

Numerično modeliranje neinvazivne elektroporacije kože z večtočkovnimi elektrodami

Janja Dermol-Černe, Matej Reberšek, Damijan Miklavčič

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška cesta 25, 1000 Ljubljana

E-pošta: janja.dermol-cerne@fe.uni-lj.si

Numerical modeling of non-invasive skin electroporation using a multi-electrode array

Abstract. We numerically calculated electric field distribution in skin when delivering pulses with noninvasive multi-electrode array with rounded tips to achieve gene electrotransfer. We modeled the delivery of short high-voltage pulses, which were experimentally shown to successfully achieve DNA transfection. We build a model in MATLAB with LiveLink to Comsol Multiphysics. Skin was modeled as a block of several differently thick layers. Each layer was ascribed an initial electric conductivity which then increased as a sigmoidal function of the electric field. Pulses of 570 V amplitude were delivered between each electrode pair. Each pulse application changed the electric properties of tissue and the changed electric properties were then used as initial electric properties for the next pulse application. For each electrode pair, 6 consecutive studies were calculated to obtain convergence of results. We obtained the reversibly and irreversibly electroporated volume. We determined that reversible electroporation reaches 2.7 mm deep (in the hypodermis) and that irreversible electroporation reaches 0.56 mm deep (in the supply layer). Our results confirm the results from the literature - we can successfully electroporate the skin with the non-invasive multi-electrode array. The model can be used to optimize electrode configuration and pulse delivery in skin electroporation treatments.

1 Uvod

Elektroporacija kože je obetavna metoda, s katero povečamo prepustnost kože za različne učinkovine, kar uporabljamo pri genskem elektrotransferu, dermalnem vnosu učinkovin, pomlajevanju kože, elektrokemoterapiji in razkuževanju ran [1], [2]. Pri genskem elektrotransferu v kožo vnašamo plazmidno DNK ali RNK, s čimer dosežemo kratkoročno izražanje določenih genov, česar se poslužujemo pri imunoterapiji, celjenju ran in zdravljenju raka [3].

Pri elektroporaciji kože običajno na kožo dovajamo visokonapetostne pulze dolžine od nekaj mikrosekund do nekaj 100 ms. Različne plasti kože si lahko predstavljamo kot napetostni delilnik, kjer je večina padca napetosti in posledično visoko električno polje v najmanj prevodni roženi plasti. Najprej torej pride do nastanka lokalnih transportnih območij v roženi plasti

[4], [5]. Lokalna transportna območja so območja povečane električne prevodnosti in prepustnosti premera nekaj deset do nekaj sto mikrometrov. Povečana električna prevodnost lokalnih transportnih območij zniža upornost rožene plasti in omogoča, da električno polje prodre v globlje plasti kože. V globljih plasteh kože se torej posledično poveša električno polje in pride do nastanka por in povečane prepustnosti membran celic v spodnjih plasteh kože, kar je potreben pogoj za vnos plazmidov in za izražanje genov. Izjemno pomembno je, da torej tako električno polje kot tudi plazmid pridejo dovolj globoko, da se omogoči terapevtski učinek.

Za elektroporacijo kože je bilo v preteklosti uporabljenih veliko različnih elektrod in njihov pregled lahko najdemo v [1]. Elektrode delimo na invazivne, ki kožo predrejo, ali neinvazivne, ki kožo ne predrejo. Invazivne in neinvazivne elektrode predstavljajo različno tveganje za pacienta in so torej uvrščene v različne varnostne razrede standardov medicinskih pripomočkov. Prednost neinvazivnih elektrod je, da so prijazne do pacienta, med postavitvijo ne povzročajo bolečine in so z vidika certificiranja, proizvodnje in uporabe enostavnejše in cenejše. Pri našem delu smo se zato osredotočili na neinvazivne večtočkovne elektrode s heksagonalno razporeditvijo elektrodnih konic [3]. Z večtočkovnimi elektrodami lahko v primerjavi z drugimi neinvazivnimi elektrodami (ploščate in v obliki črke L [1]) dovajamo nižje napetosti, saj so elektrode blizu skupaj. Zaradi bližine elektrod so električni tokovi nižji, bolečina je posledično manjša, manj izrazito pa je tudi krčenje mišic.

