

Pet godina šire primjene elektrokemoterapije u klinici

Prof. dr.sc. Ratko Magjarević, doc. dr. sc. Igor Lacković,
Sveučilište u Zagrebu, Fakultet elektrotehnike i računarstva, Zagreb;
prof. dr. sc. Damijan Miklavčič, Sveučilište u Ljubljani,
Elektrotehnički fakultet, Ljubljana

Sažetak

• Elektrokemoterapija (EKT) je relativno novi postupak u liječenju čvrstih tumora čija je šira humana primjena započela prije otprilike pet godina. Zasnovana je na elektroporaciji, tehnici kojom se s pomoću električnog polja preko stanične membrane u njenu unutrašnjost unose različite molekule, koje inače teško prodiru kroz staničnu membranu. U slučaju EKT-a, unose se lijekovi poput bleomycina i cisplatina. U proteklih dvadeset godina, od prve primjene EKT-a bleomycinom u Institutu Gustave Roussy u Francuskoj 1991. g. [1], EKT se kao način liječenja proširio u europskim zemljama (Austrija, Italija, Danska, Irska, Španjolska, Slovenija, Mađarska, Ujedinjeno Kraljevstvo itd.), Nikaragvi. O EKT-u, kao novoj primjeni suvremene tehnologije u medicini i njoj kliničkoj pri-

mjeni za liječenje kožnih i potkožnih tumora, pisali smo prije tri godine [2]. U međuvremenu, EKT se primjenjuje i u liječenju tumora i metastaza drugih tkiva, o čemu smo se osvjedočili na 1. međunarodnom sastanku korisnika EKT-a održanom u Bolonji u studenom 2010. O prihvaćenosti EKT-a nedavno je objavljen prikaz u JAMA-i [3].

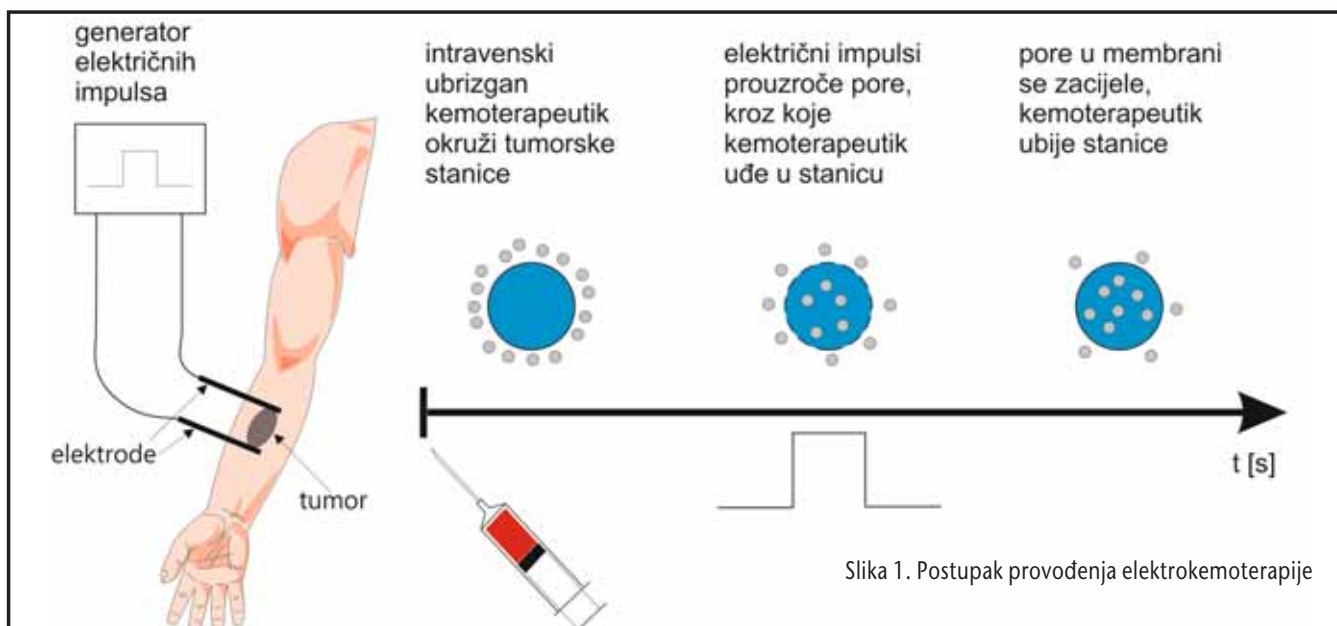
Načela elektrokemoterapije

Elektrokemoterapija (EKT) jednostavan je, siguran i učinkovit ne-termički način uništenja tumora [4] koji se klinički koristi za lokalno odstranjivanje prvenstveno kožnih i potkožnih tumora u više europskih zemalja. Temelji se na postizanju *in vivo* elektropermeabilizacije tumorskih stanica uporabom visokonaponskih električnih impulsa doveđenih lokalno na tumor tako da se značajno

