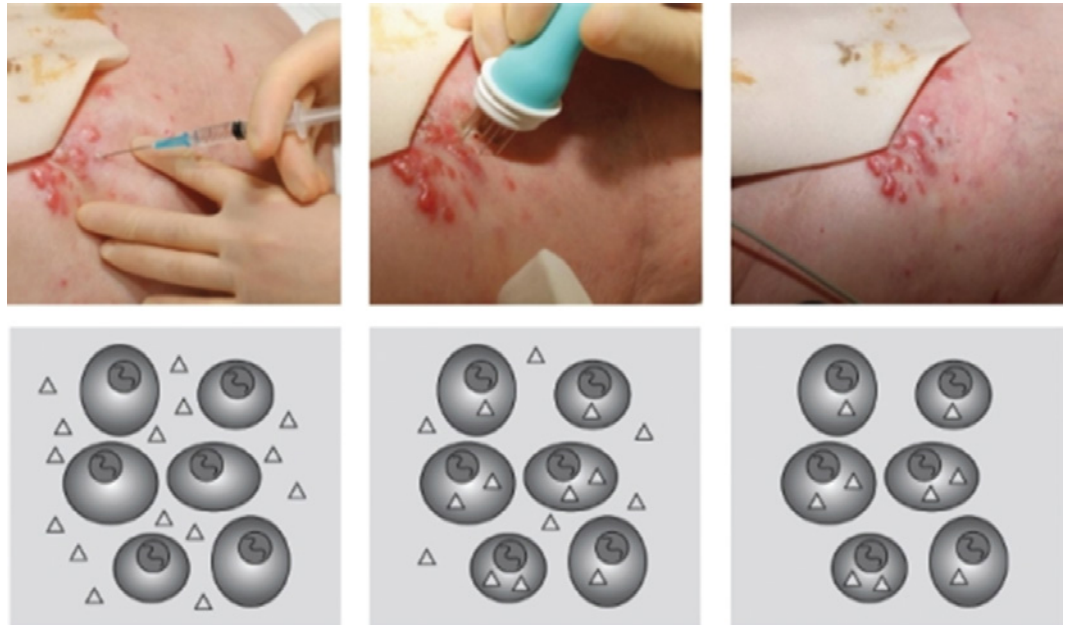
V elektrokemoterapiji služi elektroporacija kot fizikalni dostavni sistem različnih učinkovin. Na ta način elektrokemoterapija omogoča povečan vnos molekul izbranega kemoterapevtika v tumorske celice.^{8,29} Od prve *in vitro* raziskave na področju elektrokemoterapije je minilo že več kot 20 let. Današnja uporaba elektrokemoterapije v zdravljenju temelji na obsežnih raziskavah osnovnih mehanizmov njenega učinko-

vanja, kot so določitev najučinkovitejših parametrov pulzov zdravljenja, določitev ustreznih kemoterapevtikov,^{30,31} *in vivo* raziskave na različnih živalskih modelih³² in klinične raziskave zdravljenja kožnih, podkožnih^{32,33} ter globoko-ležečih tumorjev.³⁴⁻³⁶ Namen tega prispevka je strnjeno predstaviti pregled razvoja in uporabe elektrokemoterapije kot metode za zdravljenje raka.

Elektrokemoterapija v klinični praksi

Za učinkovito elektrokemoterapijo moramo poleg ustrezne jakosti električnega polja, s katerim zaobjamemo celoten tumor z varnostnim robom,³⁷ zagotoviti tudi zadostno koncentracijo kemoterapevtika v tumorju. Kemoterapevtik vbrizgamo v veno ali v sam tumor. Po nekaj minutah v tumor preko ustreznih elektrod dovedemo kratke visokonapetostne električne pulze, ki zagotovijo reverzibilno elektroporacijo celic v tumorju (Slika 1).

V zdravljenju z elektrokemoterapijo dovajamo po sistemu ali lokalno (neposredno v tumor) tiste kemoterapevtike, ki sicer ne prehajajo skozi celično membrano, npr. bleomicin (BLM), ali kemoterapevtike, ki le v manjši meri vstopajo v celice, npr. cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum(II) – CDDP). Električne pulze dovajamo na zdravljenno področje, ko koncentracija zdravila v tkivu tumorja doseže najvišjo vrednost: v takih pogojih bo pod vplivom električnega toka v tumorske celice vstopilo največ molekul kemoterapevtika.³⁸ Poleg nepermeabilnosti oz. slabe permeabilnosti BLM in CDDP je njuna značilnost tudi znotrajcelično mesto delovanja.³⁹ V predkliničnih raziskavah smo dokazali, da se z izpostavitvijo tkiva električnemu polju močno poveča učinkovitost delovanja BLM⁸ in CDDP,⁴⁰ medtem ko se pri drugih kemoterapev-



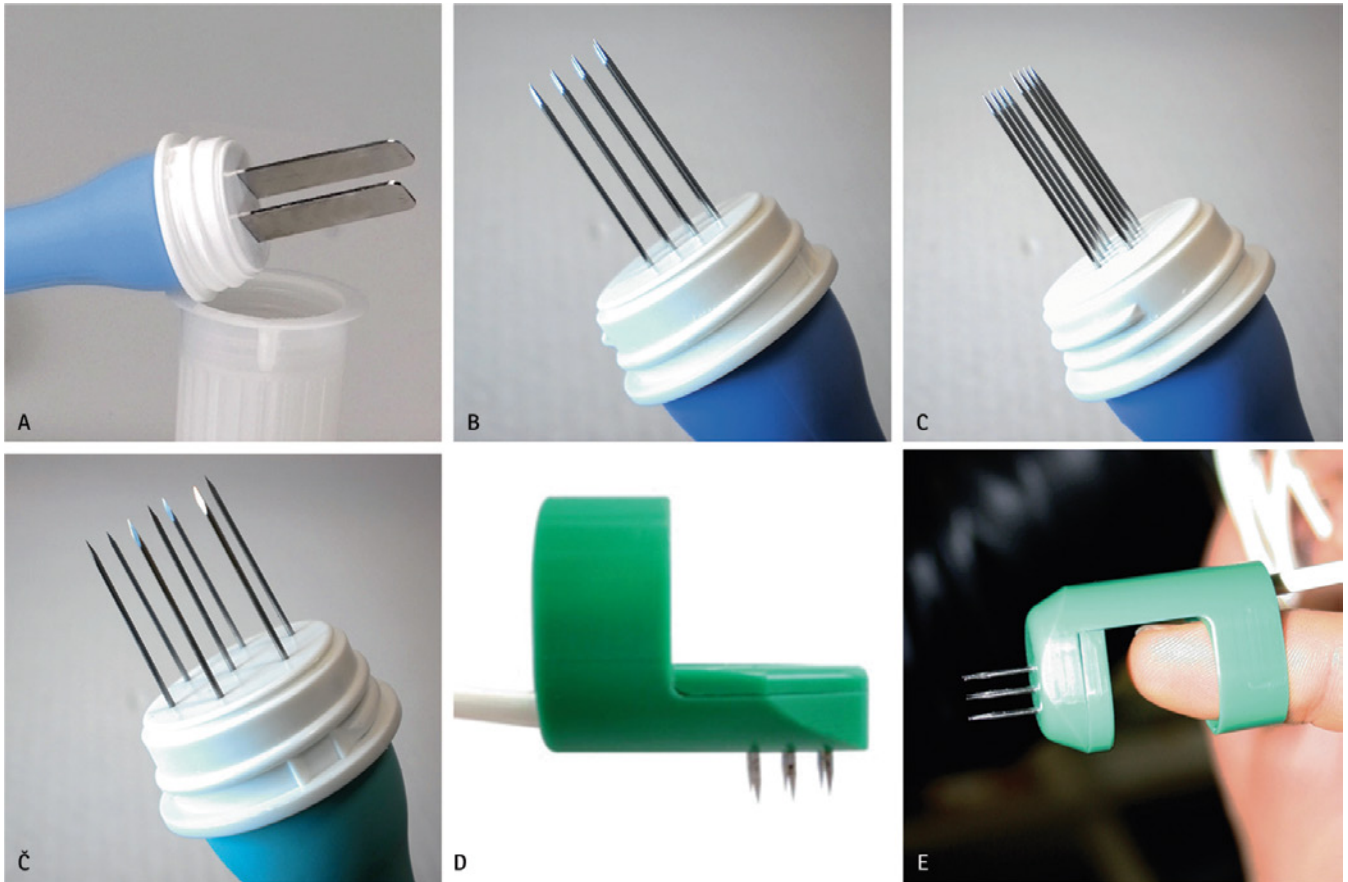
Slika 1: Princip elektrokemoterapije. Z dovajanjem visokonapetostnih električnih pulzov preko elektrod v tkivo ustvarimo električno polje, ki obsega tumor z varnostnim robom, in na ta način dosežemo elektroporacijo in povečamo prehodnost celične membrane tumorskih celic za molekule kemoterapevtika. Za elektrokemoterapijo sta primerna kemoterapevtika bleomicin in cisplatin, ki imata brez elektroporacije omejeno prehodnost skozi celično membrani, a sta, ko se enkrat znajdeti v celici, zelo citotoksična.

