

TRANSLACIJSKI PRISTOPI KOMBINACIJE OBSEVANJA Z GENSKO TERAPIJO ALI ELEKTROKEMOTERAPIJO

Maja Čemažar

Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

Elektronski naslov: mcemazar@onko-i.si

Izvleček

Zdravljenje tumorjev s kombinacijo obsevanja in elektrokemoterapijo ali genskim elektroprenosom različnih plazmidov, ki nosijo zapis za antiangiogene molekule ali interlevkin 12 je uspešen pristop zdravljenja, ki ima potencial za translacijo v klinične študije.

Ključne besede: tumorski modeli, obsevanje, elektrokemoterapija, bleomcin, cisplatin, interlevkin-12, endoglin

Uvod

Radioterapija je eden od temeljnih terapevtskih načinov zdravljenja raka. Celice po obsevanju umirajo zaradi poškodb DNA, tako tumorske kot normalne celice. Povečano umiranje tumorskih celic po obsevanju lahko dosežemo z radiosenzibilizacijo tumorskih celic, kar pomeni, da povečamo njihovo občutljivost na obsevanje. Radiosenzibilizacijo tumorskih celic lahko dosežemo z dopolnilnim zdravljenjem z različnimi kemoterapevtiki ali pa imunomodulatornimi in antiangiogenimi pristopi.

Radiosenzibilizacija z elektrokemoterapijo s cisplatinom in bleomicinom

Elektrokemoterapija je lokalna terapija za zdravljenje tumorjev, kjer z uporabo električnih pulzov, ki jih dovedemo na tumor, povečamo učinkovitost protitumorskih kemoterapevtikov bleomicina in cisplatina. Z aplikacijo električnih pulzov na tumor povzročimo elektroporacijo celičnih membran, kar vodi v njihovo povečano permeabilnost in s tem je omogočen vstop povečane količine kemoterapevtika v celice in posledično njihovo večje protitumorsko delovanje.

V naših začetnih raziskavah smo preučili kako povečan vnos cisplatina z elektroporacijo vpliva na učinek obsevanja na modelu raka dojke na miših. Tumorje smo obsevali 20 minut po elektrokemoterapiji z intravensko aplikacijo cisplatina in dosegli 92 % popolnih odgovorov tumorjev, kar za 65 % več kot po samem obsevanju (1). Podoben radiosenzibilirajoč učinek elektrokemoterapije smo dosegli tudi na drugih tumorskih celicah in modelih (2, 3). Na modelu fibrosarkoma, smo določili faktor povečanja doze (ang. dose enhancement factor), ki je bil 1,6, kar pomeni, da je bila doza obsevanja pri kombinirani terapiji $1,6 \times$ nižja kot pri samem obsevanju za enak terapevtski učinek (3). Še boljši radiosenzibilirajoči učinek kot elektrokemoterapija s cisplatinom je imela elektrokemoterapija z bleomicinom, kjer smo na istem tumorskem modelu fibrosarkoma ugotovili, da faktor povečanja kar 1,9; doza obsevanja, kjer kontroliramo 50 % tumorjev (TCD_{50} doza) je bila pri kombinirani terapiji 12,4 Gy, pri samem

obsevanju pa 23,1 Gy (4).

Radiosenzibilizacija z elektrokemoterapijo z bleomicinom je bila signifikantna tudi pri drugih tumorskih modelih in pri različnih režimih obsevanja (enkratnim in frakcioniranim) (5). Izvedljivost in učinkovitost tovrstne terapije pa smo opisali tudi na kliničnem primeru kožnih metastaz adenokarcinoma (6).

Radiosenzibilizacija z genskim elektroprenosom

Poleg kemoterapevtikov lahko protitumorsko učinkovitost radioterapije povečamo tudi z delovanjem na ne-tumorske celice v tumorskem mikrookolju. V naših raziskavah smo se osredotočali na proučevanje radiosenzibilizacije z delovanjem na tumorsko žilje in na prirojen in pridobljen imunski odziv. Pri obeh načinih modulacije tumorskega mikrookolja smo uporabili kot dostavni sistem za terapevtske molekule plazmidno DNA, ki smo jo vnesli v celice s pomočjo elektroporacije. Za spodbujanje imunskega odziva smo uporabili genski elektroprenos plazmidne DNA z zapisom za interleukin 12 (IL-12) (7). Testirali smo dva pristopa kombinacije z obsevanjem, sistemski, kjer smo genski elektroprenos izvedli v mišico in s tem dosegli sistemsko izločanje IL-12 in lokalni, intratumorski. Kombinacija genskega elektroprenosa IL-12 v mišico in obsevanja je bila izjemno učinkovita terapija. Na modelu podkožnih tumorjev smo dosegli 100 % popolnih odgovorov v primeru fibrosarkoma LPB in 50 % popolnih odgovorov v primeru fibrosarkoma SA-1. Na modelu pljučnih metastaz fibrosarkoma SA-1 smo s predhodno stimulacijo imunskega sistema preprečili rast pljučnih metastaz; na že obstoječih metastazah, pa smo dosegli faktor povečanja doze 1,3, kar pomeni, da je bila za enak učinek potrebna 1,3 nižja doza sevanja kadar smo izvedli še genski elektroprenos IL-12 (8). Še boljši protitumorski učinek pa smo dosegli pri kombinaciji lokalnega genskega elektroprenosa IL-12 in obsevanja. Na tumorskem modelu SA-1 je bil faktor povečanja doze 2,1, ob enaki toksičnosti terapije, ki smo jo merili preko sprememb na koži v obsevalnem polju (9). Še bolj tarčno terapijo pa lahko pri genskem elektroprenosu dobimo tako, da spreminjamo dele plazmida, ki nosi zapis za terapevtski protein. V primeru IL-12 smo testirali promotor gena za p21, za katerega je znano, da se aktivira v prisotnosti poškodbe celice ali pa v, za celico, neugodnih pogojih (10). Uporaba evkariontskega promotorja ima tudi prednost pred prokariontskimi ali virusnimi, saj se le-ti v evkariontskih celicah epigenetsko utišajo (11).

