

Eksperimentalna onkologija

Gregor Serša

V eksperimentalni onkologiji potekajo bazične raziskave o biologiji tumorjev in se razvijajo nove zvrsti zdravljenja. Že zelo zgodaj se je eksperimentalna onkologija usmerila v raziskovanje mehanizmov delovanja novih - ali kombinacije že obstoječih - vrst zdravljenja, predvsem pa v preizkušanje njihove protitumorske učinkovitosti. Eksperimentalna onkologija se je tako uveljavila in dobila pomembno mesto pri uvajanju novih načinov zdravljenja v klinično onkologijo. Razvoj klinične onkologije torej temelji na vedno novih spoznanjih o biologiji tumorjev in o mehanizmi delovanja različnih terapij, poleg bazičnega razvoja in raziskav pa predklinična onkologija rešuje tudi probleme in neznanke, ki se pojavljajo v klinični onkologiji, saj metode predkliničnih poskusov omogočajo natančne in kontrolirane pogoje, ki jih v kliniki ni mogoče doseči. Prav povezanost predklinične in klinične onkologije vodi v vse uspešnejše zdravljenje malignih bolezni.

METODE DELA

Raziskovanje v eksperimentalni onkologiji ne bi bilo možno brez ustreznih metod, s katerimi testiramo učinkovitost protitumorskega delovanja novega načina zdravljenja raka. Večina študij se začne na celicah, v umetnih pogojih, ki jih poskušamo čim bolj približati pogojem v organizmu. Poskusi na celičnem nivoju, ki jih imenujemo *in vitro*, nam dajo pomembno informacijo o delovanju terapije neposredno na celico. Uspešnost terapije pa ni odvisna samo od neposrednega delovanja na tumorsko celico, saj v kompleksnih pogojih, ki vladajo v organizmu, vplivajo na uspešnost terapije tudi dejavniki organizma, kot so imunski sistem, prekrvavljenost tumorjev, stanje kritičnih normalnih tkiv itd. Zato moramo pred klinično fazo poskusa preveriti delovanje nove terapije tudi na poskusnih živalih. Poskusi na živalih, ki jih imenujemo *in vivo*, so v zadnjih letih zelo napredovali. Na voljo imamo banke, v katerih hranijo različne živalske in humane tumorje, ki jih lahko presajamo bodisi v navadne bodisi v imunsko ali genetsko spremenjene živali in na njih testiramo uspešnost zdravljenja. Rezultati teh poskusov so zelo pomembni, saj nam dajo poleg informacije o tem, kako terapija deluje na tumor, tudi informacijo o tem, kako organizem vpliva na novo terapijo, oziroma, kako se nanjo odziva. Z razvojem metod molekularne biologije se je v predklinični onkologiji odprlo novo področje. S temi metodami lahko raziskujemo mehanizme nastanka raka na molekularnem nivoju, omogočajo pa nam tudi nove načine zdravljenja raka (genska terapija), ki že prehajajo iz predklinične v klinično fazo. Ostaja pa še veliko neznank, ki jih bo treba razjasniti, preden bomo tako terapijo sprejeli v redno klinično delo.

TORIŠČA EKSPERIMENTALNE ONKOLOGIJE NA ONKOLOŠKEM INŠTITUTU

Zgodovinsko lahko opredelimo začetek eksperimentalne onkologije v Sloveniji z ustanovitvijo onkološkega eksperimentalnega laboratorija v brežiški bolnišnici leta 1920. Njegov ustanovitelj, dr. Josip Cholewa, je tako postavil temelje tudi za razvoj Oddelka za tumorsko biologijo na Onkološkem inštitutu.

Na Oddelku za tumorsko biologijo poteka več raziskovalnih programov, katerih cilj je prenos predkliničnega znanja v kliniko. Glede na vsebino jih lahko razdelimo v štiri sklope: biološko terapijo, dostavljanje zdravil na mesto delovanja, radiobiologijo in terapijo, usmerjeno v kontrolo pretoka krvi v tumorju.