tikih njihova učinkovitost ne poveča kljub izpostavitvi tkiva električnemu polju.^{30,31}

Pri zdravljenju tumorjev na koži ali neposredno pod njeno površino uporabljamo ploščate elektrode, ki jih neinvazivno pritisnemo ob kožo. V primerih globlje ležečih tumorjev uporabljamo elektrode v obliki igel, ki jih vbodemo skozi kožo. Porazdelitev jakosti električnega polja v tkivu in v njegovi okolici določajo oblika elektrod, njihova medsebojna razdalja in električne lastnosti tkiva.³⁷ Različna tkiva imajo namreč različno električno prevodnost. V primerih globokoležečih, večjih tumorjev ali tumorjev nepravilnih oblik je potrebno pred zdravljenjem opraviti natančne izračune, s katerimi pred samim posegom določimo razporeditev in mesto vstavljenih elektrod ter ustrezno napetost.⁴¹ Tako omogočimo, da je celoten tumor izpostavljen zadostni jakosti električnega polja, ki je potrebna za učinkovito

zdravljenje, in hkrati zmanjšamo poškodbo zdravih tkiv v okolici tumorja.⁴²

Amplituda pulzov je odvisna od lastnosti tkiva in od oblike ter položaja elektrod. Glede na rezultate *in vivo* raziskav mora biti amplituda pulzov takšna, da na celotnem področju tumorja dosežemo električno polje velikosti vsaj 400 V/cm (pri zaporedju 8 pulzov s trajanjem 100 mikrosekund).⁴¹ Pulze dovajamo s ponavljalno frekvenco 5000 Hz: tako je nelagodje bolnikov (zaradi električne stimulacije bližnjih mišic) manjše in je postopek zdravljenja krajši.^{43,44} Pri zdravljenju tumorjev, ki ležijo sorazmerno blizu srca, je dovajanje pulzov sinhronizirano s kompleksom QRS posameznega srčnega utripa v elektrokardiogramu (EKG). Srce je ob dovajanju električnih pulzov med t. i. občutljivim obdobjem prekatov še posebej dovzetno za nastanek aritmije, ki lahko ogrozi bolnikovo življenje. Z omenjeno sinhronizacijo zagotovimo večjo varnost za bolnika.⁴⁵



Slika 2: Elektrode proizvajalca IGEA SpA s fiksno geometrijo. A) Ploščate elektrode. B) Vzpostavne igelne elektrode. C) Vzpostavne igelne elektrode – pogled od spredaj. Č) Heksagonalne igelne elektrode. D) Prstne elektrode s pravokotnimi iglami. E) Prstne elektrode z osnimi iglami.

Sinhronizirano dovajanje električnih pulzov s kompleksom QRS je pomembno predvsem pri zdravljenju sprememb v jetrih,³⁵ kosteh⁴⁶ in možganih⁴⁷ ter pri zdravljenju sprememb v dojkah oz. na steni prsnega koša^{48,49} in v trebušni slinavki.⁵⁰

Predklinične raziskave in mehanizmi delovanja elektrokemoterapije

Pred začetkom kliničnih raziskav in zdravljenja bolnikov z elektrokemoterapijo so bile narejene obsežne predklinične raziskave o njenem učinku na različne vrste tumorjev. Predklinične raziskave so pojasnile tudi mehanizme delovanja elektrokemoterapije, pred-

vsem povečanje prepustnosti membrane in znotrajcelično kopičenje molekul učinkovine, učinek na žile in vključenost imunskega odziva. Najpomembnejši mehanizem delovanja je povečan celični privzem bleomicina in cisplatina po izpostavitvi celic ali tumorja električnemu polju. Citotoksičnost BLM in CDDP, ki se nakopiči v celicah v pogojih *in vitro*, je nekajkrat potencirana.^{8,31,40} Podatki *in vitro* so bili potrjeni v raziskavah *in vivo* na različnih živalskih tumorskih modelih.⁵¹⁻⁵⁵ Nakopičenje zadostne količine kemoterapevtika v celicah je torej ključni pogoj, na katerem temelji učinkovitost elektrokemoterapije.^{8,56,57}

Elektrokemoterapija učinkuje tudi na žilje v tumorju. Z izpostavitvijo tumorja električnemu polju postanejo tudi en-

dotelijske celice v tumorskem žilju bolj dovzetne za privzem kemoterapevtika. Zato pride do apoptoze endotelnih celic in do prekinitve oziroma zmanjšanja pretoka krvi v tumorju.⁵⁸ Elektrokemoterapija ima torej v tumorjih žilno-razdiralni učinek, hkrati pa povzroča vazokonstrikcijo (oboje je bilo dokazano *in vivo*).⁵⁹ Vazokonstrikcija, ki je prehodnega značaja, povzroči začasen zastoj pretoka krvi v tumorju in s tem daljšo prisotnost kemoterapevtika znotraj tumorja, kar poveča učinek njegovega delovanja.⁶⁰ Kemoterapevtik je potrebno vnesti v žilni sistem tumorja pred dovanjem električnih pulzov; vazokonstrikcija bi namreč lahko onemogočila učinkovit vnos njegovih molekul v tumor, če bi ga vnesli šele po elektroporaciji.⁶¹

