

Elektrokemoterapija - metodologija i klinička primjena

Pripremili: prof. dr. Ratko Magjarević, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet elektronike i računarstva, Zagreb, doc. dr. sc. Igor Lacković, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet elektronike i računarstva, Zagreb, dr. Lluís Mir, Institut Gustave-Roussy (IGR), Villejuif, Francuska, prof. dr. sc. Damijan Miklavčič, Sveučilište u Ljubljani, Elektrotehnički fakultet, Ljubljana, Slovenija

Uvod

• U posljednjih dvadesetak godina pojavio se niz novih metoda za elektromanipulaciju bioloških stanica te su otkrivene brojne mogućnosti primjene u biotehnologiji i medicini. Najvažnije tehnike manipulacije stanica su elektroporacija odnosno elektropermeabilizacija stanica, čijoj primjeni je posvećen i ovaj rad.

Elektroporacija je tehnika kojom se s pomoću električnog polja preko stanične membrane u njenu unutrašnjost ubacuju različite molekule. Može se primijeniti za elektrokemoterapiju tumora, transdermalni unos lijekova te za gensku transfekciju *in vitro* i *in vivo*.

Za što efikasniju i bržu primjenu metoda zasnovanih na primjeni električnih polja na stanice i na tkiva potrebno je poznavanje fizikalno kemijskih procesa i mehanizama djelovanja električnog polja na stanice i tkiva. U današnje je vrijeme velik dio istraživanja moguće ostvariti i izgradnjom računalnih modela stanica i tkiva te na taj način proračun i optimizacija raspodjele električnog polja postaje jednostavnijom od eksperimentalnih modela [Sel, 2007]. Elektropermeabilizacija je metoda povećanja propustljivosti stanične membrane pod utjecajem električnog polja. Time je omogućeno ubacivanje velikih molekula, poput molekula lijekova i molekula DNK kroz staničnu membranu. Takav prijenos kroz stanične membrane bez djelovanja električnog polja ne bi bio moguć. Za postizanje željenih efekata potrebno je primijeniti upravo odgovarajuće električno polje, dovoljno jako da se stanična membrana kratkotrajno «otvori».

Značajnu ulogu u razvoju i optimiranju elektropermeabilizacije odigrao je interdisciplinarni pristup i suradnja biologa, liječnika i inženjera elektrotehnike i računarstva te biomedicinskog inženjerstva. Cilj je ovog rada predstavljanje je elektrokemoterapije i njenih dosadašnjih dosegâ u kliničkim pokusima, pa ćemo stoga navesti samo osnovne pojmove i postupke potrebne za razumijevanje elektrokemoterapije.

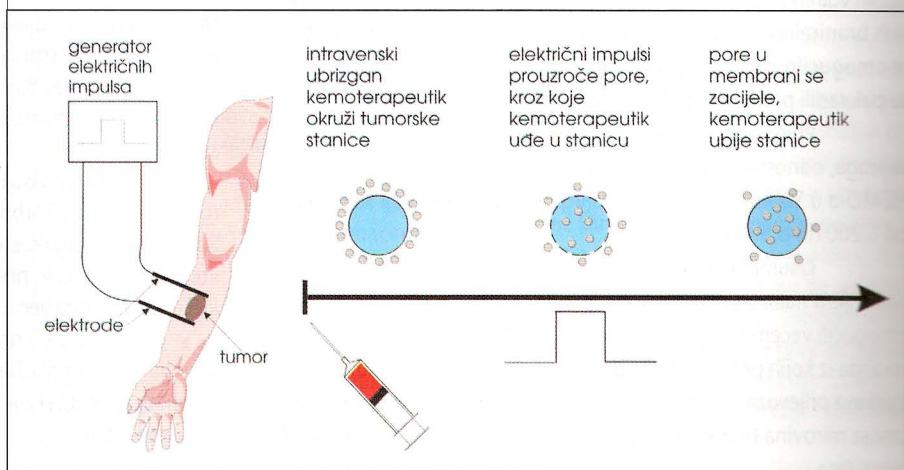
Elektrokemoterapija

Elektrokemoterapija (ECT) je jednostavan, siguran i učinkovit ne-termički način uništenja tumora koji se koristi za lokalno odstranjivanje prvenstveno kožnih i potkožnih tumora. ECT se temelji na postizanju *in vivo* elektropermeabilizacije tumorskih stanica uporabom električnih impulsa dovedenih lokalno na tumor i na primjeni lijekova za koje stanična membrana nije permeabilna, a imaju visoku intrinzičnu citotoksičnost (npr. bleomicin) ili lijekova dokazane djelotvornosti za

