

Elektrokemoterapija postaja standardno zdravljenje

G. Serša, M. Čemažar, D. Miklavčič in Z. Rudolf

Povzetek

Elektrokemoterapija je način zdravljenja raka, ki združuje uporabo standardnih kemoterapevtikov in dovedenih električnih pulzov na območje tumorja. Z električnimi pulzi povzročimo destabilizacijo celične membrane, in posledično omogočimo lažje vstopanje citostatikov v celico, ki imajo sicer slabo prehajanje skozi membrano. Tako se večkrat poveča citotoksičnost citostatikov, kot sta cisplatin ali bleomicin, s tem pa se poveča tudi njihova protitumorska učinkovitost, posebno na mestu kamor dovedemo električne pulze. Zaradi selektivno povečanega vnosa samo na območju tumorja je terapevtski indeks elektrokemoterapije zelo dober, dobra je namreč lokalna protitumorska učinkovitost brez stranskih pojavov, lokalnih ali sistemskih bodisi zaradi kemoterapevtikov ali električnih pulzov. Po številnih predkliničnih raziskavah je bila elektrokemoterapija preizkušena tudi v mnogih kliničnih raziskavah. Elektrokemoterapija je učinkovita na vrsti histološko različnih tumorskih nodulov v koži ali podkožju, s 60–80 % objektivnih odgovorov tumorjev. Sedaj je na voljo nov generator električnih pulzov s pripadajočimi elektrodami, pripravljeni pa so tudi standardni postopki za zdravljenje z elektrokemoterapijo. S tem je omogočeno, da elektrokemoterapija postane standardno zdravljenje v onkologiji za uspešen lokalni nadzor rasti kožnih in podkožnih lezij različnih vrst raka, in je plod skupnega dela več evropskih onkoloških centrov.

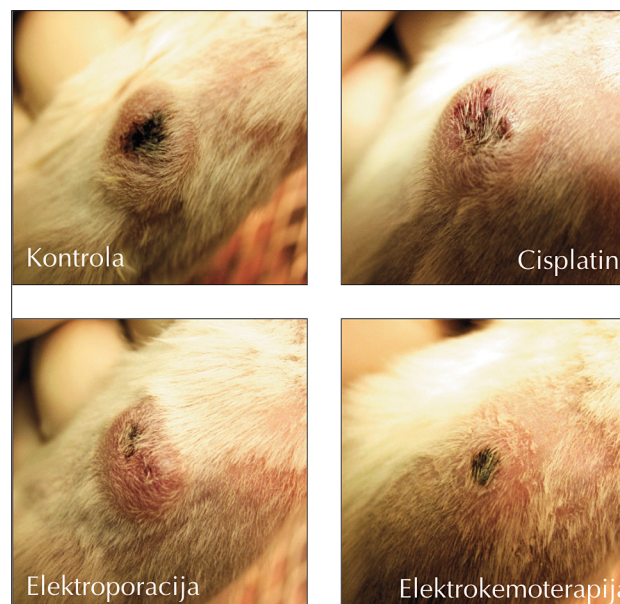
Kaj je elektrokemoterapija?

Kemoterapija solidnih tumorjev je učinkovita, če kemoterapevtiki vstopajo v tumorske celice in dosežejo svoje znotrajcelične tarče za citotoksično delovanje. Zato morajo po krvi priti do tumorja, tumorskih celic in skozi celično membrano v celico. Nekateri citostatiki, kot sta cisplatin in bleomicin, težko vstopajo v celico, ker je njihov transport prek celične membrane otežen, ko pa so v celici, imajo učinkovito citotoksično delovanje.

Za povečanje vnosa citostatikov je na voljo več načinov, kako povečati prepustnost celičnih membran, od kemičnih do fizikalnih. Med fizikalnimi je najbolj znana elektroporacija, ki se že dalj časa uporablja pri delu na celičnih kulturah *in vitro*, ne samo za vnašanje kemičnih spojin, ampak tudi gole DNA. V zadnjih desetih letih je postala elektroporacija izvedljiva tudi *in vivo*, s primernimi električnimi pulzi, ki jih dovedemo na mesto, kjer želimo povečati prepustnost celičnih membran celic v nekem tkivu.