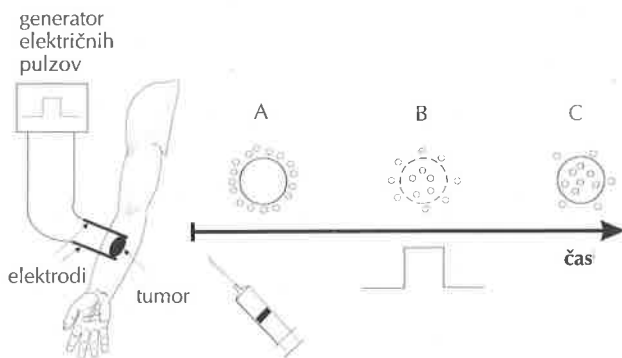
Biološka terapija

Biološka terapija je zdravljenje tumorjev s snovmi, ki so lastne organizmu. V to vrsto terapije uvrščamo zdravljenje s tumorskimi vakcinami in z modifikatorji biološkega odziva. Tumorske vakcine so sicer že dolgo časa znan način zdravljenja raka, z napredkom molekularne biologije pa se v zadnjem času to področje zelo razvija (1,2). Z vnosom genov za različne modifikatorje biološkega odziva v celice organizma, ki so neaktivne, lahko za določen čas vzbudimo izločanje citokinov. Citokini ojačajo specifičen imunski odgovor in s tem vplivajo na rast tumorjev. Namen našega projekta z naslovom »Priprava avtolognih tumorskih vakcin«, katerega nosilec je Srdjan Novaković, je pripraviti avtologne tumorske vakcine, ki bodo izločale IL-2, TNF- α ali GM-CSF. Delo na tem projektu je trenutno v fazi priprave gena TNF- α za transfekcijo v celice. Naslednja stopnja bo priprava vakcin, ki jih bomo testirali na poskusnih živalih in v končni fazi v kliničnem poskusu. V sklopu teh dejavnosti testiramo tudi biološko aktivnost analogov humanega TNF- α , ki jih pripravljajo kolegi iz tovarne Lek in Nacionalnega inštituta za kemijo. Namen tega projekta je z gensko manipulacijo pripraviti spremenjene molekule TNF- α , ki bi ohranile citotoksičnost, a bi imele manj stranskih učinkov (3). Dosedanji rezultati na tem področju so obetajoči, čeprav bo potrebno še veliko dela, preden bodo ti analogi na voljo za zdravljenje prvih bolnikov.

Dostavljanje zdravil

Pri zdravljenju raka zelo pogosto uporabljamo kemoterapijo. Njena glavna slabost je v tem, da ni dovolj selektivna, saj ne deluje le na tumorske celice, temveč tudi na zdrave celice organizma. Zato se mnogo raziskovalcev

posveča problemu, kako bi do tumorja selektivno dostavili večje količine zdravil in kako bi povečali vnos kemoterapevtikov prav v tumorske celice. Eden od načinov, kako to doseči, je uporaba električnih pulzov, ki jih dovedemo neposredno na tumor (slika 1). Za tako terapijo, ki so jo poimenovali elektrokemoterapija, so primerni



Slika 1. Elektrokemoterapija tumorja. A. Molekule vbrizganega zdravila obkrožijo tumorske celice. B: Pulz visoke napetosti povzroči nastanek por v celični membrani. Molekule zdravila vstopijo v celično notranjost. C: Pore se zaprejo, molekule ostanejo v celici in lahko delujejo citotoksično.

predvsem tisti kemoterapevtiki, ki delujejo citotoksično znotraj celice, hkrati pa težko prehajajo preko celične membrane. Dosedanje raziskave so pokazale, da sta za elektrokemoterapijo primerna predvsem dva kemoterapevtika, bleomicin in cisplatin. Raziskovalna dejavnost na tem področju je zajeta v projektu z naslovom »Elektrokemoterapija, nov pristop k zdravljenju raka« (nosilec: Gregor Serša), ki poteka v sodelovanju z Laboratorijem za biokibernetiko Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Naše začetne, in vitro raziskave so pokazale, da električni pulzi povečajo citotoksičnost bleomicina in cisplatina (4-6). Po uspešnih rezultatih smo nadaljevali z raziskavami in vivo na laboratorijskih miškah (7-9). Ugotovili smo, da je v obeh primerih terapija zelo uspešna. Stranskih pojavov nismo opazili, kar je razumljivo, saj je pri tej obliki terapije - zaradi izredno povečanega vnosa kemoterapevtika v tumorske celice - potrebna le zelo majhna količina zdravila. Po uspešnih poskusih na predkliničnem nivoju smo nadaljevali s kliničnimi študijami. Rezultati naših kliničnih študij o uporabi elektrokemoterapije z bleomicinom in cisplatinom kažejo, da je ta terapija uspešna pri zdravljenju kožnih tumorjev - malignega melanoma ter bazalnoceličnega in ploščatoceličnega karcinoma. Rezultate raziskav smo objavili v mednarodnih revijah (10-12), sedaj pa načrtujemo nove študije, v katerih bomo testirali elektrokemoterapijo še pri drugih vrstah tumorjev. Z razvojem domače aparature za elektrokemoterapijo načrtujemo tudi zdravljenje tumorjev v notranjih organih (13).