Hitro, natančno in z minimalnim eksperimentalnim delom lahko učinkovitost elektroporacije opišemo in napovemo z matematičnim modeliranjem [6]. Z načrtovanjem posegov pred samim dovajanjem pulzov določimo najboljšo postavitev elektrod in parametre električnih pulzov, s katerimi bomo dosegli želen učinek, obenem pa zmanjšali neželeno škodo na okoliškem tkivu [7], [8]. Pri načrtovanju posegov genskega elektrotransfera želimo v tkivih doseči dovolj visoko električno poljsko jakost, ki je bila predhodno s poskusi določena kot dovoljšna za reverzibilno elektroporacijo, pri čemer se želimo ogniti uničenju tkiva z ireverzibilno elektroporacijo.

V okviru našega dela smo izračunali porazdelitev električnega polja in območji reverzibilno in ireverzibilno elektroporirane kože za genski elektrotransfer z neinvazivnimi večtočkovnimi elektrodami. Električno polje okoli neinvazivnih večtočkovnih elektrod do sedaj namreč še ni bilo

izračunano, izračuni električnega polja v koži pa so običajno narejeni za elektrokemoterapijo podkožnih tumorjev ali vnos učinkovin preko kože.

2 Metode

Model človeške kože smo razvili v programskem okolju MATLAB s povezavo do Comsola Multiphysics verzije 5.3. Geometrijo kože in njene električne lastnosti pred elektroporacijo smo povzeli iz [9], kjer so električne lastnosti plasti z visokim prostorninskim deležem celic izračunane numerično, plasti z nizkim prostorninskim deležem pa analitično s Hanai-Bruggemanovo formulo [10]. Kožo smo modelirali v treh dimenzijah kot kvader, sestavljen iz osmih različno debelih plasti. Od globlje do vrhnje so plasti naslednje: mišice (2 cm), podkožje (0,5 cm), spodnji žilni pleksus (0,1 mm), žilna plast (1 mm), zgornji žilni pleksus (80 μ m), zgornja plast usnjice (0,15 mm), povrhnjica (0,1 mm) in rožena plast (20 μ m). Geometrija modela je prikazana na sliki 1. Začetne vrednosti električnih prevodnosti posameznih plasti pred elektroporacijo so podane v tabeli 1. V modelu smo upoštevali tudi električno anizotropijo tkiv, saj so posamezne plasti kože različno prevodne v različnih smereh, kar vpliva na porazdelitev električnega polja. Električna prevodnost papilarnega dermisa in podkožja sta bili modelirani kot izotropni, za ostale plasti pa smo predpostavili anizotropno električno prevodnost.

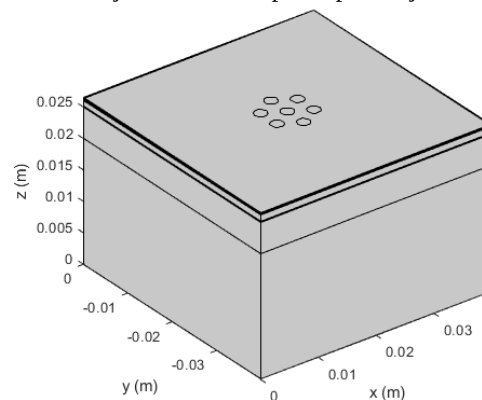
Tabela 1. Začetne prevodnosti posameznih plasti pred elektroporacijo v S/m. Vrednosti so bile povzete iz [9].