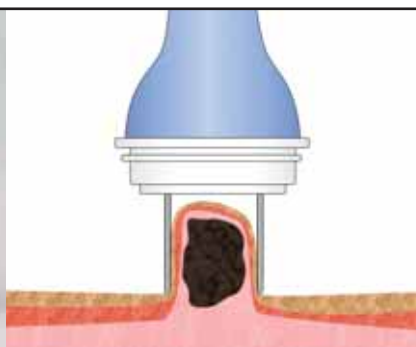
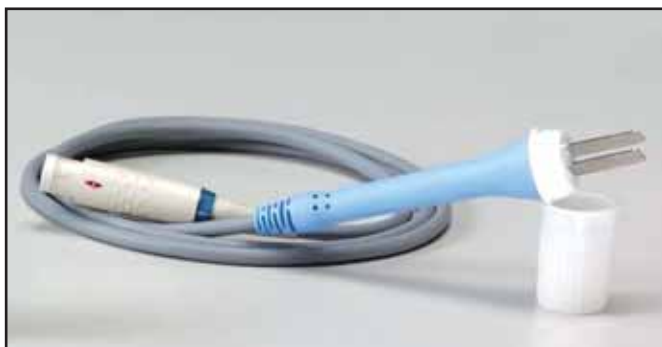
pospješuje djelotvornost lijekova za koje stanična membrana nije permeabilna, a imaju visoku intrinzičnu citotoksičnost (npr. bleomycin) ili lijekova dokazane djelotvornosti za koje postoji niska permeabilnost stanične membrane (npr. cisplatin). Lijekovi moraju biti uneseni u područje tumora prije primjene električnih impulsa. Elektropermeabilizacija stanica djeluje na sve vrste stanica i omogućava protutumorskim lijekovima koji djeluju izravno na staničnu DNA ulazak u stanicu te na taj način povećava citotoksičnost lijeka za nekoliko redova veličine [5, 6] (Sl. 1).

Bleomicin, unesen u stanicu, pokreće proces mitotičke stanične smrti. Zahvaljujući maloj koncentraciji citostatika ne stvaraju se nepoželjni sporedni efekti na zdrave stanice, a primijenjeno električno polje samo po sebi nema neželjenih utjecaja na stanice. Zajednička primjena kemoterapeutika i električnog polja dovodi do uspješnog liječenja jer uništava stanice tumora, a ima zanemarivo mali utjecaj na zdrave stanice u većini slučajeva.

EKT se provodi na taj način da se citostatik ubrizgava u tumor lokalno ili se dovodi sistemski, intravenoznim putem. Nakon određenog vremena (nekoliko minuta nakon aplikacije lijeka, kad se u tkivu postigne zadovoljavajuća koncentracija) primjenjuje se niz od 8 pravokutnih visokonaponskih impulsa jako kratkog trajanja (samo 100 μ s (mikrosekundi), frekvencije 1 Hz ili 5 kHz. Vršna vrijednost naponskog impulsa ovisi o udaljenosti između primijenjenih elektroda i o obliku elektroda. Standardno su danas u uporabi pločaste i iglaste elektrode (Sl. 2 i 3). Vršna vrijednost naponskog impulsa postavlja se obično tako da je električno polje (napon prema udaljenosti) oko 1300 V/cm. Pločaste elektrode

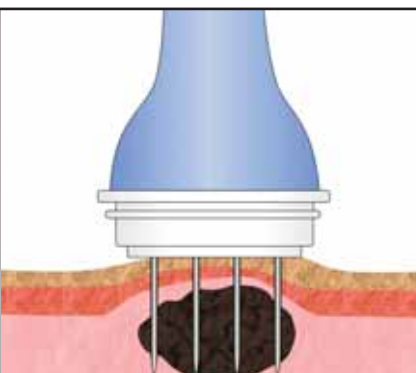


Slika 1. Postupak provođenja elektrokemoterapije



Slika 2.
Pločaste elektrode
(IGE, Carpi, Italija).