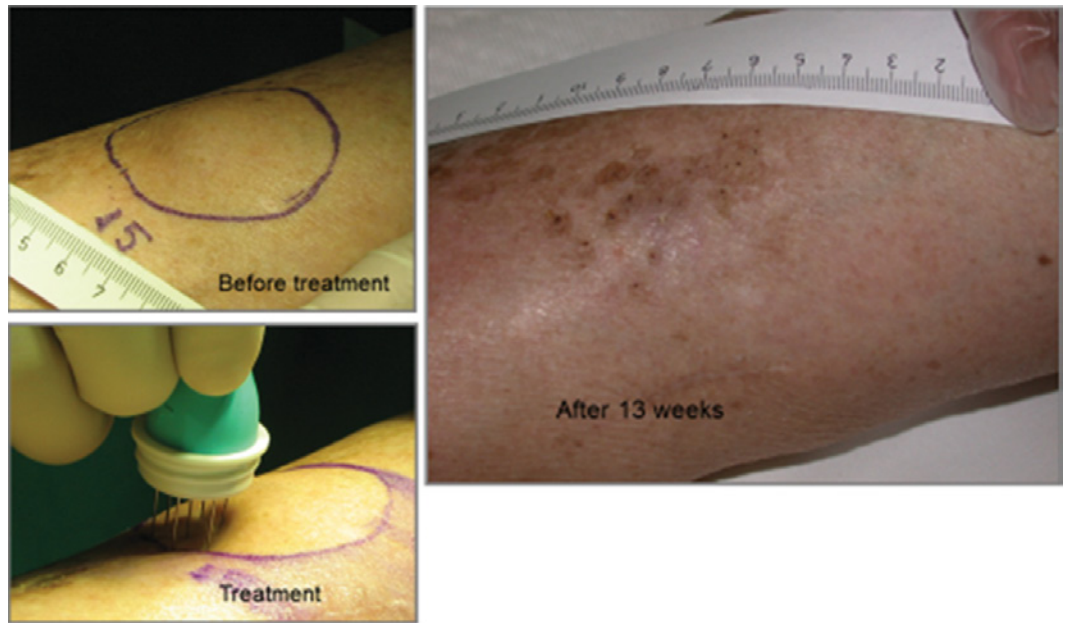
Pomemben mehanizem delovanja je tudi imunski odziv organizma po elektrokemoterapiji. Elektrokemoterapija ne učinkuje na vse celice, ki se nahajajo v tumorju, enako. Vzrok temu je nehomogenost tumorja, zaradi česar posamezne celice, ki imajo različno usmerjenost in velikost, niso v enaki meri izpostavljene električnemu polju, oziroma v njih ni enake ali dovolj velike koncentracije kemoterapevtika.^{62,63} Podobno kot pri drugih metodah zdravljenja, npr. radioterapiji, preostale celice lahko odstrani imunski sistem. Poškodovane celice namreč sproščajo antigene, ki aktivirajo imunski odgovor organizma. Dokazano je bilo, da popolne odgovore tumorjev pri elektrokemoterapiji dosežemo le pri imunsko kompetentnih živalih, ne pa pri živalih z zavrtim imunskim sistemom.⁶²

Elektrokemoterapija je učinkovita pri različnih vrstah tumorjev, čeprav so že prve raziskave pokazale, da obstajajo med njimi večje ali manjše razlike v odzivnosti, kar je potrdila tudi metaanaliza izvedenih kliničnih raziskav.^{33,57}

Pregled kliničnih poročil in raziskav, ki so v teku

a. Klinični podatki o elektrokemoterapiji – oblikovanje standardnih postopkov uporabe

Začetki elektrokemoterapije segajo v leto 1991 z objavo prvih predkliničnih rezultatov.^{64,65} Nadaljnje klinične raziskave elektrokemoterapije z bleomicinom in cisplatinom so kljub uporabi nekoliko različnih protokolov dokazale, da je elektrokemoterapija v humani in veterinarski onkologiji varna in učinkovita metoda zdravljenja.⁶⁶⁻⁶⁸ Pomemben mejnik je bil priprava standardnih operativnih postopkov (SOP) za zdravljenje z elektrokemoterapijo ob uporabi naprave Cliniporator™, ki smo jo s partnerji razvili in predstavili na trgu leta 2006 v okviru projekta Cliniporator (projekt QLK3-1999-00484) in projekta ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy; projekt QLK-2002-02003).⁶¹ SOP za elektrokemoterapijo so bili pripravljene na podlagi izkušenj vodilnih evropskih onkoloških centrov za elektrokemoterapijo.⁶⁹ Njihov namen je standardizirati terapevtske postopke pri izvedbi elektrokemoterapije in s tem omogočiti njeno varno in učinkovito uporabo za zdravljenje kožnih in podkožnih tumorjev skupaj z uporabo na novo razvitega generatorja električnih pulzov Cliniporator™. V SOP so natančno opisani postopki zdravljenja, potreben material ter izbira vrste elektrod za zdravljenje v določeni kliničnih primerih. SOP so oblikovani po načelu drevesa odločitev, s pomočjo katerih se zdravnik (na podlagi števila, velikosti, debeline in globine tumorskih nodulov) odloči, kako bo izvedel zdravljenje. Vbrizgavanje kemoterapevtika v tumor je priporočeno v primerih manjših in maloštevilnih tumorskih nodulov (število nodulov ≤ 7 , premer < 2 cm). V



Slika 3: Zdravljenje podkožnega zasevka malignega melanoma z elektrokemoterapijo. A) Stanje pred zdravljenjem. B) Potek zdravljenja – intravensko vbrizganje bleomicina, ter dovajanje električnih pulzov s heksagonalno elektrodo. Zdravljenje je bilo izvedeno samo enkrat, pri čemer so bili pulzi dani večkrat, do se pokrije celotna tumorska masa. C) Stanje 13 tednov po zdravljenju – poškodbe normalnega tkiva niso vidne, kljub vključitvi varnostnega roba v terapevtsko polje. (Onkološki Inštitut Ljubljana)

primeru večjih nodulov ali kadar je teh več SOP priporočajo intravensko dajanje kemoterapevtika.

Pomembna je tudi odločitev o izbiri vrste elektrod: tudi ta je odvisna od velikosti in debeline/globine tumorskih nodulov (Slika 2). Manjše, površinske nodule (do 1 cm) naj bi zdravili s ploščatimi ali vrstično-igelnimi elektrodami (Slika 2; A, B in C), medtem ko se za zdravljenje večjih tumorjev priporoča uporaba heksagonalnih igelnih elektrod (Slika 2; Č).^{69,61} V zadnjem času so razvili tudi naprstne elektrode, potekajoče v longitudinalni ali pravokotni smeri, ki so primerne za težje dostopna mesta, kot je npr. ustna votlina in ustni del žrela (Slika 2; D in E).

Elektrokemoterapijo izvajamo v lokalni ali splošni anesteziji. Lokalna anestezija je dovolj, predvsem kadar so noduli manjši in maloštevilni. Večkrat je bilo že poudarjeno, da je za učinkovito zdravljenje potrebno v električno polje zaobjeti celoten tumor. Pri tumorjih, ki so večji kot je razmik med posamezni-

mi elektrodami, elektrode prestavljamo z enega mesta na drugega in dovajamo električne pulze tolikokrat in na način, da pokrijemo celotno površino tumorja, vključno z ustreznim varnostnim robom. Če ne dosežemo popolnega odgovora (uničenja) tumorja že po prvem zdravljenju, SOP priporočajo eno ali več ponovitev elektrokemoterapije (Slika 3).

Priprava SOP je omogočila razširitev tehnologije po Evropi, standardizacijo elektrod ter registracijo generatorja električnih pulzov kot medicinske naprave razreda 2A za zdravljenje bolnikov. Elektrokemoterapija se uvaja v smernice in standardno klinično prakso zdravljenja melanomskih in nemelanomskih kožnih tumorjev v številnih državah oziroma onkoloških centrih v Evropi.⁷⁰

Poleg tega potekajo mnoge klinične študije, ki preučujejo možnosti za razširitev kliničnih indikacij (trenutno je v registru ClinicalTrials.gov zavedenih 9 študij in v ClinicalTrialsRegister.eu 4 študije).

