

PREDKLINIČNE RAZISKAVE

Gregor Serša in Maja Čemažar

Onkološki inštitut Ljubljana

Izveček

V prispevku so predstavljene predklinične raziskave, ki zajemajo preučevanje mehanizmov nastanka in razvoja raka, biološke in molekularne značilnosti malignih celic in tumorjev ter učinke različnih vrst zdravljenja ali njihovih kombinacij na eksperimentalnih tumorjih laboratorijskih živali. Poleg tega so predstavljene tudi translacijske raziskave, ki vključujejo prenos novih vrst zdravljenj v klinično prakso in preučevanje biomarkerjev na velikem številu kliničnih vzorcev tumorjev z orodji genomike, proteomike, farmakogenomike in metabolomike z namenom iskanja novih diagnostičnih in napovednih dejavnikov.

Elektrokemoterapija in elektrogenska terapija sta primer našega uspešnega prenosa predkliničnih raziskav v klinične študije in tudi klinično prakso. Obe vrsti zdravljenja vključujeta elektroporacijo kot dostavni sistem za vnos kemoterapevtikov, kot sta bleomicin in cisplatin, ali nukleinskih kislin v maligne tumorje. Elektrokemoterapija je na osnovi mnogih predkliničnih raziskav in kliničnih študij že del evropskih smernic za zdravljenje kožnih in podkožnih metastaz melanoma, elektrogenska terapija z antiangiogenetskim genom in imunostimulativnim proteinom interlevkinom 12 pa je še v fazi kliničnih študij, ki jih izvajamo s partnerji iz Evrope in Združenih držav Amerike.

Pomen predkliničnih in translacijskih raziskav je predvsem v povezovanju ogromnega nakopičenega znanja o biologiji tumorjev na molekularnem področju s kliničnim zdravljenjem, ki pa je uspešno samo v dobrem in produktivnem sodelovanju vseh raziskovalcev, predklinikov in klinikov.

Kaj je eksperimentalna onkologija in kaj so translacijske raziskave?

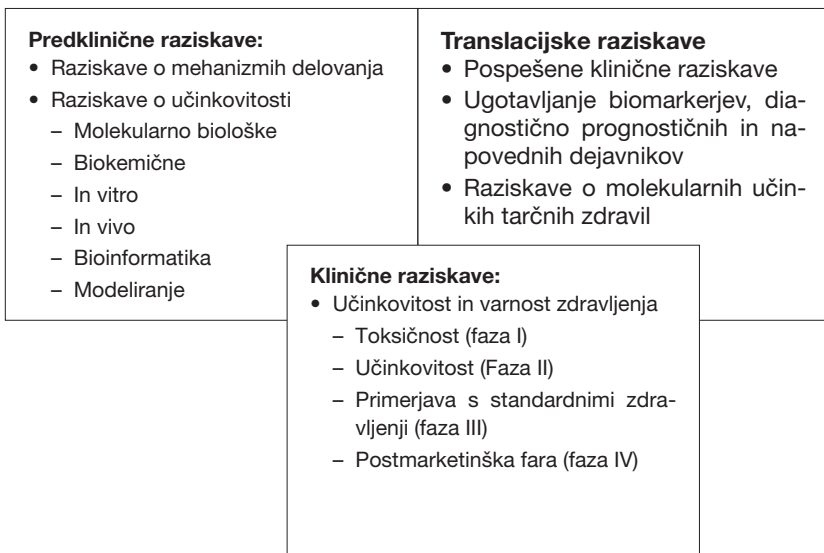
Eksperimentalna onkologija se ukvarja z raziskavami raka na predkliničnem nivoju. Preučuje mehanizme nastanka in razvoja raka, biološke in molekularne značilnosti malignih celic in tumorjev ter učinke različnih vrst zdravljenja ali njihovih kombinacij na eksperimentalnih tumorjih laboratorijskih živali. Tako se večino znanja o biologiji tumorjev zbira na predkliničnem nivoju. Za uvedbo novih vrst zdravljenj v kliniko in rutinsko uporabo v kliniki pa je potreben prenos znanja iz predklinike s pomočjo načrtovanih kliničnih študij. Ta prenos znanja se izvaja s translacijskimi raziskavami (Slika 1). Nobena klinična študija, ki uvaja neko novo zdravljenje, ne more dobiti privolitve strokovnih in etičnih