Plast	Prevodnost v x-smeri [S/m]	Prevodnost v y-smeri [S/m]	Prevodnost v z-smeri [S/m]
Rožena plast	1.10×10^{-2}	1.10×10^{-2}	2.23×10^{-4}
Povrhnjica	5.82×10^{-2}	5.82×10^{-2}	6.36×10^{-2}
Zg. plast usnjice*		7.19×10^{-2}	
Zg. žilni pleksus	4.22×10^{-1}	3.86×10^{-1}	3.86×10^{-1}
Žilna plast	3.12×10^{-1}	3.12×10^{-1}	3.19×10^{-1}
Sp. žilni pleksus	3.42×10^{-1}	3.28×10^{-1}	3.28×10^{-1}
Podkožje*		6.35×10^{-2}	
Mišice	1.57×10^{-2}	6.86×10^{-2}	1.57×10^{-2}

* Električne lastnosti zgornje plasti usnjice in podkožja so izotropne in torej enake v vse tri koordinatne smeri.

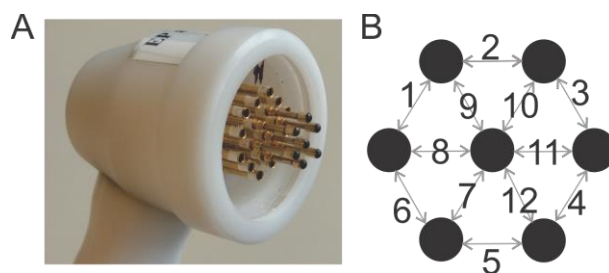
Predpostavili smo, da pride pri izpostavitvi kože dovolj visokim električnim poljem do elektroporacije, morda se v odvisnosti od jakosti električnega polja poveča električna prevodnost posameznih plasti [11]. Prevodnost rožene plasti se je tako povečala do stokrat, prevodnost mišic do 2,5-krat, prevodnost ostalih plasti pa do 3,5-krat. Sprememba prevodnosti je bila postopna in opisana s sigmoidno odvisnostjo od jakosti električnega polja [8]. S sigmoidno odvisnostjo

omejimo vrednost električne prevodnosti, ki tako ne gre nižje od začetne vrednosti in tudi pri izjemno visokih električnih poljih ne morejo biti višje od neke določene vrednosti, ki je lastna vsaki plasti posebej.



Slika 1. Koža je bila modelirana kot kvader z več plastmi (od globlje do vrhnje: mišice, podkožje, spodnji žilni pleksus, žilna plast, zgornji žilni pleksus, zgornja plast usnjice, povrhnjica in rožena plast). Nekatere plasti so tako tanke, da se jih v tem pogledu ne opazi. Na površini modela lahko vidimo obliko stika elektrod s kožo.

Za dovajanje električnih pulzov smo uporabili neinvazivne večtočkovne elektrode z zaobljenimi konicami, ki so prikazane na sliki 2A. Pulze smo dovedli zaporedno – najprej med pare elektrod na zunanjem obroču, nato pa še od vsake zunanje elektrode do sredinske elektrode. Shema dovajanja pulzov je prikazana na sliki 2B in je običajno uporabljena v študijah genskega elektrotranspota z neinvazivnimi večtočkovnimi elektrodami [3]. Med posamezne elektrode smo dovedli 570 V, kar je tipična napetost pri dovajanju 100 μ s pulzov. S temi parametri električnih pulzov so dosegli uspešno DNK vakcinacijo [3].



Slika 2. Elektrode, za katere smo naredili izračune. A) Fotografija elektrod. B) Shema dovajanja pulzov.

Elektroporacijo smo računali zaporedno in stacionarno, kot je opisano v [8]. To pomeni, da smo za vsako dovajanje med par elektrod izračunali svojo stacionarno študijo in nismo modelirali oblike pulzov. Za vsak par elektrod smo izračune zaporedno računali v šestih iteracijah, pri čemer je izračun prišel do konvergence že v petih iteracijah.

Med dovajanjem pulzov se je zaradi prodiranja električnega polja v tkivo spreminjala električna

prevodnost posameznih plasti. Spremenjene električne lastnosti kože na koncu izračuna smo shranili in naslednji izračun nato naredili z upoštevanjem spremenjenih električnih prevodnosti.

Tabela 1. Pragovi za reverzibilno in za ireverzibilno elektroporacijo v V/cm. Pragovi so bili vzeti iz [8].