Slika 4: A) 90-letni bolnik s karcinomom bazalnih celic velikosti $1,3 \times 0,7$ cm na lateralni strani desne zgornje veke desnega očesa. B) Štiri mesece po posegu spremembe ni več videti – dosežen je bil popoln odgovor na zdravljenje.⁸⁴



b. Uvajanje elektrokemoterapije kot standardne oblike zdravljenja kožnih in podkožnih tumorjev

Novi načini zdravljenja lahko za bolnika predstavljajo korist ali novo tveganje. Elektrokemoterapija je zelo primerna za zdravljenje kožnih tumorjev zaradi sorazmerno enostavne izvedbe in varnosti. Kot vsaka nova metoda je bila tudi elektrokemoterapija uvedena v rutinsko klinično delo na osnovi rezultatov kliničnih raziskav, ki so natančno vrednotile njeno učinkovitost in varnost. Tako prve kot tudi naslednje klinične raziskave so potrdile, da aplikacija električnih pulzov povzroča le kratkotrajno in prehodno bolečino, zaradi česar je potrebna lokalna ali splošna anestezija.^{31,61,71,72} O resnih stranskih učinkih, povezanih z elektrokemoterapijo do sedaj niso poročali.

Poleg dobrega varnostnega profila so klinične raziskave pokazale, da lahko v primeru površinskih tumorjev pričakujemo 80 % objektivnih odgovorov že po enem samem zdravljenju z elektrokemoterapijo.³³

Seveda je učinkovitost elektrokemoterapije odvisna od vrste zdravljenega tumorja. Tako v primeru bazalnoceličnega karcinoma rezultati (95 % objektivnih in 85 % popolnih odgovorov) presegajo rezultate, dosežene pri melanomu (80 % objektivnih in 57 % popolnih odgovorov).^{33,73} Vzroki za razlike v odgovoru

na zdravljenje z elektrokemoterapijo pri različnih vrstah tumorjev niso raziskani. Poleg različne občutljivosti tumorskih celic na zdravljenje gre lahko tudi za razlike v prekrvitvi tumorja in s tem tudi različno koncentracijo kemoterapevtika v tumorju. Verjetno imajo tumorji, pred tem zdravljeni z obsevanjem in kemoterapijo, drugačne biološke lastnosti in so zato slabše odzivni na zdravljenje z elektrokemoterapijo, kar kažejo tudi rezultati nekaterih kliničnih raziskav.⁴⁹ Učinkovitost elektrokemoterapije je odvisna tudi od velikosti tumorjev: učinek zdravljenja je slabši pri tumorjih s premerom, večjim od 3 cm, saj je pri takih tumorjih težje zagotoviti zadostno koncentracijo kemoterapevtika v tumorju in ustrezno električno polje znotraj celotnega tumorja. V takih primerih je smiselno zdravljenje ponoviti, kar potrjujejo številni klinični podatki.⁷³

Za potrebe multicentričnih raziskav, ki naj bi analizirale večje število bolnikov z določeno vrsto raka, obstaja nekaj registrov, ki združujejo podatke različnih centrov, v katerih se izvaja elektrokemoterapija. Eden od njih je tudi register InspECT (International Network for Sharing Practices on Electrochemotherapy) (<http://insp-ect.org>). Sem sta vključena tudi dva centra iz Slovenije – Onkološki inštitut Ljubljana in Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Trenutno je v pripravi objava

Slika 5: Odgovor na zdravljenje z elektrokemoterapijo. A) Bolnik s ploščatoceličnim karcinomom na obrazu pred zdravljenjem. B) Obsežna nekroza na mestu tumorja 2 tedna po elektrokemoterapiji. C) Stanje 7 tednov po terapiji. D) Stanje 6 mesecev po elektrokemoterapiji: viden je popoln odgovor (Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo Univerzitetni klinični center Ljubljana).

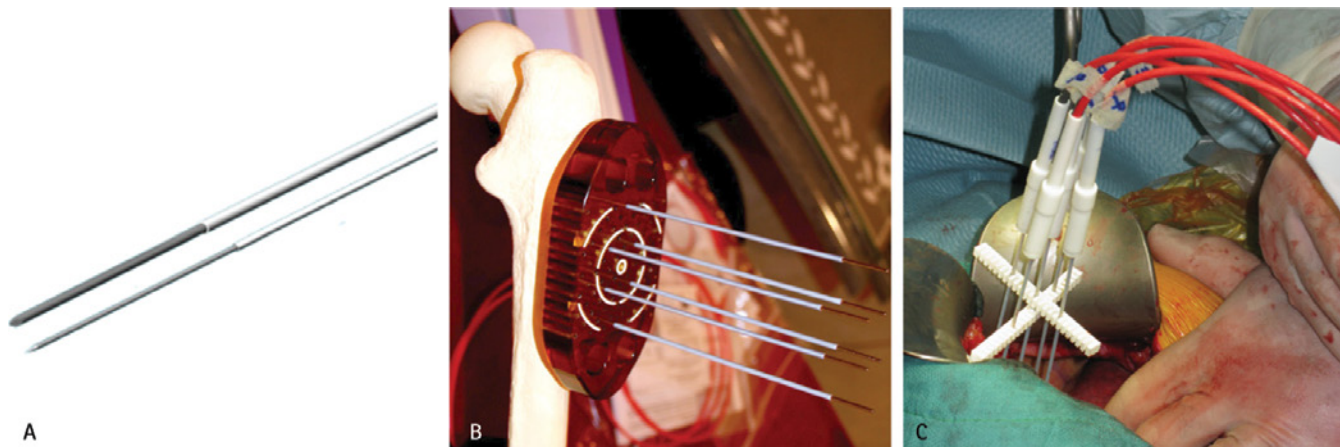


rezultatov zdravljenja kožnih tumorjev glave in vratu pri več kot 100 bolnikih, ki so bili obravnavani v petih onkoloških centrih v Evropi.

Elektrokemoterapija se še vedno uporablja pretežno kot paliativno zdravljenje, vendar jo metaanaliza, s katero so primerjali učinkovitost različnih vrst zdravljenj kožnih tumorjev, postavlja ob bok tudi drugim že uveljavljenim metodam zdravljenja.⁷⁴ Elektrokemoterapija je kot terapevtska možnost že navedena v evropskih in nemških smernicah za zdravljenje melanoma^{75,76} in v angleških smernicah NICE (*angl.* National Institute of Health and Clinical Excellence), kjer je elektrokemoterapija poleg za zdravljenje melanoma navedena tudi kot eno izmed možnih oblik zdravljenja bazalnoceličnega in ploščatoceličnega

karcinoma kože.^{77,78} Trenutno je v Sloveniji elektrokemoterapija kot možnost navedena le v smernicah za zdravljenje melanoma,⁷⁹ vključena pa naj bi bila tudi v smernice za zdravljenje bazalnoceličnega karcinoma kože (smernice v pripravi).

Elektrokemoterapija se uporablja tudi za zdravljenje manj agresivnih nemelanomskih vrst kožnega raka, kot je bazalnocelični karcinom, kjer je delež ozdravitev s standardnimi metodami zdravljenja izjemno visok. V takih primerih mora biti novo zdravljenje še posebej učinkovito in nemutilantno, če želimo, da bi bilo konkurenčno že uveljavljenim načinom zdravljenja, kot sta kirurgija in radioterapija. Tako bi se lahko elektrokemoterapija uporabljala v primerih multiplih tumorjev po neuspe-



Slika 6: Različne oblike igelnih elektrod proizvajalca IGEA SpA. A) Na voljo sta dve vrsti igelnih elektrod z različno dolžino aktivnega dela (3 cm ali 4 cm). B) 1.8 mm široka elektroda s trokorno konico za vrtanje v kost – prikaz s kostnim modelom. C) 1.2 mm široka elektroda – prikaz uporabe med operacijo zdravljenja jetrnega zasevka.

