

## 4. poglavje

# PREDKLINIČNE RAZISKAVE V ONKOLOGIJI

Maja Čemažar

## Uvod

Tako kot klinične tudi predklinične raziskave v onkologiji zajemajo različna področja proučevanja raka – od preventive, diagnostike in zdravljenja do rehabilitacije. Natančno načrtovane in pravilno izvedene raziskave so ključnega pomena za nadaljnji prenos znanja v klinično onkologijo. Bazične raziskave preučujejo osnovne biološke procese na molekularni, celični in sistemski ravni za razumevanje nastanka in napredovanja raka ter so pomembne za odkrivanje novih tarč za zdravljenje. Razvoj in preskušanje zdravil v predkliničnih poskusih na celičnih kulturah in laboratorijskih živalih je ključnega pomena za prenos le-teh v klinično prakso. Izjemnega pomena so tudi raziskave na tumorskih in tekočinskih vzorcih bolnikov, s katerimi iščemo nove napovedne dejavnike za potek bolezni in uspešnost zdravljenja ter nove tarče za razvoj zdravil. Z razvojem novih tehnologij (omik) so ti vzorci bolnikov izjemnega pomena. Podatki, ki jih pridobimo iz teh vzorcev (genski in proteomski), se

zbirajo v **podatkovnih zbirkah (biobankah)**, ki tvorijo osnovo za načrtovanje in raziskovanje novih, tarčnih zdravil proti raku. Pri upravljanju biobank je ključno, da so poleg podatkov o analizi vzorcev zbrani tudi demografski podatki o bolnikih in podatki o poteku bolezni. Pridobljena morajo biti ustrezna etična dovoljenja ter zagotovljena anonimizacija in varovanje osebnih podatkov.

Eden od glavnih ciljev raziskovalnega dela v onkologiji je razviti čim učinkovitejše zdravljenje raka. A pot do novega zdravila oz. učinkovitejšega zdravljenja je dolga in kompleksna in se začne na celičnih kulturah, nato pa se prek poskusov na laboratorijskih živalih nadaljuje še v več fazah kliničnih preskušanj.

## In vitro modeli – celične kulture

Celice, ki jih gojimo v umetnih razmerah izven organizma ali njihovega naravnega okolja (habitata), ne glede na njihov vir in naravo, imenujemo **celične kulture**. Z imenom celične kulture označujemo:

- kulture mikroorganizmov (npr. bakterijske kulture),
- kulture evkariontskih enoceličnih organizmov (npr. kulture kvasovk) in
- kulture sesalskih celic, ki smo jih izolirali iz določenega tkiva (npr. kulture celic kože, tumorske celične linije).

Z raziskavami na celičnih kulturah lahko opazujemo vpliv posameznih dejavnikov na celice, saj celice niso odvisne od sistemskih sprememb in interakcij z drugimi celičnimi populacijami. Tako lahko ugotavljamo osnovne mehanizme delovanja nekega zdravila, kombinacije zdravil ali zdravljenj.

Prvi poskusi gojenja sesalskih celic v pogojih in vitro so se začeli v začetku 20. stoletja z namenom raziskovanja morfologije in osnovnih mehanizmov celične biologije. Prva tumorska celična linija je bila linija karcinoma materničnega vratu, ki so ga leta 1953 izrezali gospe Henrietti Lacks in po njej tudi poimenovali celično linijo HeLa. Ta celična linija je omogočila medicinski napredek pri številnih boleznih: pri otroški paralizi, različnih rakih, virusu ebrole, bolezni srpastih celic in številnih drugih stanjih. Ker je bila celična linija vzgojena brez privolitve bolnice oz. njenih svojcev, predstavlja veliko etično

dilemo in nas opominja, kako pomemben je ustrezen etični pristop k raziskovalnemu delu na vseh ravneh. Danes obstaja izjemno veliko število različnih celičnih linij, tako celičnih linij zdravih celic kot tumorskih celičnih linij, ki so komercialno dostopne v celičnih bankah. Največja banka celičnih kultur je *American Type Culture Collection* v ZDA.

Celične linije vzdržujemo v posebnih sterilnih plastičnih posodah, v tekočih hranilnih gojiščih, ki celicam zagotavljajo potrebna hranila in ustrezno okolje. Posode s celičnimi kulturami hranimo v inkubatorjih s kontrolirano atmosfero in temperaturo za optimalno rast celic. Kulture sesalskih celic (tudi človeških) imajo rastni optimum pri 37 °C. Za vzdrževanje ustrezne vrednosti pH gojišča je zrak v inkubatorju obogaten s CO<sub>2</sub> (5 %), dodatno vlaženje pa preprečuje izsuševanje celičnih kultur.