Elektroporacija celic s pravokotnimi električnimi pulzi poveča citotoksičnost cisplatina za 80-krat in bleomicina za

800-krat (1, 2). To izredno povečanje citotoksičnosti teh dveh citostatikov je možno tudi *in vivo* pri zdravljenju tumorjev. Kombinacijo zdravljenja s citostatiki in električnimi pulzi imenujemo **elektrokemoterapija**. Predklinične raziskave elektrokemoterapije s cisplatinom ali bleomicinom so pokazale, da je izredno učinkovita. Pri uporabi majhnih odmerkov citostatikov, ki nimajo stranskih učinkov in tudi sami nimajo protitumorskega učinka, z električnimi pulzi dovedenimi na tumor takrat, ko je v tumorju največja koncentracija citostatika, dosežemo popolne odgovore tumorja na zdravljenje. Taka protitumorska učinkovitost je bila dokazana na različnih vrstah tumorjev, od sarkomov, karcinomov do malignega melanoma, na različnih poskusnih živalih, kot so laboratorijske miši, podgane, zajci, mačke, morski prašički, psi in konji (3, 4) (slika 1).



Slika 1. Učinek elektrokemoterapije s cisplatinom na podkožnih poskusnih tumorjih laboratorijskih miši. Deset dni po zdravljenju so tumorji izginili, medtem ko so po zdravljenju samo s cisplatinom ali električnimi pulzi rasli neovirano enako hitro kot kontrolna nezdravljena skupina.

Mehanizmov delovanja elektrokemoterapije je več. Elektroporacija povzroči povečanje koncentracije citostatikov v tumorskih celicah in s tem večjo citotoksičnost. Z električnimi pulzi dovedenimi na tumor selektivno v žilju tumorja začasno, a učinkovito ustavimo krvni pretok, bolj kot v normalnih tkivih, kjer je žilje bolje organizirano. S to začasno zaporo podaljšamo čas

zadrževanja in delovanja citostatika v tumorju. Ker pa z električnimi pulzi elektroporiramo vse celice v tumorju, z elektrokemoterapijo povzročimo tudi poškodbe endotelija žil v tumorju in s tem na tumor delujemo žilnorazdiralno. Ta učinek bistveno prispeva k učinkovitosti elektrokemoterapije. S sproščanjem antigenov iz tumorskih celic pa se sproži še imunski odgovor, ki dodatno prispeva k protitumorski učinkovitosti elektrokemoterapije (3, 4).

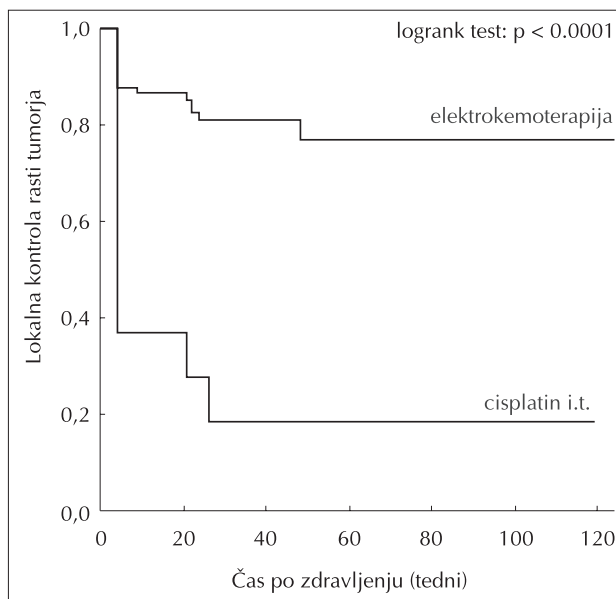
Klinične raziskave elektrokemoterapije

Prva klinična raziskava elektrokemoterapije z bleomicinom je bila objavljena leta 1991. Dokazala je, da je elektrokemoterapija učinkovita za lokalni nadzor rasti kožnih metastaz tumorjev glave in vratu (5). Izsledki te prve raziskave raziskovalne skupine z Instituta Gustave Roussy v Villejuifu, pod vodstvom dr. Lluisa M. Mira, so spodbudili tudi nas in še druge skupine, da smo na podlagi svojih predkliničnih raziskav začeli tudi s kliničnimi raziskavami. Pionirji elektrokemoterapije so tako bili onkološki centri v Villejuifu in Toulousu v Franciji, skupina v Tampi v ZDA in Onkološki inštitut v Ljubljani. V zadnjem času so klinične izkušnje z elektrokemoterapijo pridobili še nekateri drugi centri po svetu, v Kopenhagenu na Danskem, Mexico Cityju v Mehiki, Chicagu v ZDA, na Dunaju v Avstriji, Matsumotu na Japonskem in Corku na Irskem.