Drugi del raziskav je usmerjen v preučevanje učinkov vinblastina na fluidnost celične membrane (projekt »Racionalna diagnostika in zdravljenje tumorjev ščitnice«, nosilec: Marija Auersperg). Ugotovili smo, da vinblastin v dozah, ki niso citotoksične, poveča fluidnost celične

membrane (14-16). Ta ugotovitev je pomembna, saj predvidevamo, da lahko s primernimi odmerki vinblastina povečamo vnos nekaterih drugih kemoterapevtikov in tako dosežemo njihovo večjo citotoksičnost. Vse našete raziskave so pomembne za prenos v kliniko, saj z uporabo metod za dostavljanje zdravil dosežemo večjo selektivnost kemoterapevtikov za tumorske celice, kar vodi v večjo protitumorsko aktivnost, manj pa je tudi stranskih pojavov.

Radiobiologija

Radiobiologija je veda, ki raziskuje biološke posledice obsevalnega zdravljenja na tumorske in na zdrave celice. Biološki učinki obsevalnega zdravljenja so že dobro raziskani, le malo pa vemo o učinkih obsevalnega zdravljenja v kombinaciji z drugimi terapijami. Znano je, da nekateri kemoterapevtiki izboljšajo odgovor tumorjev na obsevalno zdravljenje, zato smo se na našem Oddelku odločili, da bomo začeli raziskovati, ali elektrokemoterapija s cisplatinom poveča protitumorsko delovanje obsevalnega zdravljenja. Cisplatin je kemoterapevtik, za katerega je že dolgo znano, da poveča odgovor tumorja na obsevalno zdravljenje. Ker z uporabo električnih pulzov povečamo količino cisplatina v tumorskih celicah, lahko pričakujemo, da bomo s kombinacijo tega kemoterapevtika in električnih pulzov še bolj izboljšali protitumorsko delovanje obsevalnega zdravljenja.

Drugi del raziskav na področju radiobiologije je usmerjen v terapijo z zajetjem nevtronov v boru. Pri tej terapiji v tumorske celice uvedemo element bor, ki ga nato obsevamo z nevtroni, kar povzroči razpad bora na lokalno zelo citotoksične delce alfa in litijeva jedra. Uspešnost zdravljenja je odvisna od selektivnega vnosa in količine bora v tumorskih celicah; stranskim pojavom in poškodbam zdravih tkiv se težko izognemo. V projektu z naslovom »Terapija z zajetjem nevtronov v boru - uporaba sistemov za povečanje vnosa bora z namenom izboljšati protitumorski učinek«, katerega nosilec je Janez Škrk, preučujemo, ali lahko z uporabo električnih pulzov povečamo vnos bora v tumorske celice. Ugotovili smo, da je kopičenje bora odvisno od vrste tumorskih celic in da lahko z električnimi pulzi povečamo količino bora tudi v tistih celicah, pri katerih bor sicer težko prehaja skozi celično membrano. Rezultati in vivo poskusov pa kažejo, da se bor zadržuje dalj časa v tumorjih, ki so bili izpostavljeni električnim pulzom, kar omogoča daljše časovno obdobje, v katerem še lahko pričakujemo uspešno terapijo z zajetjem nevtronov v boru (17).

Terapija, usmerjena v kontrolo pretoka krvi v tumorju

Prekrvavitev tumorjev je precej drugačna kot v normalnih tkivih. Arhitektura žil je neurejena, žile so nezrele in pretok krvi v tumorjih je zato neenakomeren. Te specifične lastnosti žilja tumorjev so omogočile razvoj različnih terapij. Na žilje tumorjev lahko delujemo direktno, tako da preprečimo nastanek novih žil (antiangiogena terapija), ali pa selektivno delujemo na obstoječe žilje tumorja, tako da pretok krvi ustavimo oziroma zmanjšamo. V naših raziskavah smo ugotovili, da se po aplikaciji električnih pulzov pretok krvi v tumorjih zmanjša. Ta mehanizem

delovanja električnih pulzov ni pomemben samo pri elektrokemoterapiji, kjer poleg večjega vnosa kemoterapevtika v tumorske celice podaljšamo tudi čas delovanja kemoterapevtika v tumorjih (18), ampak ima uporabno vrednost tudi v kombinaciji z drugimi načini zdravljenja. Ko se ustavi pretok krvi, začno po določenem času tumorske celice v tkivu okoli žil zaradi pomanjkanja kisika in hranilnih snovi odmirati. Poleg tega zadržimo v tumorju molekule, ki so aktivne samo v pogojih, kjer je malo kisika. Take molekule imenujemo bioreduktivna zdravila in se v zadnjem času vse bolj uporabljajo. Aplikacija električnih pulzov na tumor lahko povzroči primerne pogoje za bioreduktivna zdravila le na mestu aplikacije, to je v tumorju, v drugih tkivih pa ne. Zato lahko pričakujemo še selektivnejše delovanje takih zdravil.