šnem zdravljenju z operacijo ali obsevanjem v področjih, ki so težje dosegljiva ali neprimerna za zdravljenje z drugimi načini oz. pri katerih zahteva odličen estetski učinek (in so rezultati drugih metod manj ugodni, npr. na območju glave in vratu,⁸⁰ licih,^{81,82} nosu^{71,83} ali v bližini oči⁸⁴ (Slika 4, 5).

Na Kliniki za otorinolaringologijo (ORL) Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Ljubljana trenutno poteka raziskava o zdravljenju bazalnoceličnega karcinoma v področju glave in vratu z elektrokemoterapijo. V klinično študijo vstopajo bolniki z velikimi, multiplimi ali recidivirajočimi tumorji po predhodnih zdravljenjih.

Elektrokemoterapijo trenutno izvajajo v več kot 150 centrih v Evropi. Uporablja se pretežno za zdravljenje kožnih tumorjev. Državno zdravstveno zavarovanje povrne stroške zdravljenja z elektrokemoterapijo za določene indikacije

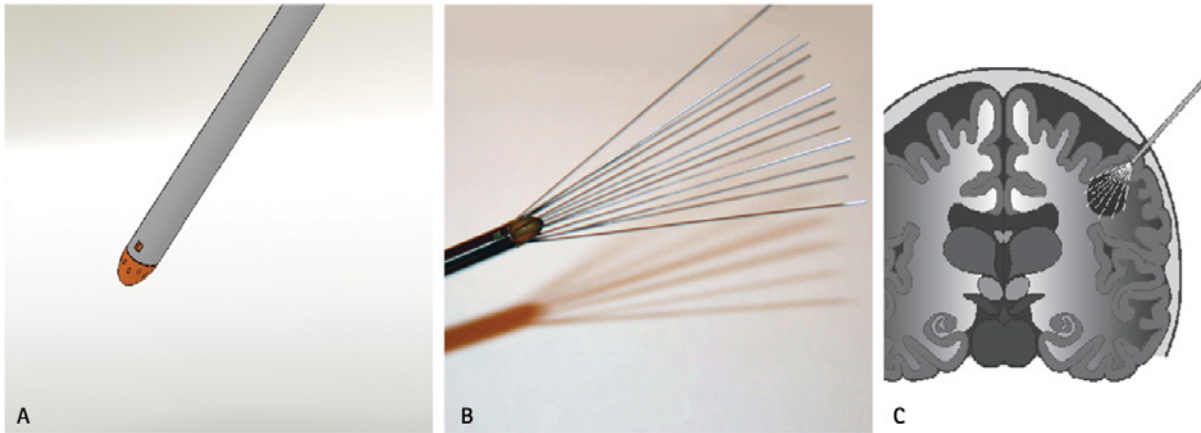
v Švici, Avstriji, Nemčiji, na Danskem, v Španiji, Veliki Britaniji, Italiji in na Portugalskem, le deloma pa v Sloveniji (podatki, pridobljeni od podjetja Igea SpArl).

c. Smeri razvoja elektrokemoterapije – v globini telesa ležeči tumorji in zasevki v kosteh

Razvoj elektrokemoterapije je trenutno usmerjen v zdravljenje v globini ležečih tumorjev v jetrih^{35,36} in v področju glave in vratu⁴² ter kostnih zasevkov.⁸⁵ Sočasno s kliničnimi raziskavami faze I/II, ki naj bi potrdile varnost in učinkovitost zdravljenja v globini telesa ležečih tumorjev z elektrokemoterapijo, poteka tudi razvoj tehnologije, ki naj bi optimizirala zdravljenje teh tumorjev in omogočila učinkovito zdravljenje tudi tumorjev, večjih od 3 cm (to je običajno meja učinkovitosti toplotnih terapij npr.:

Slika 7: Endoskopske elektrode EndoVe. A) model CAD. B) Slika elektrode. C) Prikaz tarčne spremembe med endoskopskim postopkom.





Slika 8: Zložljive možganske elektrode. A) Elektroda v zloženem stanju. B) Elektroda v popolnoma odprtem stanju. C) Grafični prikaz vstavitve elektrode v možgane.⁹⁸

radiofrekvenčne in mikrovalovne ablacije) ter tumorjev v bližini velikih krvnih žil.

Zdravljenje v globini telesa ležečih tumorjev z elektrokemoterapijo je uspešno le v primeru, da je ves tumor izpostavljen dovolj velikemu električnemu polju.^{86,87} Vključuje predhodno izdelavo načrta zdravljenja z natančnim izračunom pozicije elektrod,⁸⁸ določitvijo najprimernejših elektrod,^{89,90} sinhronizacijo dovajanja pulzov z EKG⁹¹⁻⁹³ in uporabo

slikovne tehnologije za natančno vstavitve igel med operacijo (v skladu z izdelanim načrtom postavitve elektrod).⁴² Trenutno se za potrebe elektrokemoterapije v globini telesa ležečih tumorjev v različnih delih telesa razvijajo nove vrste elektrod (Tabela 1).

Za zdravljenje globokoležečih tumorjev z elektrokemoterapijo so bile razvite in so v uporabi tri vrste elektrod:

- Dolge igelne elektrode (Slika 6):** zdravljenje jetrnih zasevkov raka

Tabela 1: Različne vrste elektrod, razvitih za zdravljenje v globini telesa ležečih tumorjev z elektrokemoterapijo.

Vrsta elektrode	Lokacija in vrsta zdravljenega tumorja	Ustanova (kjer poteka raziskava)	Referenca/Številka klinične obravnave
Dolge igelne (Slika 6)	zasevki raka debelega črevesa v jetrih	Onkološki inštitut Ljubljana, Slovenija	³⁵ , NCT02352259 NCT01264952
	hepatocelični karcinom	UKC Ljubljana	⁹⁴ , NCT02291133
	tumorji glave in vratu	UKC Ljubljana Rigshospitalet, Denmark UKC Ljubljana	NCT02549742 ⁴²
	kostni zasevki	Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna, Italija	⁹⁶
	sarkomi mehkih tkiv	Veneto Region Oncology Research Institute of Padova, Italija	⁹⁵
Endoluminalne (Slika 7)	rak debelega črevesa in požiralnika	Cork Cancer Research Center, Irska	⁹⁷ , NCT01172860
Zložljive (Slika 8)	možganski tumorji	Copenhagen University Hospital at Herlev, Danska	⁹⁸ , NCT01322100

debelega črevesa,³⁵ hepatoceličnega karcinoma ali holangiokarcinoma,⁹⁴ sarkomov mehkih tkiv,⁹⁵ kostnih zasevkov;⁹⁶ možna uporaba tudi pri drugih vrstah tumorjev (večjih od 3 cm), ki se nahajajo/segajo globlje pod kožo, kot je npr. ploščatocelični rak glave in vratu.⁴²

2. **Endoluminalne elektrode (Slika 7):** zdravljenje raka debelega črevesa in raka požiralnika.⁹⁷
3. **Zložljive možganske elektrode (Slika 8):** transkranialno zdravljenje možganskih tumorjev.^{98,90} Z razvojem ustreznega sistema za spremljanje vstavitve elektrode v tumor bo s tovrstnimi elektrodami možno tudi zdravljenje jetrnih tumorjev (podobno kot pri perkutani radiofrekvenčni ablaciji).