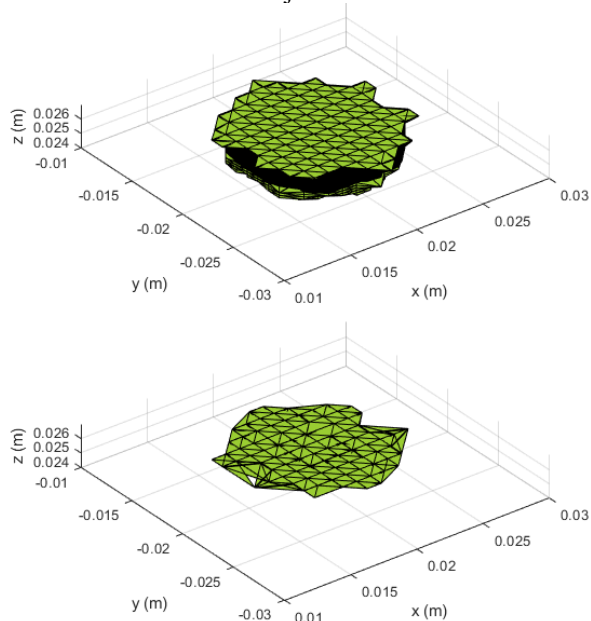
Plast	Prag za reverzibilno elektroporacijo [V/cm]	Prag za ireverzibilno elektroporacijo [V/cm]
Rožena plast	400	1200
Povrhnjica	400	1200
Zg. plast usnjice	300	1200
Zg. žilni pleksus	300	1200
Žilna plast	300	1200
Sp. žilni pleksus	300	1200
Podkožje	300	1200
Mišice*	200	800
	80	

* Višji prag je v pravokotni smeri in nižji prag v vzporedni smeri električnega polja glede na smer mišičnih vlaken.

3 Rezultati in diskusija

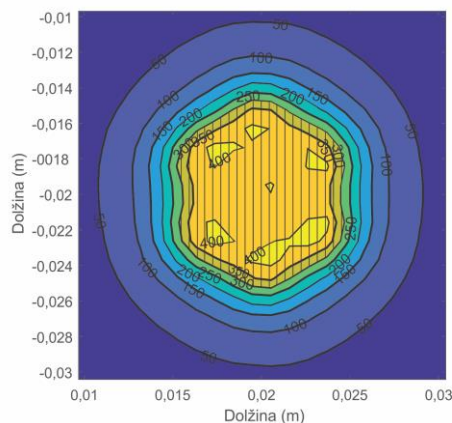
Zanimalo nas je, kako globoko je območje reverzibilne elektroporacije in kolikšna je ireverzibilna poškodba tkiva. Ustrezna globina reverzibilne elektroporacije namreč zagotavlja uspešno zdravljenje.

Na sliki 3 zgoraj lahko vidimo reverzibilno elektroporirano območje, na sliki 3 spodaj pa ireverzibilno elektroporirano območje. Reverzibilno elektroporacija prodre do globine 2,7 mm, kar se nahaja v podkožju. Ireverzibilna elektroporacija prodre do globine 0,56 mm, kar se nahaja v žilni plasti. Obe območji sta omejeni med elektrode, s čimer se zmanjša neželene bolečine in krčenje mišic.



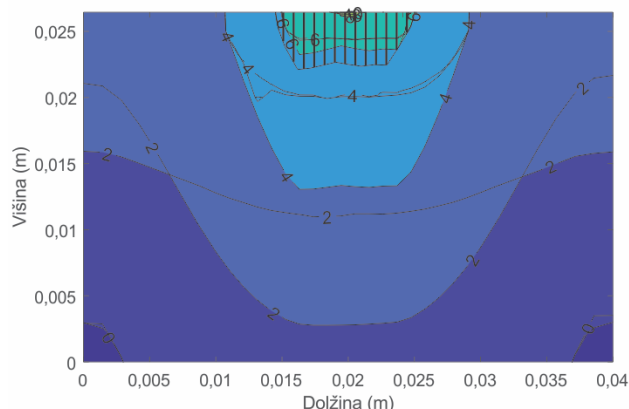
Slika 3. Zgoraj: reverzibilno elektroporirano območje. Spodaj: ireverzibilno elektroporirano območje.