Do sedaj je bilo v kliničnih raziskavah elektrokemoterapije zdravljenih 96 bolnikov, pri katerih so z elektrokemoterapijo z bleomicinom zdravili 411 tumorskih nodulov, in 85 bolnikov, pri katerih smo z elektrokemoterapijo s cisplatinom zdravili 418 tumorskih nodulov. Glavnina bolnikov je bila s kožnimi metastazami malignega melanoma, zdravljeni pa so bili tudi bolniki z metastazami karcinomov glave in vratu, raka dojke, kožnih karcinomov in nekaj primerov s hipernefrodom, ovarijskim karcinomom in Kaposijevim sarkomom (6, 7). Rezultate vseh objavljenih kliničnih raziskav lahko povzamemo v ugotovitvi, da so dokazale zelo dobro protitumorsko učinkovitost tako elektrokemoterapije z bleomicinom kot tudi elektrokemoterapije s cisplatinom. Odstotek objektivnih odgovorov na zdravljenje je bil okrog 80 %.

Vse raziskave, ki so primerjale učinkovitost zdravljenja samo s citostatikom, injiciranim intravensko ali intratumorsko, in elektrokemoterapijo, so dokazale, da z električnimi pulzi, ki jih dovedemo na tumor, večkrat povečamo protitumorsko učinkovitost uporabljenih citostatikov. Tako smo v svoji raziskavi elektrokemoterapije z intratumorskim injiciranjem cisplatina poročali o povečanju lokalnega nadzora rasti tumorjev z 19 na 77 % (8) (slika 2).

Z elektrokemoterapijo lahko zaenkrat zdravimo kožne in podkožne tumorske nodule. Pred aplikacijo citostatika se glede na število in velikost nodulov ter na bolnikovo splošno stanje odločimo za lokalno ali sistemsko anestezijo. Izbira citostatika ni vezana na histološki tip tumorja, temveč na število in velikost nodulov. Citostatik vbrizgamo intravensko ali intratumorsko in nato na tumor dovedemo električne pulze. Po intravenskem vbrizganju je treba dovesti električne pulze na tumor v 8–28 minutah, po intratumorskem vbrizganju citostatika pa takoj. Za aplikacijo električnih pulzov uporabljamo generator električnih pulzov, ki ga je razvil evropski konzorcij v okviru projekta, ki ga je Evropska



Slika 2. Lokalni nadzor rasti metastatskih nodulov malignega melanoma po elektrokemoterapiji s cisplatinom (82 nodulov) v primerjavi z intratumorskim vbrizganjem cisplatina (27 nodulov), *Clin Cancer Res* 2000; 6: 863–7.

skupnost financirala prav za zdravljenje z elektrokemoterapijo. Generator električnih pulzov CLINIPORATOR™ je varen in zanesljiv ter registriran za delo v kliničnem okolju. Za dovajanje električnih pulzov so na voljo različne elektrode, od ploščatih za manjše tumorje do igelnih za zdravljenje večjih tumorjev (3 cm v premeru in tudi več ob ponavljajočih se terapijah) (slika 3).



Slika 3. Postopek zdravljenja kožnih tumorskih nodulov z elektrokemoterapijo. A – Citostatik (cisplatin ali bleomicin) injiciramo intratumorsko in takoj za tem B – dovedemo električne pulze z elektrodami, ki so lahko ploščate ali igelne. C – Generator električnih pulzov CLINIPORATOR™ proizvajalca IGEA, s. r. l., Carpi, Italija, je bil razvit v evropskem projektu za zdravljenje bolnikov z elektrokemoterapijo in elektrogensko terapijo.