komisij, če nima trdnih dokazov v predkliničnih raziskavah o možnem učinku tudi na ljudeh. Mnoge translacijske raziskave pa potekajo tudi na biološkem materialu zdravljenih bolnikov, tako da preučujejo biomarkerje ali molekularne mehanizme in s tem razloge za uspešnost ali neuspešnost zdravljenja (1).

Zato je nepogrešljiva vloga eksperimentalne onkologije za prenos znanja o biologiji malignih celic v klinično testiranje in prakso. Za dobro sodelovanje med »eksperimentalci« (biologi, kemiki, mikrobiologi, farmacevti...) in kliničnimi onkologi je potrebno poznavanje področij delovanja. Predkliniki morajo imeti nekaj znanj o kliničnih problemih v onkologiji, da lahko zastavijo raziskave, ki so klinično pomembne, kliniki pa osnovna znanja iz biologije raka in predkliničnih testov, da lahko na osnovi njihovih izsledkov načrtujejo klinične študije. Ravno sodelovanje, zaupanje in raziskovalni nemir je tisto, kar je gonilna sila napredka v onkologiji.

Tako raziskovalno okolje je najbolj produktivno ravno v inštitucijah, kjer skupaj delajo »eksperimentalci« in »kliniki«, se srečujejo in pogovarjajo o možnostih uvajanja novih postopkov zdravljenj; tako kot na Onkološkem inštitutu, kjer je večina dela iz predkliničnih raziskav opravljenih na Oddelku za eksperimentalno onkologijo in kjer so internistični onkologi, onkološki kirurgi in radioterapevti pripravljeni poslušati in preizkusiti nove pristope zdravljenja (2). Seveda take raziskave ne bi bile mogoče, če ne bi bilo tudi sodelovanja vseh, ki delujejo v diagnostiki, od radiologov, patologov, molekularnih biologov in biokemikov, in sodelovanja raziskovalnih sester, ki skrbijo za natančno in skrbno izvajanje kliničnih protokolov.

Tako se translacijske raziskave izvajajo v »celoviti« ustanovi, ki zagotavlja multidisciplinarno obravnavo bolnikov, kot je tudi Onkološki inštitut Ljubljana. Za izvajanje takih raziskav so potrebni celoviti diagnostični in terapevtski pristopi ter baza v eksperimentalni onkologiji. Pogoj za izvajanje pa je tudi nadzor nad izvajanjem, saj se morajo raziskave izvajati po načelih dobre klinične prakse, potem, ko so odobrene s strani Komisije za oceno kliničnih protokolov, kjer strokovnjaki preučijo, ali so raziskave strokovno in znanstveno upravičene. Za zaščito etičnega vidika kliničnih raziskav je treba pridobiti tudi dovoljenje Republiške komisije za medicinsko etiko. Poleg tega pa je tudi za predklinične poskuse, ki se izvajajo na laboratorijskih živalih, treba pridobiti dovoljenje Veterinarske uprave Republike Slovenije in Republiške etične komisije za poskuse na živalih.



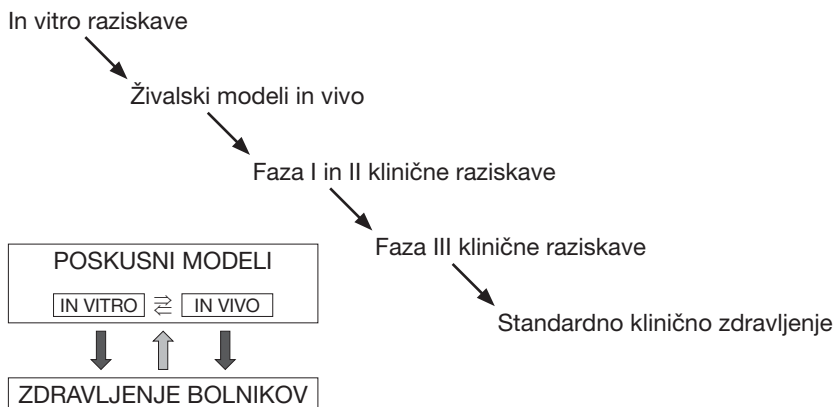
Slika 1. Povezava med predkliničnimi, kliničnimi in translacijskimi raziskavami.