b) Tumor u naboru
kože, postavljen
između pločastih
elektroda



Slika 3.
Iglaste elektrode
(IGE, Carpi, Italija).

b) Iglaste elektrode
uvedene u
potkožni tumor

koriste se za EKT tumora na površini kože koji su lako dostupni, a uz upotrebu pločastih elektroda metoda je u potpunosti neinvazivna. Iglaste elektrode koriste se za tretman potkožnih tumora koji su se razvili relativno duboko pod površinom kože. (Slika 2. i 3.)

Za uspješnost EKT-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 [7, 8].

Na Fakultetu elektrotehnike i računarstva Sveučilišta u Zagrebu istražujemo mogućnost primjene EKT-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 projektiramo odgovarajuće elektrode (njihov oblik i dimenzije) kao i sonde na koje su one smještene, a zatim izračunavamo raspodjelu električnog polja složenim programskim alatima na računalima velike računalne snage. Također, proračunavamo elektrode i sonde tako da osiguramo uvjete potrebne za sigurnost EKT postupka [4]. Niz godina surađujemo s Laboratorijem za biokibernetiku Elektrotehničkog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani na znanstveno-istraživačkim bilateralnim projektima

(2000. - 2010.) kao i s drugim istaknutim istraživačkim centrima u Europi.

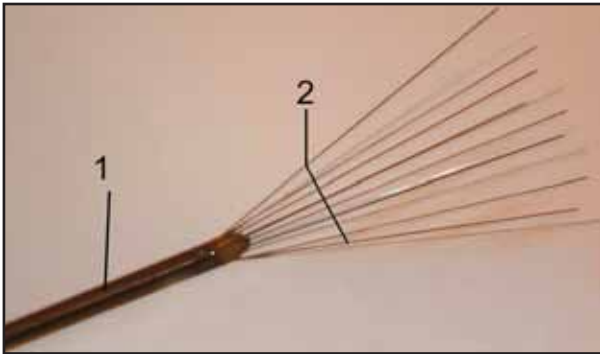
Elektrode za različite primjene elektrokemoterapije

EKT tumora kože i potkožnih tumora izvodi se pločastim (Sl. 2) ili iglastim elektrodama (Sl. 3). Elektrode prikazane na slikama 2 i 3 proizvode se industrijski i u standardnoj su kliničkoj primjeni u oko stotinjak zdravstvenih centara u Europi i širom svijeta [9, 10, 11]. Elektrode se postavljaju u položaj kojim se osigurava da cjelokupni tumor bude obuhvaćen električkim poljem iznosa većeg od granice potrebne za postizanje reverzibilnog praga permeabilizacije. Kad se radi o tumorima kože ili potkožnog tkiva, postavljanje obično nije problem jer liječnik može vidjeti granice tumora. Kod tumora unutarnjih organa i kostiju to nije slučaj, pa je bilo potrebno naći najbolji mogući način prilaganja tumoru i projektirati odgovarajuće elektrode. EKT se smatra minimalno invazivnim terapijskim postupkom, pa se do tumora nastoji doći uz minimalnu inciziju, perkutano, iglastim elektrodama. Takve su elektrode značajno dulje od onih prikazanih na Slici 3. Navlakama od izolatora navučeni na iglaste elektrode određuje se aktivno područje pojedine igle odnosno osigurava koji dio tkiva će biti obuhvaćen električkim poljem i podvrgnut elektropermeabilizaciji. Na skupu korisnika EKT-a u Bolonji u studenom 2010. prikazane su