Elektrokemoterapija ne povzroča stranskih pojavov, saj so odmerki citostatikov manjši od sicer uporabljenih v kemoterapevtskih shemah. Bleomicin lahko injiciramo intravensko v enkratnem odmerku 15.000 IU/m², ali intratumorsko 250–1000 IU/cm³ tumorja, cisplatin pa intratumorsko v odmerku 0,5–2 mg/cm³ tumorja. Neželeni stranski pojav ob dovajanju električnih pulzov na tumor so kontrakcije spodaj ležečih mišic. Uporabljajo se pravokotni električni pulzi napetosti 1100 do 1300 V/cm, dolžine 100 μ s in frekvence 1 Hz ali 5 kHz. Pri standardnem zdravljenju z osmimi električnimi pulzi pride do kontrakcije mišic, kar je za bolnika razmeroma neprijetno in lahko tudi boleče. Vendar pa bolečina preneha takoj po koncu dovajanja električnih pulzov (~ 8 sekund).

Učinek elektrokemoterapije po enkratnem zdravljenju je popolno izginotje tumorskega nodula, kadar je zdravljenje primerno izvedeno. Popolni odgovori tumorjev na zdravljenje z elektrokemoterapijo so trajni, z dobrim kozmetičnim učinkom. Pri večjih nodulih, ter pri ponovno izraslih nodulih pa lahko zdravljenje z elektrokemoterapijo ponovimo, običajno v 4-8 tedenskem intervalu (sliki 4 in 5).

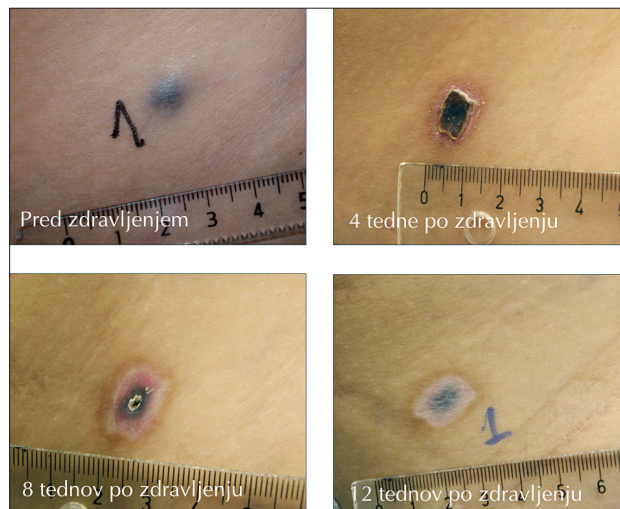


Slika 4. Primer dobrega lokalnega nadzora rasti dveh podkožnih metastaz na nogi bolnice z malignim melanomom. Nodul številka 1 je bil zdravljen enkrat z elektrokemoterapijo s cisplatinom; tudi eno leto po zdravljenju je bil odgovor na zdravljenje popoln, z dobrim kozmetičnim učinkom. Nodul številka 2 je bil v dvomesečnih intervalih trikrat zdravljen z elektrokemoterapijo. Po vsakem zdravljenju je bil odgovor dober, čeprav je med zdravljenjem tumorski nodul znova izrastlel. Eno leto in pol po končanem zdravljenju ni prišlo do ponovne izrasti tumorskih nodulov. *Cancer Therapy* 2003; 1: 133–42.

Indikacije za zdravljenje z elektrokemoterapijo

Elektrokemoterapija je paliativni pristop za učinkovit lokalni nadzor kožnih in podkožnih tumorjev različnih vrst raka. Izvajamo jo lahko ambulantno, zato je hiter in cenen terapevtski postopek. Izkušnje centrov, ki uporabljajo elektrokemoterapijo v kliniki, lahko strnemo na nekaj indikacij, kje jo lahko s pridom uporabljamo:

- Je učinkovit postopek za zdravljenje solitarnih ali multiplih tumorskih nodulov v koži ali podkožju različnih histologij (6, 7).
- Je zdravljenje, ki poveča kakovost življenja pri bolnikih in bolnicah z napredujočo boleznijo (9).



Slika 5. Učinek enkratne elektrokemoterapije s cisplatinom na podkožni metastazi bolnika z malignim melanomom. Dvanajst tednov po zdravljenju je tumorski nodul v popolnem odgovoru, z pigmentacijo in dobrim kozmetičnim učinkom.

- Je terapija izbora pri tumorjih, ki so znova izrasli na mestu predhodnega zdravljenja (po kirurškem posegu ali v obsevalnem polju po radioterapiji) (6, 7).
- Je neoadjuvantno zdravljenje, kot citoreduktivna terapija pred standardnim zdravljenjem (10).
- Je organe ohranjujoče zdravljenje (10).
- Je uporabno zdravljenje pri krvavečih tumorjih (ustavitev pretoka krvi v tumorjih) in v nekaterih primerih zmanjša stopnjo bolečine, povzročene z rastjo tumorja (10, 11).