koje postoji niska permeabilnost stanične membrane (npr. cisplatin). Ovi lijekovi djeluju izravno na staničnu DNA i moraju biti uneseni u područje tumora prije primjene električnih impulsa. Elektropermeabilizacija stanica, kao fizički postupak koji djeluje na sve vrste tumorskih stanica, omogućava protutumorskim lijekovima ulazak u stanicu povećavajući na taj način citotoksičnost lijeka za nekoliko redova veličine. Tako se citotoksičnost cisplatina pod utjecajem električnog polja može povećati do 8000 puta, a citotoksičnost bleomicina čak do 8000 puta [Serša, 1995]. Citostatik koji je unesen u stanicu pokreće proces mitotičke stanične smrti. Koncentracija citostatika tako je mala da bez utjecaja električnog polja praktički ne stvara nepoželjne sporedne efekte na zdrave stanice, a pokazalo se da niti primijenjeno električno polje nema utjecaja na stanice samo po sebi. Samo zajednička primjena kemoterapeutika i električnog polja dovodi do uspješnog liječenja.

Elektrokemoterapija se provodi na taj način da se citostatik ubrizga u tumor lokalno ili se dovodi sistemski intravenoznim putem. Nakon toga primjenjuje se niz od 8 pravokutnih visokonaponskih impulsa trajanja 100 μ s (mikrosekundi) frekvencije 1 Hz ili 5 kHz. Vršna vrijednost naponskog impulsa ovisi o udaljenosti između i geometriji elektroda i obično se namješta u rasponu tako, da je napon prema udaljenosti od 1300 V/cm do 1500 V/cm. Naime, elektrode koje se koriste za ECT su pločaste ili iglaste. Pločaste elektrode koriste se za ECT tumora na površini kože koji su lako dostupni, a uz upotrebu pločastih elektroda metoda je u potpunosti neinvazivna. Za tretman potkožnih tumora koji su se razvili relativno duboko pod površinom kože koriste se igličaste elektrode [Miklavčič, 2006].

Za uspješnost ECT-a važno je osigurati, da električno polje u cijelom volumenu tumora postigne vrijednost dovoljnu za reverzibilnu elektropermeabilizaciju, a da u



okolnom tkivu ne prijeđe vrijednost polja kod kojeg nastaju trajna oštećenja stanične membrane koja dovode do nekroze stanica. *In vivo* i *in vitro* studije pokazale su da je uspješnost elektropermeabilizacije stanica u korelaciji s vrijednošću primijenjenog električnog polja [Miklavčič 1998; Miklavčič, 2000; Pavšelj, 2005; Miklavčič, 2006].

Na Fakultetu elektrotehnike i računarstva Sveučilišta u Zagrebu istražujemo mogućnost primjene ECT-a i elektro-genske terapije na tumorima drugih organa koji su manje dostupni od kože i potkožnog tkiva, ali su dostupni endoskopski, kao i na tumore nastale duboko u tkivu. Pri tome tražimo odgovarajuće oblike elektroda i sonde na koje su one

smještene, raspodjelu električkog polja i uvjete potrebne za osiguranje sigurnosti postupka. Istraživanja u ovom području mogu se uspješno provoditi primjenom elektro-toplinskog modela tkiva podvrgnutog elektropermeabilizaciji koji smo sami razvili [Lacković, 2007; Lacković, 2005]. Već više godina na navedenoj problematici surađujemo s Laboratorijem za biokibernetiku Elektrotehničkog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani i drugim istaknutim istraživačkim centrima u Europi [Pavlin, 2005].

Kliničke studije

Rezultati prve kliničke studije ECT-a na tumorske čvorove na glavi i vratu objavljeni su 1991. godine [Mir, 1991]. U studijama ECT-a bleomicinom i cisplatinom koje su slijedile [Mir, 1998; Heller, 1997; Serša, 2000; Blum, 2005; Byrne, 2005], najčešće je opisana terapija kožnih i potkožnih čvorova malignih melanoma, kao i Kaposijeva sarkoma, karcinoma bazalnih stanica te nekih drugih uznapredovalih tumora [Serša, 2006]. Od 1991. do 2003. godine provedeno je i dokumentirano liječenje 247 pacijenata ECT-om, pri čemu je tretirano 1009 tumorskih čvorova.

Liječeni su čvorovi primarnih tumora i tumora koji su se ponovno pojavili, samo jednim tretmanom ili višestrukim tretmanom sve dok nije primijećen odgovor tumora [Serša, 2006]. Međutim, svaki onkološki centar provodio je ECT prema vlastitom protokolu, prilagođenom opremi koju je imao (različiti generatori visokonaponskih impulsa, odnosno različite vršne vrijednosti i frekvencije impulsa), konfiguraciji elektroda, kao i citostaticima. [Puc, 2004].