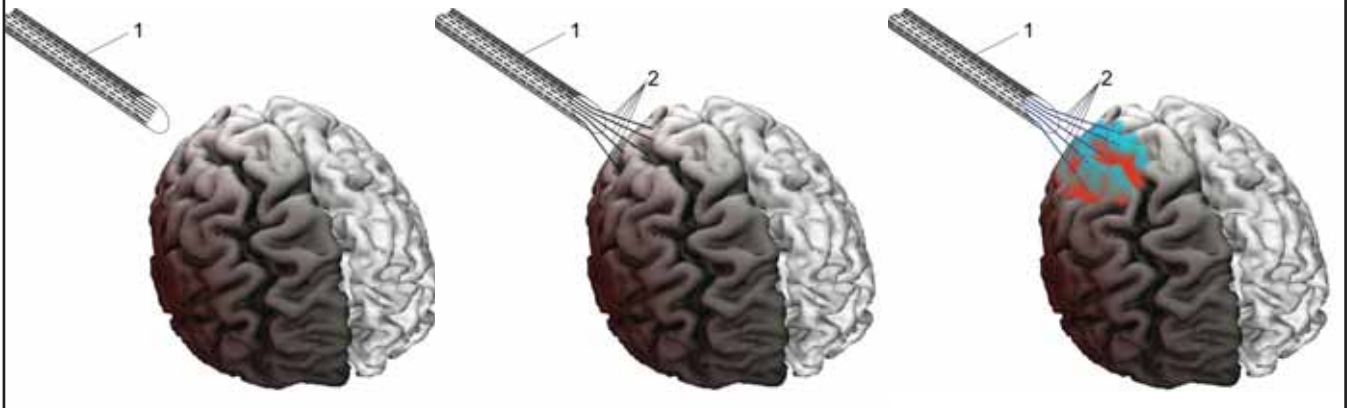
izvedbe novih elektroda razvijene u različitim istraživačkim centrima u Europi. Neke od tih novih tipova elektroda prikazujemo kroz fotografije i shematski prikaz postupka primjene. Svaki puta kad govorimo o priključivanju električkih impulsa, treba se sjetiti da je prethodno, sistemski ili lokalno u tumor, apliciran kemoterapeutik.

Na Slici 4 prikazana je kišobranasta elektroda kakva se zasada koristi na animalnim modelima za terapiju tumora mozga [12, 13]. Unutar drške (1) nalazi se nekoliko tankih, iglastih elektroda (2), koje se pomoću naprave na dršci mogu pojedinačno gurnuti u okolinu tumora u mozgu, na različitu, prethodno proračunatu dubinu. Nakon što su elektrode postavljene na željena mjesta, na pojedine parove se priključuju naponski impulsi prema unaprijed predviđenom i proračunatom redosljedu. Žice se iz drška šire prema van, tvoreći oblik krnjeg stošca oko tumora.

Metastaze u kostima (Sl. 5) tretiraju se na taj način da se perkutano, kroz pločicu (template, 2) koja omogućuje fiksiranje pojedinih elektroda, i kroz potkožno tkivo i mišić, u kost uvedu iglaste elektrode (1) promjera 1,8 mm. S pomoću navlaka od izolatora, određuje se aktivni dio elektroda (3), dakle dio elektrode koji je za vrijeme postupka EKT-a pod naponom. Nakon postavljanja, položaj elektroda se prekontrolira RTG snimkom, a električki impulsi priključuju se unaprijed određenim protokolom [15]. Na sličan način,



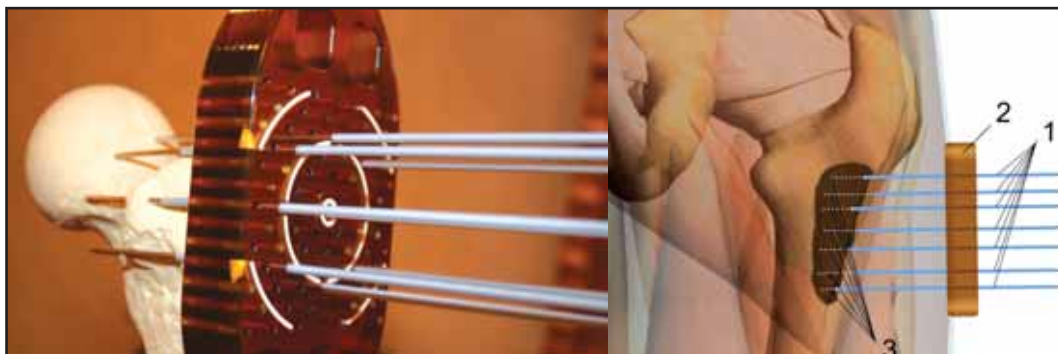
Slika 4. a) Kišobranasta" višeelektrodna sonda za EKT tumora na mozgu (Copenhagen University Hospital, Herlev, Danska). 1 - držak sonde; 2 - aktivni dio sonde s elektrodama. b) Držak sonde se postavi iznad mjesta na mozgu zahvaćenog tumorom. c) Aktivni (iglasti) dijelovi se mehanizmom na dršku sonde (nije prikazan) izvlače i prodiru u područje tumora. d) Električni impulsi dovode se na pojedine elektrode prema odgovarajućem protokolu tako da se u tumoru stvori odgovarajuće električno polje [12].