Pristopi eksperimentalne onkologije

Za ugotavljanje učinkovitosti, kot tudi mehanizmov delovanja različnih terapij, so na voljo številni eksperimentalni pristopi. Za vsako vrsto terapije je treba raziskati, kakšne so molekularnobiološke osnove njenega delovanja. Z modernimi molekularnobiološkimi tehnikami lahko določamo delovanje terapevtikov na nivoju izražanja genov (genomika; DNA-mreže). Treba je poznati tudi posledice na biokemičnem nivoju delovanja celic, tako tumorskih kot tudi normalnih. Vse te raziskave so možne zaradi možnosti gojenja celic v laboratorijskih pogojih.

Te, tako imenovane *in vitro* raziskave omogočajo gojenje različnih vrst celic v kulturah, kar zagotavlja homogen sistem (enake celice) v izoliranih pogojih, brez vplivov fizioloških dejavnikov organizma. Naslednji višji nivo so tumorski modeli v laboratorijskih živalih *in vivo*, kjer ugotavljamo tako sistemske spremembe kot tudi protitumorsko učinkovitost. Na voljo je vrsta mišjih in humanih tumorskih modelov, ki jih lahko presadimo v različne organe laboratorijskih živali, najprimernejše pa je ortotopično presajanje (v organ, iz katerega tumor primarno izhaja). Kot laboratorijske živali največkrat uporabljamo laboratorijske miši, v manjši meri podgane, pa tudi prašiči, psi, mačke in opice. Za presajanje humanih tumorskih celičnih linij v laboratorijske miši uporabljajo imunsko zavrte živali (gole miši in SCID-miši). Namen preizkušanja učinkovin na laboratorijskih živalih je čim bolj se približati pogojem in razmeram, ki

so prisotne pri humanih tumorjih, z upoštevanjem razlik v fiziologiji. Pri delu z laboratorijskimi živalmi se je treba natančno držati načela 3R (reduction, refinement, replacement; zmanjšanje, izboljšanje in nadomeščanje). Načelo zmanjšanja uporabe laboratorijskih živali ter naraščanje informacij je vodilo v razvoj novih tehnologij (Slika 2). Bioinformatika predstavlja pomoč pri iskanju povezav in stičnih točk med različnimi molekularnimi in biokemičnimi potmi in različnimi dejavniki, ki vplivajo na te poti. Mnogokrat lahko tudi različni pristopi matematičnega modeliranja napovejo in simulirajo različne situacije *in vitro* kot tudi *in vivo*. Da bi čim manj uporabljali eksperimentalne živali, se je uporaba modeliranja zelo razširila (1, 2).



Slika 2. Shema verige v translacijskih raziskavah.

Področja delovanja Oddelka za eksperimentalno onkologijo na Onkološkem inštitutu

Na Onkološkem inštitutu deluje Oddelek za eksperimentalno onkologijo, ki ima na voljo vse tehnike eksperimentalnega dela. Na voljo imamo molekularnobiološke tehnike, celične kulture za gojenje humanih in živalskih tumorskih in normalnih celic ter živalsko kolonijo, kjer lahko izvajamo poskuse na laboratorijskih miših, tako na imunsko sposobnih kot tudi imunsko zavrtih živalih. Poleg tega imamo terapevtski rentgen za izvajanje radiobioloških raziskav. Namen Oddelka za eksperimentalno onkologijo je razvijanje in uvajanje novih pristopov zdravljenja v klinično testiranje in klinično prakso v onkologiji, torej translacijske raziskave. Zasnovan je kot eksperimentalna baza Onkološkega inštituta, kjer se izvajajo raziskave v sodelovanju s sodelavci našega inštituta in tudi z drugimi raziskovalnimi ustanovami v Sloveniji in po svetu (2).