Klinične izkušnje o elektrokemoterapiji smo štirje onkološki centri, Institut Gustave Roussy v Franciji, Herlev Hospital na Danskem, Cork Cancer Center na Irskem in Onkološki inštitut v Ljubljani v sodelovanju s Fakulteto za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, združili v skupnem kliničnem poskusu v evropskem projektu ESOPE, kjer smo preizkusili elektrokemoterapijo s cisplatinom in bleomicinom, različne načine nadzora bolečine in različne načine aplikacije električnih pulzov s CLINIPORATORJEM™. Več o tem projektu lahko preberete na www.cliniporator.com. Rezultat tega projekta je protokol standardiziranih postopkov zdravljenja z elektrokemoterapijo ali Standard Operating Procedures – SOP. Na voljo je vsem, ki so zainteresirani za elektrokemoterapijo.

Sklep

Razvoj elektrokemoterapije od prvih predkliničnih poskusov do uporabe v kliniki s pripravo standardiziranega protokola, klinično uporabnega generatorja električnih pulzov in registracijo cisplatina za uporabo v elektrokemoterapiji je trajal 15 let. Vendar ima elektrokemoterapija še druge aplikacije, ki jih bomo razvijali. Trenutno gre v klinično prakso v veterinarski onkologiji pri zdravljenju mačk, psov in konjev v sodelovanju z doc. Natašo Tozon z Veterinarske fakultete, in sicer na Kliniki za kirurgijo in male živali.

Naslednja velika biomedicinska aplikacija elektrokemoterapije je elektrogensko zdravljenje (12). Tudi tu je bil dosežen velik

napredek. V evropskem projektu ESOPE bomo preizkusili elektrogensko zdravljenje z reporterskim genom in pripravili SOP za tako zdravljenje. Te izkušnje pa nameravamo uporabiti že v naslednjem evropskem projektu ANGIOSKIN, kjer nameravamo uporabiti elektrogensko zdravljenje za zdravljenje kožnih metastaz malignega melanoma z antiangiogenim genskim zdravljenjem.

Viri

1. Belehradec J-Jr, Orlowski S, Poddevin B, Paoletti C, and Mir L-M (1991) Electrochemotherapy of spontaneous mammary tumours in mice. *Eur J Cancer* 1991; 27: 73–6.
2. Serša G, Čemazar M, and Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice. *Cancer Res* 1995; 55: 3450–55.
3. Mir LM, Orlowski S. Mechanisms of electrochemotherapy. *Adv Drug Deliver Rew* 1999; 35: 107–118.
4. Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 2003; 177: 437–47.
5. Mir L-M, Belehradec M, Domenge C, Orlowski S, Poddevin B, Belehradec J Jr, Schwaab G, Luboinski B, and Paoletti C. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial. *C R Acad Sci III* 1993; 313: 613–8.
6. Serša G, Čemazar M, Rudolf Z. Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients. *Cancer Therapy* 2003; 1: 133–42.
7. Gothelf A, Mir LM, Gehl J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat Rew* 2003; 29: 371–87.
8. Serša G, Štabuc B, Čemazar M, Miklavčič D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: Clinical experience in malignant melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 863–7.
9. Reberšek M, Čufer T, Čemazar M, Kranjc S, Serša G. Electrochemotherapy with cisplatin of cutaneous tumor lesions in breast cancer. *Anti-Cancer Drugs* 2004; 15: 593–7.
10. Snoj M, Rudolf Z, Čemazar M, Jančar B, Serša G. Successful sphincter-saving treatment of anorectal malignant melanoma with electrochemotherapy, local excision and adjuvant brachytherapy. *Anti-Cancer Drugs* 2005; 16: 345–8.
11. Gehl J, and Geertsen. Efficient palliation of haemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy. *Melanoma Res* 2000; 10: 585–9.
12. Čemazar M, Golzio M, Rols MP, Serša G, Teissie J. Electrically-assisted nucleic acid delivery in vivo: Where do we stand? *Curr Pharm Design* 2005; accepted for publication.