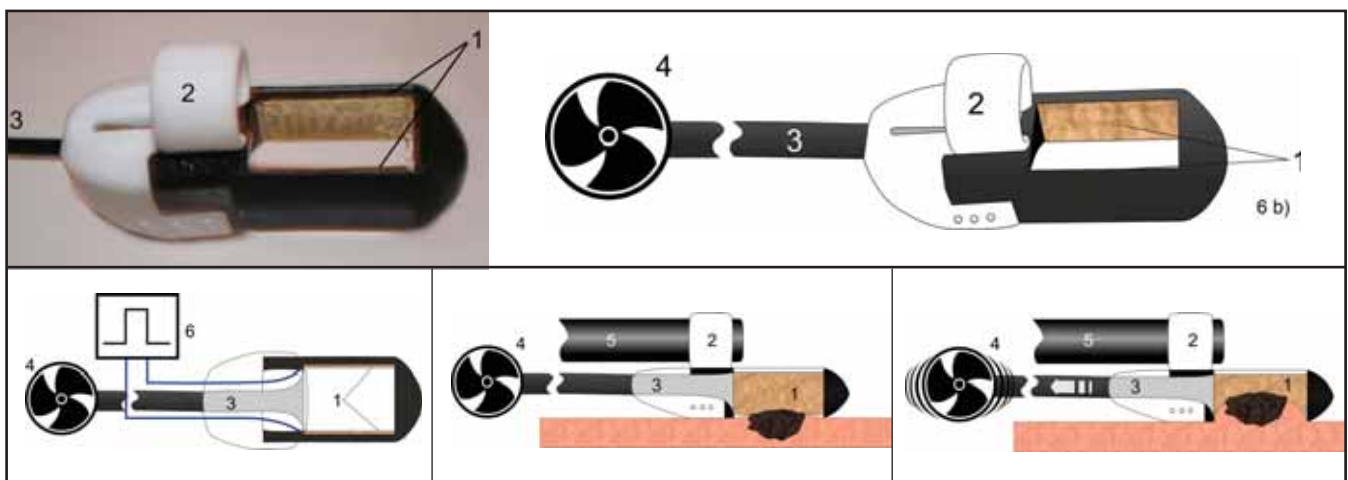
s pomoću dugačkih igala promjera 1,2 mm i pločice za fiksiranje, izvodi se i terapija tumora jetre.

Za pristup intraluminalnim tumorima (Sl. 6), predviđa se korištenje para paralelno postavljenih elektroda (1) dovedenih

do tumora na vrhu endoskopa (5) s pomoću obujmice (2) i s pomoću cjevčice (3) povezanih na sustav za usisavanje (4) [16]. Liječnik



Slika 5. a) Dugačke elektrode za EKT metastaza u kostima uvedene u model bedrene kosti. Elektrode se kroz pločicu (template) uvode i pričvršćuju u željeni položaj u kosti (Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna, Italija); b) Shematski prikaz elektroda postavljenih u metastazu u bedrenoj kosti [14].



Slika 6. a) Sonda s elektrodama razvijena za EKT intraluminalnih tumora (Cork Cancer Research Center, Cork, Irska). b) Sonda spojena na sustav za usisavanje. c) Elektrode su spojene na uređaj za EKT. d) Sonda se dovode u područje tumora. e) Sustavom za usisavanje, područje zahvaćeno tumorom usiše se među elektrode tako da se u obuhvaćenom području između elektroda stvori odgovarajuće električno polje.

može endoskopom vidjeti unutrašnjost organa, te postaviti elektrode tako da obuhvate tumor što je moguće više (Sl. 6d). Sustav za usisavanje dodatno „povuče“ oboljelo tkivo među pločice (Sl. 6e) te se u odgovarajućem trenutku na elektrode priključuju naponski impulsi (6). Na ovaj način tretirani su i prvi humani tumori debelog crijeva.

Zaključak

Posljednjih pet godina od zaključka projekta ESCOPE [17, 18] elektrokemoterapija je sve prisutnija u kliničkoj praksi, ali je za velik



Slika 7. Suvremena inačica uređaja za EKT - Cliniporator (IGEA, Carpi, Italija).