Projekt ESOPE - European Standard Operating Procedures for Electrochemotherapy, pokrenut je 2003. godine u okviru 5. okvirnog programa Europske komisije u četiri europska onkološka centra: Institut Gustave-Roussy (IGR), Villejuif, Francuska; Onkološki institut u Ljubljani, Slovenija; Sveučilište u Kopenhagenu, bolnica Herlev, Herlev, Danska i Bolnica sveučilišta Mercy (National University of Irland (CCRC), Cork, Irska. Ciljevi projekta bili su određivanje:

- objektivnog i cjelovitog odgovora na liječenje (objective and complete response rate) nakon samo jednog tretmana;
- rezultata terapije u odnosu na:
- histologiju tumora,
- konfiguraciju primijenjenih elektroda,
- frekvenciju i amplitudu električnih impulsa;



Nekoliko minuta prije ECT-a uz korištenje heksagonalnog rasporeda igli.



Stanje samo 5 dana nakon ECT-a. Smanjenje obujma tumorske mase već je vidljivo kao i točke uboda iglama. Vidi se da zdravo tkivo između igli i tumora nije oštećeno tretmanom (posebice na mjestima čvorića 2 i 3).

• onkološki centar u kome se terapija provodila, te ispitivanja:

- efikasnosti bleomicina i cisplatina,
- optimalanog načina njihove primjene,
- toksičnosti i sigurnosti elektrokemoterapije.

Svi tretmani provedeni su istim generatorom visoko naponskih impulsa, razvijenim u okviru ranijeg projekta Cliniporator. Generator za ECT razvijen tom prilikom nazvan je istim imenom, CliniporatorTM, te se proizvodi u IGEA S.r.l. u Italiji.

Projekt je na temelju 41 tretiranog pacijenta, odnosno 171 tumorskog čvora pokazao rezultate vrlo slične prethodno provedenim kliničkim studijama [Marty, 2006]:

- Objektivni odgovor tumora postignut je u 85% tumorskih čvorova tretiranih ECT-om, od čega je u 73% slučajeva zabilježen cjelovit odgovor. Odgovor je postignut neovisno o histologiji tumora i načinu davanja lijeka. Liječeni su kožni i potkožni tumorski čvorovi pacijenata s uznapredovanim malignitetima različite histologije: maligni melanomi, sarkomi i karcinomi.

- Terapija se pokazala jednako uspješnom neovisno o lijeku i načinu primjene: nakon 150 dana od tretmana, uspješnim se pokazala ECT uz primjenu bleomicina u 88% slučajeva intravenski odnosno u 73% slučajeva intratumorski; kao i u 75% slučajeva kod intratumoske primjene cisplatina.

- Uspješnost tretmana tumora ne ovisi o tome da li su prije bili zračeni ili ne.

- Pokazalo se da su nepoželjni efekti uglavnom zanemarivi te se svode na kontrakciju mišića i osjećaj boli tijekom terapije. U anketi koje je bila sastavni dio istraživanja, većina pacijenata izjavila je da bi prihvatila ECT kao način liječenja tumora ponovno, ukoliko bi se pokazala opravdanom.

Za primjenu ECT-a u klinici najznačajniji rezultati ove studije su objavljeni protokoli (Standard Operating Procedures - SOP) koji propisuju koncentraciju i način davanja citostatika, izbor elektroda, vršnu vrijednost napona impulsa i frekvenciju impulsa s obzirom na pojedinačnu veličinu, broj i lokaciju tumorskih čvorova, primjenu anestezije kao i propise za praćenje samog tijeka liječenja [Mir., 2006].

Studija ESOPE potvrdila je da elektrokemoterapija [Serša, 2006, Marty, 2006]:

- pruža mogućnost potpunog izlječenja tumora (complete response) nakon samo jedne primjene ECT-a,

- efikasnost terapije ne ovisi o histologiji tumora,
- zanemarivi su sporedni efekti terapije, što je posljedica primjene vrlo niske doze citostatika i lokalne primjene električkih impulsa,
- uz primjenu lokalne anestezije nije potrebna hospitalizacija,
- kratkotrajnost terapije (do 25 minuta),
- jednostavnost u usporedbi s drugim terapijama,
- ponavljanjem terapije ne gubi se na njenoj efikasnosti, [Mir, 1998; Serša, 2000; Garbay, 2006]
- efikasnost terapije tumora koji su se pojavili nakon tretmana konvencionalnim metodama, kirurški ili radioterapijom [Mir, 1998; Serša, 1998].