V predklinični onkologiji uporabljamo:

- **trajne (nesmrtne) celične linije** različnih vrst tumorjev;
- **celice zdravih tkiv** (le-te običajno imortaliziramo s transdukcijo SV40 velikega onkogene T, s čimer celice postanejo sposobne neomejenih delitev);
- **sferoide** (to so agregati oz. skupki celic v suspenziji; imajo tridimenzionalno zgradbo, zaradi česar se v kulturi obnašajo drugače kot posamezne celice v suspenziji ali celice na pritrjenem enosloju; sferoidi bolje odražajo zgradbo tkiv oz. tumorjev; da bi se čim bolj približali kompleksnemu tumorskemu okolju, uporabljamo tudi ko-kulture, sferoide izdelamo iz različnih tumorskih in normalnih celic);
- **kulture organov** oziroma **organoide** (vzgoja organoidov je najbolj kompleksna oblika gojenja celic in vitro; organoide sestavlja več tipov celic, ki lahko izvirajo iz normalnih tkiv/organov, ali pa so to tumorski organoidi, ki so sestavljeni iz celic, ki se nahajajo v tumorju, to je tumorske in stromalne celice, ki so prostorsko in funkcijsko razporejene enako kot in vivo oz. v organizmu).

# Laboratorijske živali in tumorski modeli

Uporaba laboratorijskih živali ima na področju raziskovanja raka velik pomen. V zadnjih štirih desetletjih je doživela pomemben razvoj in je postala učinkovitejša. Kljub razvoju številnih in vitro testov so poskusi na laboratorijskih živalih pred začetkom kliničnih preskušanj še vedno potrebni. Ti poskusi obsegajo: potrditev učinkovitosti zdravljenja na določenem tumorskem modelu, dajo vpogled v metabolizem zdravila in njegov vpliv na zdrava tkiva ter služijo kot osnova za določitev najvišjega odmerka zdravila, ki ga živali še prenesejo (angl. Maximal Tolerated Dose, MTD), ki ga uporabimo v kliničnem preskušanju faze I.

Pravilen izbor poskusnega modela – laboratorijske živali in tumorskega modela – je zelo pomemben in odvisen od specifičnosti raziskovalnega področja. Model opredelimo glede na njegovo uporabnost, selektivnost, napovedno vrednost in ponovljivost. Poleg tega so pomembni tudi genetska stabilnost celične linije, heterogenost (prisotnost stromalnih celic) celične linije, imunogenost celične linije in tudi biološki izid, ki ga uporabljamo za oceno uspešnosti zdravljenja (lokalna rast, zasevanje, preživetje). Zelo pomemben je tudi izbor laboratorijske živali, ker se le-te razlikujejo glede na imunski status.

Na področju onkologije v raziskovalne namene uporabljamo predvsem različne tipe miši. Te so lahko:

- **singenske, imunsko odzivne miši** (tumorsko tkivo ali tumorske celice izvirajo iz miši, ki ima enak genotip kot gostiteljska miš),
- **imunsko zavrte, gole miši** (disgeneza timusa),
- **miši s hudo, kombinirano imunsko pomanjkljivostjo** (angl. Severe Combined Immunodeficient Mice, SCID Mice),
- **miši z okvaro popravljanih mehanizmov DNA**,
- **transgene miši** (imajo mutiran določen gen ali delecijo obeh alelov določenega gena).

Nov pristop k urejanju genoma, ki temelji na metodi **CRISPR** (angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats [CRISPR] gene editing), je spremenil področje tumorskih modelov pri miših in s tem pomembno vplival na razvoj učinkovitejših sistemov za preučevanje raka pri ljudeh. S transgenimi

modeli, ki temeljijo na tehnologiji CRISPR/Cas9, lahko precej enostavno pridobimo širok spekter mutacij, ki jih najdemo tudi pri človeških rakih, in s tem raziskujemo in tudi rešujemo raziskovalna vprašanja, ki so bila pred poznavanjem te metode nerešljiva. V zadnjem času uporabljamo predvsem na področju proučevanja imunoterapije poleg imunsko odzivnih miši tudi t. i. **humanizirane miši**. To so imunsko zavrte miši, ki jim injiciramo človeške krvotvorne matične celice. S tem v miših ustvarimo človeški imunski sistem, s katerim lahko natančneje raziskujemo zapletene interakcije med tumorskimi in imunskimi celicami ter tako ugotavljamo odziv na imunoterapijo.

Tumorske modele, ki jih uporabljamo v raziskavah, lahko razdelimo na:

- spontane tumorje,
- tumorje zgodnjih generacij,
- dobro opisane tumorje (trajne celične linije) in
- ksenografte humanih tumorjev.

Napredek v gojenju in vzdrževanju tumorskih tkiv bolnikov je omogočil, da so trenutno najbolj napredni in v raziskovanju najbolj uporabljeni **ksenografti humanih tumorjev**, to je bolnikovi ksenografti (angl. patient-derived xenografts). To so modeli, pri katerih bolnikovo tumorsko tkivo neposredno presadimo v/na imunsko zavrte miši ali v/na humanizirane miši. S tem se kar najbolj približamo dejanskemu dogajanju pri bolniku z rakom. Takšni poskusi so izjemno zamudni in dragi.