Na sliki 4 lahko vidimo jakost električnega polja 2 mm pod površino kože, t. j. v podkožju. V podkožju so namreč celice, ki so sposobne izražanja genov in torej omogočajo učinkovito zdravljenje. Meja za reverzibilno elektroporacijo podkožja je 300 V/cm, kar smo presegli in torej uspešno elektroporirali celice v podkožju.



Slika 4. Jakost električnega polja v V/cm 2 mm pod površino kože v podkožju. Področje reverzibilne elektroporacije je označeno z vertikalnimi črtami.

Na sliki 5, ki prikazuje prerez po sredini med elektrodami, lahko opazimo, da je visoko električno polje omejeno v zgornje plasti kože. To je za nas ugodno, saj uhajavi tokovi povzročajo dodatno krčenje mišic in bolečino, čemur se pri zdravljenju z elektroporacijo želimo izogniti. Ravno zaradi ujetosti električnega polja med elektrode so večtočkovne elektrode bolj primerne za genski elektroprenos preko kože kot običajne ploščate elektrode [3]. Tudi tokovi med posameznimi pari so bili relativno nizki, do 290 mA, kar je na spodnji meji običajnih vrednosti pri zdravljenju kože z elektroporacijo (od 0.1 A – 3 A) [12].



Slika 5. Stranski pogled na logaritem jakosti električnega polja v V/cm. Področje reverzibilne elektroporacije je označeno z vertikalnimi črtami. Logaritem je bil izbran, ker so v tem pogledu jakosti električnega polja različne za velikostne razrede in se sicer ne vidi dobro razlik.

Vpliv različnih oblik in dolžin pulzov pri stacionarnem sekvenčnem izračunu upoštevamo posredno s pragovi elektroporacije in pri spremembah električne prevodnosti. Znano je namreč, da za daljše

pulze potrebujemo nižjo električno poljsko jakost kot za krajše pulze, da dosežemo elektroporacijo [13], [14]. Model bi lahko tudi prilagodili za daljše milisekundne nizkonapetostne pulze, s katerimi so z večtočkovnimi elektrodami dosegli optimalno celjenje ran [3].

Delujoč model elektroporacije kože omogoča prilagajanje parametrov pulzov in geometrije elektrod z minimalnimi poskusi na živalih. S prilagajanjem globine reverzibilno elektroporiranega območja lahko spreminjamo cilj elektroprenosa – elektroprenos v površinske sloje kože je primeren za molekule z lokalnim načinom delovanja, elektroprenos v globlje sloje kože pa je primeren za molekule s sistemskih načinom delovanja [3]. Prav tako lahko model uporabimo za izračun s kakršnimi koli neinvazivnimi elektrodami. Preprosto je tudi spreminjanje začetnih vrednosti električne prevodnosti ter debeline plasti kože, kar omogoča prilagajanje modela za različne živalske vrste ali različne lokacije na telesu [15].

4 Zaključek

V pričujoči študiji smo numerično izračunali porazdelitev električnega polja v koži pri genskem elektroprenosu z neinvazivnimi večtočkovnimi elektrodami z zaobljenimi konicami. Modelirali smo dovajanje kratkih visokonapetostnih pulzov, s katerimi so v preteklosti eksperimentalno dosegli uspešen elektroprenos. Naši rezultati potrjujejo eksperimentalno pridobljene rezultate, da lahko z neinvazivnimi večtočkovnimi elektrodami uspešno elektroporiramo kožo. V nadaljevanju lahko z modelom prilagajamo postavitev elektrod in zaporedje dovajanja pulzov pri elektroporaciji kože glede na želeni učinek elektroporacije kože.