Delovanje električnih pulzov na žilje tumorjev lahko s pridom izkoristimo tudi v kombinaciji s hipertermijo. Hipertermija je uspešnejša, če so zagotovljeni suboptimalni pogoji za rast celic, to je nizek pH in nizka koncentracija kisika v tkivu. Ker z električnimi pulzi zagotovimo take pogoje, lahko pričakujemo optimalno delovanje kombinacije hipertermije in električnih pulzov.

SKLEP

Na koncu bi rad še enkrat poudaril pomen eksperimentalne onkologije za napredek pri zdravljenju raka. Mnoga spoznanja iz predkliničnih raziskav so pri zdravljenju raka uporabna. Za prenos tega znanja v kliniko je potrebno uporabiti rezultate bazičnih raziskav in jih najprej ovrednotiti na predkliničnem nivoju. Šele takrat je nova metoda zdravljenja pripravljena za prenos v klinični poskus. Vsako tako delo zahteva veliko raziskav, ki so ponavadi dolgotrajne, mnoge med njimi pa iz različnih razlogov nikoli ne pridejo do klinične uporabe.

Literatura

- Novaković S. Current approaches to gene therapy in oncology: Construction of tumor vaccines. *Radiol Oncol* 1996; 30: 260-7.
- Novaković S, Jezeršek B. Simple but extremely effective autologous tumor vaccines. *Radiol Oncol* 1998; 32: 303-9.
- Novaković S, Menart V, Gaberc-Porekar V, Štalc A, Serša G, Čemažar M, Jezeršek B. New TNF- α analogues: less toxic biological tool against tumours. *Cytokine* 1997; 9: 597-604.
- Mir LM, Orłowski S, Belehradec J, Jr, Tessie J, Rols MP, Serša G, Miklavčič D, Gilbert R, Heller R. Biomedical applications of electric pulses with special emphasis on antitumor electrochemotherapy. *Bioelectroch Bioener* 1995; 38: 203-7.
- Čemažar M, Jarm T, Miklavčič D, Maček Lebar A, Ihan A, Kopitar NA, Serša G. Effect of electric-field intensity on electroporability and electrosensitivity of various tumor-cell lines in vitro. *Electro Magnetobiol* 1998; 17: 263-72.
- Čemažar M, Serša G, Miklavčič D. Electrochemotherapy with cisplatin in treatment of tumor cell resistant to cisplatin. *Anticancer Res* 1998; v tisku
- Serša G, Čemažar M, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice. *Cancer Res* 1995; 55: 3450-5.
- Čemažar M, Milačič R, Miklavčič D, Dolžan V, Serša G. Intratumoral cisplatin administration in electrochemotherapy: antitumor effectiveness, sequence dependence and platinum content. *Anticancer Drugs* 1998; 9: 525-30.
- Serša G, Čemažar M, Menart V, Gaberc-Porekar V, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy is increased by TNF- α on SA-1 tumors in mice. *Cancer Letters* 1997; 116: 85-92.
- Rudolf Z, Štabuc B, Čemažar M, Miklavčič D, Vodovnik L, Serša G. Electrochemotherapy with bleomycin: the first clinical experience in malignant melanoma patients. *Radiol Oncol* 1995; 29: 229-35.
- Mir LM, Glass LF, Serša G, Teissie J, Domenge C, Miklavčič D, Jaroszeski MJ, Orłowski S, Reintgen DS, Rudolf Z, Belehradec M, Gilbert R, Rols MP, Belehradec JJr, Bachaud JM, DeConti R, Štabuc B, Čemažar M, Coninx P, Heller R. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumors by electrochemotherapy. *Brit J Cancer* 1998; 77: 2336-42.
- Serša G, Štabuc B, Čemažar M, Jančar B, Miklavčič D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: Potentiation of local cisplatin antitumor effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1213-8.
- 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.
- Čemažar M, Auersperg M, Serša G. Vinblastine increases antitumor effectiveness of bleomycin. *Radiol Oncol* 1997; 31: 364-7.
- Veranič P, Jezernik K, Čemažar M, Serša G. In vivo electroporation of the urinary bladder in mice. *Radiol Oncol* 1998; 32: 187-91.
- Šentjurski M, Zorec M, Čemažar M, Auersperg M, Serša G. Effect of vinblastine on cell membrane fluidity in vinblastine-sensitive and -resistant HeLa cells. *Cancer Letters* 1998; 130: 183-90.
- Čemažar M, Škrk J, Mitrovič B, Serša G. Increased delivery of boron to tumours using electroporation for boron neutron capture therapy. *Brit J Radiol* 1998; submitted.
- Serša G, Beravs K, Čemažar M, Miklavčič D, Demšar F. Contrast enhanced MRI assessment of tumor blood volume after application of electric pulses. *Electro Magnetobiol* 1998; 17: 299-306.