Za ugotavljanje protitumorskega delovanja različnih oblik zdravljenj uporabljamo teste, kot so: test klonogenosti, test zaostanka rasti, test lokalne kontrole rasti tumorjev ter različne histološke, biokemične in molekularne teste. Pomembnejša kot absolutna občutljivost tumorjev na določeno zdravljenje je relativna občutljivost v primerjavi z občutljivostjo normalnih, zdravih tkiv. Teste, s katerimi ovrednotimo občutljivost normalnih tkiv na določeno zdravljenje, delimo na teste klonogenosti in teste, ki ovrednotijo funkcionalnost tkiv.

Zaradi specifičnosti raziskovanja na področju tumorske biologije je treba laboratorijskim živalim, ki so vključene v raziskave na področju onkologije, posvetiti posebno pozornost. Zahtevane so dodatne smernice in napotki za delo z laboratorijskimi živalmi. Živali z lokalno rastočim tumorjem ali razsejano boleznijo zelo verjetno občutijo bolečino in so podvržene stresu. Poleg tega

vse vrste tehnik, ki se uporabljajo v poskusih (operativni posegi, obsevanje z ionizirajočimi žarki, aplikacija učinkovin), povzročajo še dodatno bolečino in stres.

Pri vseh raziskavah moramo upoštevati **načelo 3R**:

- zmanjšanje (angl. **Reduction**): uporaba metode, s katero dobimo čim večjo količino informacij s pomočjo čim manjšega števila živali,
- izboljšanje (angl. **Refinement**): uporabimo metode, s katerimi v največji možni meri zmanjšamo ali preprečimo bolečino in stres živali,
- zamenjava (angl. **Replacement**): uporaba metod, s katerimi se izognemo uporabi živali ali nadomestimo uporabo živali v raziskovanju.

Vse raziskave, ki vključujejo uporabo poskusnih živali, ureja Evropska direktiva 2010/63/EU, v Sloveniji pa Zakon o zaščiti živali in Pravilnik o pogojih za izvajanje postopkov na živalih. Vse osebe, ki izvajajo postopke na živalih, morajo imeti opravljeno posebno izobraževanje, vsi projekti, ki vključujejo uporabo laboratorijskih živali, pa morajo biti prijavljeni na Upravo za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR), ki na podlagi mnenja etične komisije za poskuse na živalih, ki deluje pod okriljem Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, projekt odobri ali pa ga zavrne. Pri izvajanju poskusov na živalih v onkologiji je treba posebno pozornost nameniti:

- načrtovanju poskusov: po možnosti predhodna izvedba pilotne študije, izbira čim bolj humanega postopka, posvet s statistikom, poznavanje dela z živalmi, priprava ustrezne dokumentacije za etično komisijo za poskuse na živalih,
- napovedovanju in prepoznavanju stranskih, predvsem neželenih učinkov, opredelitev stopnje bolečine in stresa,
- poznavanju biologije tumorjev,
- stalnemu pregledovanju živali in
- objavljanju izsledkov.

## Zaključek

Vsako zdravilo oz. zdravljenje, ki ga želimo preskusiti na ljudeh, mora biti predhodno preskušeno v okviru predkliničnega preskušanja. Izsledki te faze preskušanja so ključen del dokumentacije, ki jo je treba predložiti regulatornim organom ob prijavi klinične raziskave faze I. Le-ta predstavlja prvo preskušanje nekega zdravila oz. zdravljenja na ljudeh. Priprava dokumentacije in tudi poznejša izvedba klinične raziskave mora slediti vsem navodilom, ki jih objavlja oz. izdaja Evropska agencija za zdravila (angl. European Medicines Agency, EMA). Pomembno je, da je v okviru predkliničnega preskušanja uporabljen enak produkt (zdravilo) oz. metoda, kot se bo preskušala v predlagani fazi I kliničnega preskušanja. Izjema so preskušanja nekaterih novejših oblik zdravljenja, to so imunska in genska zdravljenja. Za te oblike zdravljenja je v fazi predkliničnega preskušanja dovoljena uporaba mišjega homologa ali ortologa humanega gena/proteina.

---

## Viri

1. Tannock IF, Hill RP, Bristow R, Harrington L, ur. The Basic Science of Oncology. 5th Edition. New York: Mc Graw Hill; 2013.
2. Weinberg RA, ur. The biology of Cancer. 2nd ed (e-knjiga). New York: W.W Norton & Company; 2013.
3. Kallman RF, ur. Rodent tumor models in experimental cancer therapy. New York, Oxford: Pergamon press; 1987.
4. Freshney, IR, ur. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2010.
5. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer. 2010 May;102(11):1555–77.
6. Lamprecht Tratar U, Horvat S, Čemažar M. Transgenic mouse models in cancer research. Front Oncol 2018 Jul 20;8:268.
7. European Medicines agency (EMA). Quality, preclinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products – Scientific guideline [spletna stran na internetu]. Amsterdam: EMA; 2023 [pridobljeno 20.11.2023]. Dostopno na: <https://www.ema.europa.eu/en/quality-preclinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products-scientific-guideline>.