Zahvala

Študijo sta delno financirali ARRS in delno Evropski sklad za regionalni razvoj (ESRR) in Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport v okviru projekta SmartGene.si.

Literatura

- [1] J. Dermol-Černe, E. Pirc, in D. Miklavčič, „Mechanistic view of skin electroporation – models and dosimetry for successful applications: an expert review“, *Expert Opinion on Drug Delivery*, let. 17, št. 5, str. 689–704, maj 2020, doi: 10.1080/17425247.2020.1745772.
- [2] B. Zorec, V. Prétat, D. Miklavčič, in N. Pavšelj, „Active enhancement methods for intra- and transdermal drug delivery: a review“, *Zdravniški vestnik*, let. 82, št. 5, str. 339–56, 2013.
- [3] Š. Kos idr., „Gene electrotransfer into skin using noninvasive multi-electrode array for vaccination and wound healing“, *Bioelectrochemistry*, let. 114, str. 33–41, apr. 2017, doi: 10.1016/j.bioelechem.2016.12.002.
- [4] T. R. Gowrishankar, T. O. Herndon, T. E. Vaughan, in J. C. Weaver, „Spatially constrained localized transport regions due to skin electroporation“, *Journal of Controlled Release*, let. 60, št. 1, str. 101–110, jun. 1999, doi: 10.1016/S0168-3659(99)00064-4.
- [5] S. Becker, B. Zorec, D. Miklavčič, in N. Pavšelj, „Transdermal transport pathway creation: Electroporation pulse order“, *Mathematical Biosciences*, let. 257, str. 60–68, nov. 2014, doi: 10.1016/j.mbs.2014.07.001.
- [6] J. Dermol-Černe in D. Miklavčič, „Modeliranje elektroporacije na več ravneh“, *Elektrotehniški vestnik*, let. 86, št. 4, str. 161–167, 2019.
- [7] A. Županič, B. Kos, in D. Miklavčič, „Treatment planning of electroporation-based medical interventions: electrochemotherapy, gene electrotransfer and irreversible electroporation“, *Physics in Medicine and Biology*, let. 57, št. 17, str. 5425–5440, 2012, doi: 10.1088/0031-9155/57/17/5425.
- [8] S. Čorović, I. Lacković, P. Šuštar, 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, doi: 10.1186/1475-925X-12-16.
- [9] 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, doi: 10.1109/TBME.2017.2773126.
- [10] 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, doi: 10.1088/0022-3727/45/2/025301.
- [11] N. Pavšelj, Z. Bregar, D. Cukjati, D. Batiškaitė, L. M. Mir, in D. Miklavčič, „The Course of Tissue Permeabilization Studied on a Mathematical Model of a Subcutaneous Tumor in Small Animals“, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, let. 52, št. 8, str. 1373–1381, avg. 2005, doi: 10.1109/TBME.2005.851524.
- [12] R. Vanbever in V. Prétat, „In vivo efficacy and safety of skin electroporation“, *Advanced Drug Delivery Reviews*, let. 35, št. 1, str. 77–88, jan. 1999, doi: 10.1016/S0169-409X(98)00064-7.
- [13] J. C. Weaver, K. C. Smith, A. T. Esser, R. S. Son, in T. R. Gowrishankar, „A brief overview of electroporation pulse strength–duration space: A region where additional intracellular effects are expected“, *Bioelectrochemistry*, let. 87, str. 236–243, okt. 2012, doi: 10.1016/j.bioelechem.2012.02.007.
- [14] J. Dermol-Černe, T. Batista Napotnik, M. Reberšek, in D. Miklavčič, „Short microsecond pulses achieve homogeneous electroporation of elongated biological cells irrespective of their orientation in electric field“, *Sci Rep*, let. 10, št. 1, str. 9149, dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-65830-3.
- [15] D. C. Carrer, C. Vermehren, in L. A. Bagatolli, „Pig skin structure and transdermal delivery of liposomes: A two photon microscopy study“, *Journal of Controlled Release*, let. 132, št. 1, str. 12–20, nov. 2008, doi: 10.1016/j.jconrel.2008.08.006.