V Sloveniji smo med pionirji zdravljenja jetrnih tumorjev z elektrokemoterapijo. Zaključena je klinična raziskava faze I jetrnih zasevkov kolorektalnega raka, ki je elektrokemoterapijo opredelila kot varno in učinkovito metodo zdravljenja te bolezni (ClinicalTrials.gov, NCT01264952). Trenutno poteka na Onkološkem inštitutu, v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana in Univerzitetnem kliničnem centru Maribor klinična raziskava faze II. Dosedanji rezultati potrjujejo ugotovitve iz raziskave faze I glede varnosti in učinkovitosti, še posebej pri tumorjih, neprimernih za kirurški poseg ali za drugo ablacijsko metodo zdravljenja (ClinicalTrials.gov, NCT02352259). Poleg tega v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana poteka klinična raziskava faze I na primarnih hepatocelularnih karcinomih, pri katerih standardni postopki zdravljenja niso izvedljivi. Raziskava še ni končana; prvi rezultati pa so spodbudni (ClinicalTrials.gov, NCT02291133).

Pomemben segment raziskovalnega dela, ki poteka v Sloveniji, so tudi tumorji glave in vratu. V okviru združenja InspECT poteka prospektivna klinična raziskava, ki zajema tako bazalnocelične kot tudi ploščatocelične karcinome v področju glave in vratu. Na Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana potekata še dve drugi, samostojni raziskavi. V prvo so vključeni bolniki z nemelanomskim rakom kože v področju glave in vratu, v drugo pa bolniki s sluzničnim rakom ustne votline in ustnega dela žrela ter v globini ležečimi tumorji. Na tem specifičnem področju uvajamo nekatere inovacije za bolj natančno postavitev elektrod s pomočjo navigacijskega sistema.⁴²

Zaključek

Elektrokemoterapija je lokalno zdravljenje, pri katerem z električnimi pulzi povečamo prepustnost celičnih membran in s tem vnos bleomicina ali cisplatin v celice. Do sedaj se je uspešno uporabljala po izčrpanem standardnem zdravljenju kožnih zasevkov melanoma, kar je kot indikacija za njeno uporabo navedeno v slovenskih smernicah za zdravljenje melanoma. Klinični rezultati retrospektivnih raziskav in metaanalize dokazujejo, da je elektrokemoterapija učinkovita tudi pri zdravljenju nemelanomskih tumorjev kože, kot so veliki, multipli ali recidivni bazalnocelični in ploščatocelični karcinomi. V teku je več kliničnih raziskav, ki preučujejo učinkovitost elektrokemoterapije v zdravljenju drugih histoloških vrst tumorjev ter tumorjev, ki se nahajajo globlje v telesu. Ta prizadevanja spremlja intenziven tehnološki razvoj, predvsem razvijanje ustreznih elektrod in sistemov za načrtovanje njihove postavitve in preverjanje natančnosti njihovega uvajanja.

Zahvala

Zahvaljujemo se Agenciji za raziskovalno dejavnost republike Slovenije za finančno podporo, ki ga je namenila za

projekte številka P2-0249, J3-5505 in P3-0003, ter francosko-slovenskemu združenemu laboratoriju LEA-EBAM (Joint European Laboratory – Electroporation in Biology and Medicine).

Literatura

- Weaver JC, Chizmadzhev YA. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochemistry Bioenerg* 1996; 41: 135–60.
- Kotnik T, Bobanovič F, Miklavčič D. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields—a theoretical analysis. *Bioelectrochemistry Bioenerg* 1997; 43: 285–91.
- Weaver JC. Electroporation of cells and tissues. *IEEE Trans Plasma Sci* 2000; 28: 24–33.
- Chen C, Smye SW, Robinson MP, Evans JA. Membrane electroporation theories: a review. *Med Biol Eng Comput* 2006; 44: 5–14.
- Puc M, Kotnik T, Mir LM, Miklavčič D. Quantitative model of small molecules uptake after in vitro cell electropermeabilization. *Bioelectrochemistry* 2003; 60: 1–10.
- Puc M. et al. Techniques of signal generation required for electropermeabilization: Survey of electropermeabilization devices. *Bioelectrochemistry* 2004; 64: 113–24.
- Orlowski S, Belehradec J, Paoletti C, Mir L. Transient electropermeabilization of cells in culture—increased of the cyto-toxicity of anticancer drugs. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 4727–33.
- Mir LM, Orlowski S, Belehradec J Jr, Paoletti C. Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 1991; 27: 68–72.
- Serša G, Čemažar M, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cisdiaminedichloroplatinum (II) in mice. *Cancer Res* 1995; 55: 3450–5.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene-transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric-fields. *EMBO J* 1982; 1: 841–5.
- Heller LC, Heller R. In vivo electroporation for gene therapy. *Hum Gene Ther* 2006; 17: 890–7.
- Daud AI, DeConti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26: 5896–903.
- Yarmush ML, Golberg A, Serša G, Kotnik T, Miklavčič D. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annu Rev Biomed Eng*. 2014; 16: 295–320.
- Trontelj K, Ušaj M, Miklavčič D. Cell electrofusion visualized with fluorescence microscopy. *J Vis Exp* 2010; 41: 1991.
- Zorec B, Prát V, Miklavčič D, Pavšelj N. Active enhancement methods for intra- and transdermal drug delivery: a review. *Zdrav Vestn* 2013; 82: 339–56.
- Kos Š, Tešič N, Kamenšek U, Blagus T, Čemažar M, Kranjc S et al. Improved specificity of gene electrotransfer to skin using pDNA under the control of collagen tissue-specific promoter. *J Memb Biology* 2015; 248: 919–28.
- Davalos R, Mir L, Rubinsky B. Tissue ablation with irreversible electroporation. *Ann Biomed Eng* 2005;33: 223-31.
- Rubinsky B. Irreversible electroporation in medicine. *Technol Cancer Res Treat* 2007; 6: 255.
- Maor E, Ivorra A, Rubinsky B: Non thermal irreversible electroporation: novel technology for vascular smooth muscle cells ablation. *PLoS ONE* 2009; 4: 4757.
- Pech M, Janitzky A, Wendler JJ, Strang C, Blaschke S, Dudeck O, et al. Irreversible electroporation of renal cell carcinoma: a first-in-man phase I clinical study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2011; 34: 132–8.
- Tracy CR, Kabbani W, Cadeddu JA. Irreversible electroporation (IRE): a novel method for renal tissue ablation. *BJU Int* 2011; 107: 1982–7.
- Bagla S, Papadouris D. Percutaneous irreversible electroporation of surgically unresectable pancreatic cancer: a case report. *J Vasc Interv Radiol* 2012; 23: 142–5.
- Golberg A, Yarmush ML: Nonthermal irreversible electroporation: fundamentals, applications, and challenges. *IEEE Trans Biomed Eng* 2013; 60: 707–14.
- Cheung W, Kavvounias H, Roberts S, Szkandera B, Kemp W, Thomson KR. Irreversible electroporation for unresectable hepatocellular carcinoma: initial experience and review of safety and outcomes. *Technol Cancer Res Treat* 2013; 12: 233–41.
- van Driel VJ, Neven K, van Wessel H, Vink A, Doevendans PA, Wittkamp FH. Low vulnerability of the right phrenic nerve to electroporation ablation. *Heart Rhythm*. 2015; 12: 1838–44.
- Neven K, van Driel VJ, van Wessel H, van Es R, Doevendans PA, Wittkamp FH. Epicardial linear electroporation ablation and lesion size. *Heart Rhythm* 2014; 11: 1465–70.
- Fred HM, Wittkamp FH, van Driel VJ, van Wessel H, Neven K, Gründeman PF et al. Minimal coronary artery damage by myocardial electroporation ablation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012; 5: 581–6.
- Jiang C, Davalos R, Bischof J. A Review of basic to clinical studies of irreversible electroporation therapy. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 2015; 62 suppl 1: 4–20.
- Miklavčič D, Mali B, Kos B, Heller R, Serša G. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *BioMedical Engineering OnLine* 2014; 13: 29.
- Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. Enhancement of cytotoxicity by electropermeabilization: an im-