Znanstveno raziskovalno delo oddelka je v zadnjih dvajsetih letih vpeto predvsem v **biomedicinske aplikacije elektroporacije**. Elektroporacija je fizikalni

pristop, kjer z aplikacijo električnih pulzov na celice ali tumor začasno destabiliziramo celično membrano, s čimer omogočimo, da v celice vstopajo molekule, ki drugače sploh ne bi ali pa bi težko vstopale vanje. Ta metoda je že dolgo znana pri delu s celičnimi kulturami, nekoliko drugačni električni parametri pa omogočajo tudi pristop *in vivo*, in sicer za dostavljanje nekaterih citostatikov, kot sta bleomicin in cisplatin, ali nukleinskih kislin, голе molekule DNA v obliki plazmidne DNA ali nekodirajočih molekul RNA v celice in tkiva. Zdravljenje z uporabo elektroporacije, s katerim povečamo učinek citotoksičnih zdravil, kot sta bleomicin in cisplatin, se imenuje **elektrokemoterapija**, če vnašamo nukleinske kisline, pa **elektrogenska terapija** (2).

Primeri translacijske onkologije našega oddelka

Uvedba elektrokemoterapije v klinično prakso

Na področju elektrokemoterapije smo bili med pionirji tega zdravljenja, ki se je začelo razvijati pred dvajsetimi leti. V sodelovanju z našimi kliniki in Laboratorijem za biokibernetiko Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani pod vodstvom prof. dr. Damijana Miklavčiča in v sodelovanju s tujimi partnerji, predvsem z dr. Lluïsom M. Mirom (Institut Gustave Roussy, Francija), smo v tem času to tehniko zdravljenja toliko izpopolnili, da je sedaj postalo standardno zdravljenje kožnih metastaz melanoma (3,4). Prenos tega zdravljenja je bila dolgotrajen proces, pri katerem je bilo treba izvesti mnoge preiskave o učinkovitosti tega zdravljenja na eksperimentalnih tumorskih modelih, natančne preiskave o mehanizmih delovanja in optimizacije parametrov terapije. Razmeroma kmalu je prišlo do prvih kliničnih poskusov, ki so se nadaljevali v več evropskih centrih in ZDA. Elektrokemoterapija je prišla v širšo uporabo po zaključenem evropskem projektu ESOPE, ko so bili objavljeni klinični rezultati več onkoloških centrov, napisani standardni postopki zdravljenja in na voljo klinično certificiran generator električnih pulzov Cliniporator. Tako so bili oblikovani pogoji za širšo uporabo te terapije, ki se sedaj uporablja v 60 onkoloških centrih po Evropi in s katero je letno zdravljenih nekaj tisoč bolnikov. Kot pionirji raziskav na tem področju smo bistveno pripomogli k uveljavitvi elektrokemoterapije z eksperimentalnim delom in vodenjem ter sodelovanjem v kliničnih raziskavah naših klinikov, predvsem prof. Zvonimirja Rudolfa, kot pionirja na tem področju, in v zadnjem času prof. Marka Snoja, ki je glavni raziskovalec in vodja kliničnih študij. Razvoj poteka seveda dalje in sedaj razvijamo to tehnologijo tudi za globoko ležeče tumorje, kot so globoko ležeče metastaze melanoma in jetrne metastaze, klinične študije vodita prof. M. Snoj in prof. E. Gadžijev (5).