God.	Broj pacijenata	Broj kliničkih centara
2006	130	
2007	300	37
2008	600	53
2009	1300	55
2010	2000	83

Tablica 1. Broj pacijenata liječenih elektrokemoterapijom i broj centara u Europi u kojima se EKT primjenjuje

dio organa još uvijek u eksperimentalnoj fazi.

Uz nove ideje za odgovarajuće elektrodne sustave, automatizacijom planiranja terapije (proračun električnog polja) i umješnošću liječnika da pravilno uvedu elektrode, može se očekivati da EKT u narednim godinama postane klinički prihvaćena metoda

liječenja sve većeg broja tumora, nadamo se sa sve većom efikasnošću. (Više o liječničkom pogledu na EKT i njenu učinkovitost pročitajte u članku prim. dr. Egidija Čepulica u jednom od idućih brojeva).

•••••



Slika 8. Rasprostranjenost primjene EKT-a po europskim zemljama do 2010. g.

Literatura

- [1] Mir LM, Orłowski S, Belehradec J Jr, Paoletti C. Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer & Oncol* (1991), 27:68-72.
- [2] Magjarević R, Lacković I, Mir LM, Miklavčič, D. Elektrokemoterapija-metodologija i klinička primjena. *Liječničke novine* (2008), 67: 32-35.
- [3] Hampton T. Electric Pulses Help With Chemotherapy, May Open New Paths for Other Agents. *JAMA*, (2011), 305: 549-551.
- [4] Lacković I, Magjarević R, Miklavčič, D. Three-dimensional Finite-element Analysis of Joule Heating in Electrochemotherapy and in vivo Gene Electrotransfer. *IEEE Trans Die El Insul* (2009), 16: 1338-1347.
- [5] Mir LM, Banoun H, Paoletti C. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation. *Exp Cell Res* (1988), 175: 15-25.
- [6] Serša G, Čemežar M, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinium (II) in mice. *Cancer Res* (1995), 55: 3450-3455.
- [7] Miklavčič D, Čorović S, Pucihar G, Pavšelj N. Importance of tumor coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy. *Eur J Cancer Suppl.* (2006), 4: 45-51.
- [8] Miklavčič D, Beravs K, Šemrov D, Čemažar M, Demšar F, Serša G. The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues. *Biophys. J* (1998), 74: 2152-2158.
- [9] Campana LG, Mocellini S et al. Bleomycin-based electrochemotherapy: Clinical Outcome from a single Institution's Experience with 52 patients. *Ann Surg Oncol* (2009), 16:191-199.
- [10] Testori A, Tosti G, et al. Electrochemotherapy for cutaneous and subcutaneous tumor lesions: a novel therapeutic approach. *Dermatologic Therapy*, (2010), 23: 651-661
- [11] Muñoz Madero V, Ortega Pérez G. Electrochemotherapy for treatment of skin and soft tissue tumours. Update and definition of its role in multimodal therapy. *Clin Transl Oncol* (2011), 13:18-24
- [12] Mahmood F, Gehl J. Optimizing clinical performance and geometrical robustness of a new electrode device for intracranial tumor electroporation <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6W72-51WD0KG-1&_user=3875467&_coverDate=01%2F06%2F2011&_alid=1665021485&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_cdi=6614&_st=>. *Bioelectrochemistry*, In Press, Corrected Proof, Available online, 6 January 2011
- [13] Linnert M., Gehl J. Bleomycin treatment of brain tumors: an evaluation. *Anti-cancer drugs* (2009), 20(3):157-64
- [14] Bianchi G, Campanacci L, Fini M, Mercuri M. Electrochemotherapy treatment of bone metastases, izlaganje na Electrochemotherapy - 1st International users' meeting, Bologna, 2010.
- [15] Miklavčič D, Snoj M, et al. Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy. *Biomed. Eng. Online* (2010), 9: 10, <http://www.biomedical-engineering-online.com/content/9/1/10>
- [16] Soden, D.M., Sadacharam, M et al. An endoscopic system for gene and drug delivery to intraluminal tissue. *IFMBE Proceedings*, (2007), 16: 628.
- [17] Marty M, Serša G, et al. Electrochemotherapy - An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESCOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Eur. J. Cancer Suppl.* (2006), 4: 3-13.
- [18] Mir LM, Gehl J., Serša G., et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systematically or locally and electric pulses delivered by Cliniporation TM by means of invasive or non-invasive electrodes. *Eur J Cancer Suppl.* (2006), 4:14-25.