

OPREDELITEV MEHANIZMOV CELIČNE SMRTI PO ELEKTROKEMOTERAPIJI V POGOJIH *IN VITRO*

Lara Snoj^{1,2}, Gregor Serša^{1,3}, Maja Čemažar^{1,4}, Boštjan Markelc^{1,5}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

⁴ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Izola, Slovenija

⁵ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: lsnoj@onko-i.si

Elektrokemoterapija (ECT) je lokalna ablativna terapija, ki z uporabo električnih pulzov poveča vnos citostatikov, kot so bleomicin (BLM), cisplatin (CDDP) in oksaliplatin (OXA), v celice ter s tem poveča njihovo terapevtsko učinkovitost. Poleg neposrednih citotoksičnih učinkov, ECT sproži tudi imunogeno celično smrt (ICD) in tako prispeva k proti-tumorskemu delovanju. ICD je oblika celične smrti, ki omogoča aktivacijo pridobljenega imunskega odziva proti antigenom, sproščenim iz umirajočih tumorskih celic, katere v tem primeru delujejo kot *in situ* protitumorsko cepivo. Imunogene značilnosti ICD torej temeljijo na sproščanju signalnih molekul, imenovanih s poškodbo povezani molekulski vzorci (angl. »damage-associated molecular patterns«, DAMPs). Ločimo dve glavni skupini: konstitutivne DAMP molekule (cDAMPs), ki so normalno prisotne v zdravih celicah in se sprostijo ob poškodbi celične membrane, ter inducirane DAMP molekule (iDAMPs), ki se v celicah sintetizirajo kot odziv na stres. Med ključne predstavnike cDAMP molekul sodijo kalretikulin (CARL), adenozin trifosfat (ATP) in jedrni protein HMGB-1, med iDAMP pa citokini, katerih izražanje uravnava jedrni faktor NF- κ B, interferoni tipa 1 ter člani družine IL-1. Za to, da celično smrt opredelimo kot imunogeno, morajo umirajoče celice sprostiti ali izpostaviti DAMP signale v časovno usklajenem zaporedju, saj le tako lahko pride do učinkovite aktivacije pridobljene imunosti. Za popoln izkoristek potenciala ICD, ki jo sproži ECT, je zato nujno natančno opredeliti vrsto in časovni potek celične smrti ter raziskati dinamiko sproščanja in medsebojnih interakcij DAMP molekul pri vsakem citostatiku posebej. V ta namen smo s sistemom CRISPR-Cas9 pripravili celične linije, katerim smo odstranili gene, ključne za specifične poti celične smrti (Bax in Bak za apoptozo, RIPK3 in MLKL za nekroptozo, GSDME in GSDMD za piroptozo). Naši rezultati so pokazali, da inhibicija posameznih efektorskih poti apoptoze ali piroptoze ne prepreči celične smrti po ECT v celoti, kar potrjuje, da ti mehanizmi niso ključni za njen učinek. ECT verjetno sproži alternativne poti celične smrti, ki prispevajo k njenim citotoksičnim in imunogenim učinkom. Za popolno razumevanje teh procesov bodo potrebne nadaljnje raziskave.