Uvajanje elektrogenske terapije v klinično testiranje

Kmalu po začetku raziskav na področju elektrokemoterapije smo začeli tudi z raziskavami na področju vnosa nukleinskih kislin, predvsem plazmidne DNA,

z elektroporacijo. Zaradi specifičnih lastnosti molekule DNA, ki je velika nabita molekula (polianion) in se v krvnem obtoku hitro razgradi, je bilo treba za tovrstno zdravljenje prav tako izvesti veliko predkliničnih študij pred prenosom te terapije v klinično prakso. Študije so bile usmerjene v izbor optimalnih električnih parametrov za različne histološke vrste tumorjev, optimalen čas med direktnim vbrizganjem plazmidne DNA v tumor in aplikacijo električnih pulzov, ter seveda primerjavo z drugimi uveljavljenimi metodami za dovajanje nukleinskih kislin v tumorje. Izbor možnih terapevtskih molekul DNA je izjemno velik glede na znane spremenjene molekularnobiološke spremembe v tumorskih celicah, a smo se pri naših raziskavah omejili predvsem na imunsko gensko zdravljenje z imunostimulatorno molekulo interlevkin-12 (6). To terapijo smo uspešno prenesli v klinične študije, ki se izvajajo na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani pod vodstvom prof. Nataše Tozon, predvsem za zdravljenje imunogenih tumorjev psov - mastocitomov. Prve rezultate, ki kažejo na zelo dober učinek te terapije, smo že objavili. Na področju prenosa elektrogenske terapije v humane klinične študije smo do sedaj izvedli dve klinični študiji; eno v okviru že prej omenjenega evropskega projekta ESOPe, katere namen je bil dokazati, da je tudi z elektroporacijo možno vnesti plazmidno DNA v kožne metastaze melanoma. Zato je bila v tej študiji uporabljena plazmidna DNA z reporterskim genom. Zaključili pa smo tudi drugo evropsko klinično študijo ANGIOSKIN, v kateri smo uporabili terapevtski plazmid z antiangiogenetskim proteinom in kjer so bili rezultati obetavni (glavni raziskovalec prof. Snój; rezultati še v obdelavi). Na osnovi dobrih izkušenj potekajo priprave na dve novi klinični študiji, ena bo nadaljevanje študije z antiangiogenetskim plazmidom, druga pa v sodelovanju z ameriškimi partnerji (vodja študije prof. Daud in prof. Heller, v Sloveniji prof. Snój) z interlevkinom-12. Velja omeniti, da je pri prijavi študij elektrogenske terapije zaradi vnosa genskega materiala v organizem treba za izvajanje, tako na predkliničnem kot tudi na kliničnem nivoju, pridobiti še dovoljenje Ministrstva za kmetijstvo in okolje RS, ki nadzoruje uporabo gensko spremenjenih organizmov.

Zaključek

Eksperimentalna onkologija je nepogrešljiv člen pri uvajanju novih pristopov zdravljenj v klinično preizkušanje in klinično prakso. Z nadzorovanimi preizkušanjmi *in vivo* in predhodnimi *in vitro* raziskavami lahko novi pristopi vstopajo v klinično preizkušanje. Dobro nadzorovane translacijske raziskave v sodelovanju predklinikov in klinikov pa še pripomorejo k hitrejšemu uvajanju novih terapij.

Literatura

1. Serša G, Tanja Čufer, Aleksander Sadikov. Predklinične, klinične in translacijske raziskave ter statistika v onkoloških raziskavah. V: *Onkologija; raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. Novaković S, Hočevar M, Jezeršek Novaković B, Strojjan P, Žgajnar J: Uredniki. Ljubljana: Mladinska knjiga; 2009. P.74-83.

2. Serša G. Predstavitev Oddelka za eksperimentalno onkologijo. *Onkologija* 2005; IX: 110-3.
3. Serša G, Čemažar M, Miklavčič D, Rudolf Z. Elektrokemoterapija postaja standardno zdravljenje. *Onkologija* 2005; IX: 84-7.
4. Serša G, Miklavcic D, Cemazar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34: 232-40.
5. Edhemović I, Gadžijev EM, Breclj E, Miklavčič D, Kos B, Županič A, Mali B, Jarm T, Pavliha D, Marčan M, Gašljević G, Gorjup V, Mušič M, Pečnik Vavpotič T, Čemažar M, Snoj M, Serša G. Electrochemotherapy: a new technological approach in treatment of metastases in the liver. *Tecnol Cancer Res Treat* 2011; 10: 475-85.
6. Čemažar M, Jarm T, Serša G. Cancer electrogene therapy with interleukin-12. *Curr Gene Ther* 2010; 10: 300-11.