- proved method for screening drugs. *Anticancer Drugs* 1998; 9: 319–25.
32. Jaroszeski MJ, Dang V, Pottinger C, Hickey J, Gilbert R, Heller R. Toxicity of anticancer agents mediated by electroporation in vitro. *Anticancer Drugs* 2000; 11: 201–8.
 33. Serša G, Miklavčič D, Čemažar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *EJSO* 2008; 34: 232–40.
 34. Mali B, Jarm T, Snoj M, Serša G, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *EJSO* 2013; 39: 4–16.
 35. Miklavčič D, Snoj M, Zupanič A, Kos B, Čemažar M, Kropivnik M et al. Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy. *Biomed Eng Online* 2010; 9: 10.
 36. Edhemovic I, Gadzijev EM, Breclj E, Miklavčič D, Kos B, Zupanič A et al. Electrochemotherapy: a new technological approach in treatment of metastases in the liver. *Technol Cancer Res Treat* 2011; 10: 475–85.
 37. Miklavčič D, Serša G, Breclj E, Gehl J, Soden D, Bianchi G et al. Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. *Med Biol Eng Comput* 2012; 50: 1213–25.
 38. 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.
 39. Serša G, Miklavčič D. Electrochemotherapy of tumours. Dostopno s spletne strani: <http://www.jove.com/video/1038/electrochemotherapy-of-tumours>.
 40. Escoffre JM, Rols MP. Electrochemotherapy: progress and prospects. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 3406–15.
 41. Serša G, Stabuc B, Čemažar M, Jančar B, Miklavčič D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: potentiation of local cisplatin antitumour effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1213–8.
 42. Županič A., Čorović S, Miklavčič D. Optimization of electrode position and electric pulse amplitude in electrochemotherapy. *Radiol Oncol* 2008; 42: 93–101.
 43. Grošelj A, Kos B, Čemažar M, Urbančič J, Kragelj G, Bošnjak M et al. Coupling treatment planning with navigation system: a new technological approach in treatment of head and neck tumors by electrochemotherapy. *Biomed Eng Online* 2015; 14 suppl 3: S2.
 44. Pucihar G, Mir LM, Miklavčič D. The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electroporabilized cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry* 2002; 57: 167–72.
 45. Županič A., Ribarič S, Miklavčič D. Increasing the repetition frequency of electric pulse delivery reduces unpleasant sensations that occur in electrochemotherapy. *Neoplasma* 2007; 54: 246–50.
 46. Mali B, Jarm T, Čorović S, Paulin-Kosir M, Čemažar M, Serša G, Miklavčič D. The effect of electroporation pulses on functioning of the heart. *Med Biol Eng Comput* 2008; 46: 745–57.
 47. Bianchi G, Campanacci L, Donati D. Electrochemotherapy in bone metastases: results of a phase II study. In: Serša G, Kersnik J, Lah T, Čemažar M, Filipič M, ed. 7th Conference on Experimental and Translational Oncology; 2013 april 20.-24.; Portorož, Slovenia. Ljubljana: Association of Radiology and Oncology; 2013. p. 46–7.
 48. Linnert M, Iversen HK, Gehl J. Multiple brain metastases—current management and perspectives for treatment with electrochemotherapy. *Radiol Oncol* 2012; 46: 271–8.
 49. Matthiessen LW, Johannesen HH, Hendel HW, Moss T, Kamby C, Gehl J: Electrochemotherapy for large cutaneous recurrence of breast cancer: a phase II clinical trial. *Acta Oncol* 2012; 51: 713–21.
 50. Campana LG, Valpione S, Falci C, Mocellin S, Basso M, Corti L et al. The activity and safety of electrochemotherapy in persistent chest wall recurrence from breast cancer after mastectomy: a phase-II study. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134: 1169–78.
 51. Granata V, Fusco R, Piccirillo M, Palaia R, Petrillo A, Lastoria S, Izzo F. Electrochemotherapy in locally advanced pancreatic cancer: preliminary results. *International Journal of Surgery* 2015; 18 suppl 1: S230-S236.
 52. Serša G, Čemažar M, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cisdiaminedichloroplatinum (II) in mice. *Cancer Res* 1995; 55: 3450–5.
 53. Heller R, Jaroszeski M, Leo-Messina J, Perrot R, Van Voorhis N, Reintgen D, Gilbert R: Treatment of B16 mouse melanoma with the combination of electroporation and chemotherapy. *Bioelectrochem Bioenerg*. 1995; 36: 83–87.
 54. Jaroszeski MJ, Gilbert RA, Heller R. In vivo antitumor effects of electrochemotherapy in a hepatoma model. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1334: 15–18.
 55. Pendas S, Jaroszeski MJ, Gilbert R, Hyacinthe M, Dang V, Hickey J et al. Direct delivery of chemotherapeutic agents for the treatment of hepatomas and sarcomas in rat models. *Radiol Oncol* 1998; 32: 53–64.
 56. Hyacinthe M, Jaroszeski MJ, Dang VV, Coppola D, Karl RC, Gilbert RA, Heller R: Electrically enhanced drug delivery for the treatment of soft tissue sarcoma. *Cancer* 1999; 85: 409–17.
 57. Čemažar M, Miklavčič D, Serša G. Intrinsic sensitivity of tumor cells to bleomycin as an indicator of tumor response to electrochemotherapy. *Jpn J Cancer Res Gann* 1998; 89: 328–33.
 58. Čemažar M, Miklavčič D, Mir L, Belehradek J Jr, Bonnay M, Fourcault D, Serša G: Electrochemotherapy of tumours resistant to cisplatin: a study in a murine tumour model. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1166–72.
 59. Serša G, Jarm T, Kotnik T, Coer A, Podkrajšek M, Šentjurc M et al. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *Br J Cancer* 2008; 98: 388–98.
 60. Markelc B, Serša G, Čemažar M. Differential mechanisms associated with vascular disrupting action of electrochemotherapy: intravital microscopy on the level of single normal and tumor blood vessels. *PLoS One* 2013; 8: e59557.