Zaključak

Elektrokemoterapija se pokazala jednostavnom i efikasnom metodom liječenja kožnih i potkožnih tumora, i to nakon samo jedne primjene te uz zanemarive nepoželjne efekte.

Razvoj novih elektroda i pristupa u planiranju terapije omogućit će u skoroj budućnosti također i liječenje tumora unutarnjih organa.

ratko.magjarevic@fer.hr

•••

Literatura:

Bloom DC, Goldfarb PM. The role of intratumour therapy with electroporation and bleomycin in the management of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Surg Oncol* 2005;31:1029-35.

Byrne CM, Thompson JF, Johnston H, et al. Treatment of metastatic melanoma using electroporation therapy with bleomycin (electrochemotherapy). *Melanoma Res* 2005;15:45-51.

Garbay J, Billard V, Bernat C, Mir LM, Morsli N, Robert C. Successful repetitive treatments by electrochemotherapy of multiple unresectable Kaposi sarcoma nodules. *Eur J Cancer Suppl* 2006; 4: 29-31.

Heller R, Jaroszeski M, Perrott R, Messina J, Gilbert R. Effective treatment of B16 melanoma by direct delivery of bleomycin using electrochemotherapy. *Melanoma Res* 1997;7:10-8.

Lacković, I; Magjarević, R; Miklavčič, D. Analysis of tissue heating during electroporation based therapy: A 3D FEM model for plate electrodes. *IFMBE Proceedings*, Vol. 8, Tsukuba, 2005. Poster sessions. 58.

Lacković, I; Magjarević, R; Miklavčič, D. Analysis of Tissue Heating During Electroporation Based Therapy: A 3D FEM Model for a Pair of Needle Electrodes. *IFMBE Proceedings MEDICON* 2007, Vol. 16, Ljubljana, 2007. 631-634.

Marty M, Serša G, Garbay JR, et al. Electrochemotherapy e an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Eur J Cancer Suppl* 2006;4: 3-13.

Miklavčič D, Beravs K, Semrov D, Čemažar M, Demsar F, Serša G. The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues. *Biophys. J.* 1998; 74: 2152-2158.

Miklavčič D, Semrov D, Mekid H, Mir LM. A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1523: 73-83.

Miklavčič D, Čorović S, Pucihar G, Pavšelj N. Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy. *Eur J Cancer Suppl* 2006; 4: 45-51.

Mir LM, Belehradek M, Domenge C, et al. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial. *CR Acad Sci III* 1991;313:613-8.

Mir LM, Glass LF, Sersa G, et al. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1998;77:2336-42.

Mir LM, Glass LF, Serša G, Teissie J, Domenge C, Miklavčič D et al., Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1998; 77: 2336-2342.

Mir LM, Gehl J, Serša G et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by CliniporatorTM by means of invasive or non-invasive electrodes. *Eur J Cancer Suppl* 2006; 4: 14-25.

Pavlin, M; Kandušer, M; Rebersek, M; Pucihar, G; Hart, X., F; Magjarević, R; Miklavčič, D. Effect of cell electroporation on the conductivity of a cell suspension. *Biophysical Journal.* 88 (2005), 6: 4378-4390.

Pavšelj N, Bregar Z, Cukjati D, Batiuskaitė D, Mir LM, Miklavčič D. The course of tissue permeabilization studied on a mathematical model of a subcutaneous tumor in small animals. *IEEE Trans Biomed Eng* 2005; 52: 1373-1381.

Puc M, Čorović S, Flisar K, Petkovšek M, Nastran J, Miklavčič D. Techniques of signal generation required for electroporation. *Survey of electroporation devices.* *Bioelectrochemistry* 2004; 64: 113-124.

Sel D, Maček-Lebar A, Miklavčič D. Feasibility of employing model-based optimization of pulse amplitude and electrode distance for effective tumor electroporation. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2007; 54: 773-781.

Serša G, Čemažar M, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinium (II) in mice. *Cancer Res* 1995; 55: 3450-3455.

Serša G, Štabuc B, Čemažar M, Jančar B, Miklavčič D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: potentiation of local cisplatin antitumor effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1213-8

Serša G, Štabuc B, Čemažar M, Miklavčič D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: clinical experience in malignant melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2000;6:863-7.

Serša G, Štabuc B, Čemažar M, Miklavčič D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: Clinical experience in malignant melanoma patients. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 863-867.

Serša G. The state-of-the-art of electrochemotherapy before the ESOPE study: advantages and clinical uses. *Eur J Cancer Suppl* 2006;4:52-9.

•••