

ELEKTROKEMOTERAPIJA PRI OSTEOSARKOMU: RAZVOJ PREDKLINIČNIH MODELOV ZA POVEČANJE UČINKOVITOSTI

Saša Kupčič, Urška Kamenšek, Maja Čemažar, Urša Lampreht Tratar

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

Elektronski naslov: skupcic@onko-i.si

Osteosarkom je redek in agresiven rak, ki večinoma prizadene otroke med 11 in 14 letom starosti. V Sloveniji letno odkrijejo približno 15 primerov bolezni. Primarno zdravljenje vključuje kirurški poseg in kemoterapijo, tak protokol pa je nespremenjen že od leta 1970. Medtem ko je 5-letna stopnja preživetja za osteosarkom približno 70 %, se v metastatskih primerih zmanjša na 25 %. Elektrokemoterapija (EKT) uporablja električne pulze kot dostavno metodo za citostatik. Uporabljala se je že za zdravljenje kostnih metastaz, vendar je zaradi specifičnega tumorskega mikrokolja v kosti, potrebna optimizacija EKT protokola. Za ugotavljanje primernosti EKT za zdravljenje osteosarkoma smo želeli razviti napovedne modele bolezni *in vitro* in *in vivo*. Razvili smo dvodimenzionalne (2D) in tridimenzionalne (3D) celične modele z uporabo mišje celične linije K7M2 za osteosarkom in ortotopični mišji model z uporabo celic K7M2-luc s predhodno transduciranim genom za luciferazo. Model 2D smo uporabili za teste citotoksičnosti in permeabilizacije celične membrane po elektroporaciji in EKT. S ploščatimi elektrodami iz nerjavečega jekla (razmak 2,4 cm) smo dovedli električne pulze (8 pulzov, 100 μ s, 1 Hz) amplitude 300–1300 V/cm. Za tumorske sferoide 3D smo nasadili različno število celic ter jih gojili v rotacijskem inkubatorju Clinostar® 7 ali 14 dni. Za analizo nekrotičnih in proliferajočih območij smo opravili imunohistokemične analize (HE in Ki-67). Da bi natančneje simulirali mikrokolje kostnega tumorja, smo vzpostavili ortotopični mišji model. Različno število celic (0.5×10^6 , 1×10^6 , 2×10^6) K7M2-luc smo injicirali na proksimalno stran golenice zadnje desne noge. Z iglo velikosti 29G smo prebili periost in celice injicirali v medularno regijo kosti. Na modelu 2D smo s pomočjo rezultatov citotoksičnosti in permeabilizacije izbrali 1300 V/cm kot jakost pulzev za nadaljnje poskuse. Po izvedenem EKT s temi pulzi smo izračunali IC_{50} vrednosti citostatikov bleomicin (0.11 nM), cisplatin (10.55 μ M) in oksaliplatin (9.52 μ M). Pri sferoidih smo po določevanju velikosti območij nekroze in proliferacije izbrali sferoid z začetnim nasajanjem 2000 celic/sferoid, ki je bil gojen 7 dni, kot primeren model za nadaljnje analize. Nekrotično jedro je na dan 7 zavzemalo 35 % sferoida, proliferajoče območje pa 65%. Pri ortotopičnem mišjem modelu smo razvoj tumorja spremljali tedensko z bioluminiscenčnim in rentgenskim slikanjem z napravo IVIS (dovoljenje št. U34401-17/2023/1). V času približno 6 tednov po inokulaciji smo potrdili lizo kosti ter razvoj kliničnih znakov. Na podlagi rezultatov slikanja smo za nadaljnje raziskave ortotopičnega modela izbrali 1×10^6 celic. V okviru tega projekta smo uspeli vpostaviti predklinične modele osteosarkoma, ki nam bodo pomagali pri optimizaciji protokola EKT z namenom povečanje njene protitumorske učinkovitosti.

p14