61. Jarm T, Čemažar M, Miklavčič D, Serša G. Anti-vascular effects of electrochemotherapy: implications in treatment of bleeding metastases. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10: 729–46.
62. Marty M, Serša G, Garbay J, Gehl J, Collins C, 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.
63. Serša G, Miklavčič D, Čemažar M, Belehradek J Jr, Jarm T, Mir LM. Electrochemotherapy with CDDP on LPB sarcoma: comparison of the anti-tumor effectiveness in immunocompetent and immunodeficient mice. *Bioelectrochem Bioenerg* 1997; 43: 279–83.
64. Muftuler LT, Hamamura MJ, Birgul O, Nalcioglu O: In vivo MRI electrical impedance tomography (MREIT) of tumors. *Technol Cancer Res Treat* 2006; 5: 381–7.
65. Okino M, Mohri H. Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in-vivo growing tumors. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78: 1319–21.
66. Belehradek J Jr, Orlowski S, Poddevin B, Paoletti C, Mir LM. Electrochemotherapy of spontaneous mammary tumours in mice. *Eur J Cancer* 1991; 27: 73–6.
67. 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: 2336–42.
68. Čemažar M, Tamzali Y, Serša G, Tozon N, Mir LM, Miklavčič D, et al. Electrochemotherapy in veterinary oncology. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 826–31.
69. Testori A, Tosti G, Martinoli C, Spadola G, Cataldo F, Verrecchia F, et al. Electrochemotherapy for cutaneous and subcutaneous tumor lesions: a novel therapeutic approach. *Dermatol Ther* 2010; 23: 651–61.
70. Mir LM, Gehl J, Serša G, Collins CG, Garbay JR, Billard V et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *Eur J Cancer Suppl* 2006; 4: 14–25.
71. Testori A, Soteldo J, Powell B, Sales F, Borgognoni L, Rutkowski P, et al. Surgical management of melanoma: an EORTC melanoma group survey. *Ecancermedicalscience* 2013; 7: 294.
72. 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: 148–57.
73. Larkin JO, Collins CG, Aarons S, Tangney M, Whelan M, O'Reilly S, et al. Electrochemotherapy: aspects of preclinical development and early clinical experience. *Ann Surg* 2007; 245: 469–79.
74. Mali B, Miklavčič D, Campana LG, Čemažar M, Serša G, Snoj M, Jarm T. Tumor size and effectiveness of electrochemotherapy. *Radiol. Oncol* 2013; 47: 32–41.
75. Spratt DE, Gordon Spratt EA, Wu S, DeRosa A, Lee NY, Lacouture ME, Barker CA. Efficacy of skin-directed therapy for cutaneous metastases from advanced cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2014; 32 suppl 28: 3144–55.
76. Pflugfelder A, Kochs C, Blum A, Capellaro M, Czeschik C, Dettenborn T, et al. Malignant melanoma S3-guideline “diagnosis, therapy and follow-up of melanoma.” *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG* 2013; 11 suppl 6:S1–S126.
77. Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malvehy J, Del M, Pehamberger H, et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer* 2015; 51: 1989–2007.
78. NICE: Electrochemotherapy for metastases in the skin from tumours of non-skin origin and melanoma: NICE interventional procedure guidance 446. Dosegljivo 13. 11. 2015 s spletne strani: <http://publications.nice.org.uk/electrochemotherapy-for-metastases-in-the-skin-from-tumoursof-non-skin-origin-and-melanoma-ipg446>.
79. NICE: Electrochemotherapy for primary basal cell carcinoma and primary squamous cell carcinoma: NICE interventional procedure guidance 447. Dosegljivo 13. 11. 2015 s spletne strani: <http://publications.nice.org.uk/electrochemotherapy-for-primary-basalcell-carcinoma-and-primary-squamous-cell-carcinoma-ipg447>.
80. Rudolf Z, Snoj M, Strojani P, Hočevar M, Ocvirk J, Bartenjev I. Priporočila za obravnavo bolnikov z malignim melanomom. In: *Novosti v onkologiji in smernice za obravnavo bolnic z rakom dojke in bolnikov z malignim melanomom*. Zbornik. Ljubljana: Kancerološko združenje slovenskega zdravniškega društva; 2004.
81. Gargiulo M, Moio M, Monda G, Parascandolo S, Cubicciotti G. Electrochemotherapy: actual considerations and clinical experience in head and neck cancers. *Ann Surg* 2010; 251: 773.
82. Mozzillo N, Caracò C, Mori S, Di Monta G, Botti G, Ascierto PA, et al. Feasibility of neoadjuvant electrochemotherapy for a large metastatic lesion of the cheek in a patient with melanoma. *Eur J Surg Oncol EJSO* 2012; 38: 999–1000.
83. Mozzillo N, Caracò C, Mori S, Di Monta G, Botti G, Ascierto PA, Caracò C, Aloj L: Use of neoadjuvant electrochemotherapy to treat a large metastatic lesion of the cheek in a patient with melanoma. *J Transl Med* 2012; 10: 131.
84. Carrera C, Bennassar A, Ishioka P, Dalle S, Vilalta A, Fuertes I, et al. Desmoplastic melanoma on the nose: electrochemotherapy as an alternative treatment to local advanced disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014 ;28: :424-32.
85. Salwa SP, Bourke MG, Forde PF, O'Shaughnessy M, O'Sullivan ST, Kelly EJ, et al. Electrochemotherapy for the treatment of ocular basal cell carcinoma; a novel adjunct in the disease management. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg* 2013; 67: 403–6.
86. Bianchi G, Campanacci L, Casadei R, Donatti D. Electrochemotherapy in the treatment of Bone metastases. 6th European Conference of the International Federation of Medical and Biological Engineering 2014, Dubrovnik, Croatia. s S3–1.3.
87. Miklavčič D, Beravs K, Šemrov D, Čemažar M, Demšar F, Serša G. The importance of electric field

- distribution for effective in vivo electroporation of tissues. *Biophys J* 1998; 74: 2152–8.
88. Miklavčič D, Čorovič 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.
 89. Pavliha D, Kos B, Županič A, Marčan M, Serša G, Miklavčič D- Patient-specific treatment planning of electrochemotherapy: Procedure design and possible pitfalls. *Bioelectrochemistry* 2012, 87: 265–73.
 90. Soden DM, Larkin JO, Collins CG, Tangney M, Aarons S, Piggott J, et al. Successful application of targeted electrochemotherapy using novel flexible electrodes and low dose bleomycin to solid tumours. *Cancer Lett* 2006; 232: 300–10.
 91. Mahmood F, Gehl J. Optimizing clinical performance and geometrical robustness of a new electrode device for intracranial tumor electroporation. *Bioelectrochemistry* 2011; 87: 65–273.
 92. Deodhar A, Dickfeld T, Single GW, Hamilton WC, Thornton RH, Sofocleous CT, et al. Irreversible electroporation near the heart: ventricular arrhythmias can be prevented with ECG synchronization. *Am J Roentgenol* 2011; 196: W330–5.
 93. Mali B, Jarm T, Čorovič S, Paulin-Košir M, Čemažar M, Serša G, Miklavčič D. The effect of electroporation pulses on functioning of the heart. *Med Biol Eng Comput* 2008; 46: 745–57.
 94. Mali B, Jarm T, Jager F, Miklavčič D. An algorithm for synchronization of in vivo electroporation with ECG. *J Med Eng Technol* 2005; 29: 288–96.
 95. Đokić M, Trotovšek B, Sojar V, Stanisavljević D, Janša R, Popovič P, et al. Treatment of primary liver tumors with electrochemotherapy – clinical trial. 1st World Congress on Electroporation. 2015 september 6.- 10.; Portorož, Slovenija. Parallel Scientific session Mon-A2-O6.
 96. Campana LG, Bianchi G, Mocellin S, Valpione S, Campanacci L, Brunello A, et al. Electrochemotherapy treatment of locally advanced and metastatic soft tissue sarcomas: results of a non-comparative phase II study. *World J Surg* 2014 Apr;38: 813-22.
 97. Bianchi G, Campanacci L, Donati D. Electrochemotherapy in bone metastases: results of a phase II study. In: Serša G, Kersnik J, Lah T, Čemažar M, Filipič M, ed. 7th Conference on Experimental and Translational Oncology; 2013 april 20.-24.; Portorož, Slovenia. Ljubljana: Association of Radiology and Oncology; 2013: 46–7.
 98. Bourke M, Salwa S, Forde P, Sadadcharam M, Larkin J, Collins C et al. Endoscopically targeted electrochemotherapy for the treatment of colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2012; 38: 1127–8.
 99. Linnert M, Iversen HK, Gehl J. Multiple brain metastases—current management and perspectives for treatment with electrochemotherapy. *Radiol Oncol.* 2012, 46: 271–8.