Drugo področje raziskav zajema preučevanje terapij, ki ciljajo tumorsko žilje in obsevanja. Kot tarčno molekulo smo si izbrali endoglin, ki se povečano izraža v tumorskih endotelih celicah ter, kadar je inhibirana signalna pot preko vaskularnega endotelijskega faktorja. Za utišanje izražanja endoglina smo pripravili plazmidne DNA molekule z zapisom za shRNA molekule proti endoglinu, ter uporabili promotor endotelina-1, ki je specifičen za endotelijske celice. Na tumorskem modelu karcinoma dojke v miših TS/A smo dokazali dober radiosenzibilizirajoč učinek, ki se je histološko kazal v zmanjšanem številu krvnih žil in proliferajočih celic v tumorju, ter povečano nekrozo, apoptozo in hipoksijo (12). Učinek na tumorsko žilje smo dokazali tudi na modelu dorzalnega okna, kjer smo dokazali dobro korelacijo med površine žil in tumorsko perfuzijo, ki smo jo merili z lasersko Dopplersko pretočno metrijo (13). Na pomembnost imunskega mikrookolja in imuno fenotipa posameznega tumorskega modela pri testiranju novih terapij, smo pokazali v študiji, kjer smo z enakih plazmidom, kot smo ga uporabili pri tumorskem

modelu TS/A, testirali uspešnost na modelu melanoma B16F10, ki velja v primerjavi s tumorskim modelom TS/A za bolj imunogenega. V kombinaciji z obsevanjem, se je namreč pri tem tumorskem modelu izkazalo, da je za protitumorski učinek dovolj prisotnost plazmidne DNA v tumorskih celicah, ki sproži kaskado imunskega odziva preko citosolnih DNA senzorjev, saj smo že z genskim elektroprenosom plazmidne DNA brez zapisa za terapevtsko molekulo dosegli enak protitumorski učinek (14).

Zaključek

Kljub velikemu tehnološkemu napredku na področju obsevalnih tehnik, se še vedno iščejo radiobiološki pristopi, kako izboljšati protitumorsko učinkovitost radioterapije ob enaki stopnji poškodb normalnih tkiv. Tako elektrokemoterapija, kot genski elektroprenos plazmidne DNA z zapisom IL-12 in shRNA proti endoglinu so se izkazale kot uspešne terapije in primerne za translacijo v klinične študije.

Zahvala

Vse raziskave so potekale v okviru raziskovalnega programa P3-003, ki ga financira Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS).

Literatura

1. Serša G, Kranjc S, Čemažar M. Improvement of combined modality therapy with cisplatin and radiation using electroporation of tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 1037-41.
2. Kranjc S, Čemažar M, Grošel A, et al. Effect of electroporation on radiosensitization with cisplatin in two cell lines with different chemo- and radiosensitivity. *Radiol Oncol* 2003; 37(2): 101-7.
3. Kranjc S, Čemažar M, Grošel A, et al. Electroporation of LPB sarcoma cells *in vitro* and tumors *in vivo* increases radiosensitizing effect of cisplatin. *Anticancer Res* 2003; 23: 275-282.
4. Kranjc S, Cemazar M, Grosel A, et al. Radiosensitising effect of electrochemotherapy with bleomycin in LPB sarcoma cells and tumors in mice. *BMC Cancer* 2005; 5:115.
5. Kranjc S, Tevz G, Kamensek U, et al. Radiosensitizing effect of electrochemotherapy in a fractionated radiation regime in radiosensitive murine sarcoma and radioresistant adenocarcinoma tumor model. *Radiat Res* 2009; 172: 677-85.
6. Serša G, Čemažar M, Rudolf Z, et al. Adenocarcinoma skin metastases treated by electrochemotherapy with cisplatin combined with radiation. *Radiol Oncol* 1999; 33: 291-6.
7. Cemazar M, Jarm T, Sersa G. Cancer electrogene therapy with interleukin-12. *Current Gene Therapy* 2010; 10: 300-11.
8. Tevz G, Kranjc S, Cemazar M, et al. Controlled systemic release of IL-12 after gene electrotransfer to muscle for cancer gene therapy alone or in combination with ionizing radiation in murine sarcomas. *J Gene Med* 2009; 11: 1125-37.
9. Sedlar A, Kranjc S, Dolinšek T, et al. Radiosensitizing effect of intratumoral

- interleukin-12 gene electrotransfer in murine sarcoma. *BMC Cancer* 2013, 13(38): 1-20.
10. Kamensek U, Sersa G, Cemazar M. Evaluation of p21 promoter for interleukin 12 radiation induced transcriptional targeting in a mouse tumor model. *Mol Cancer* 2013; 12(1): 136.
 11. Kamenšek U, Serša G, Vidic S, et al. Irradiation, cisplatin, and 5-azacytidine upregulate cytomegalovirus promoter in tumors and muscles : implementation of non-invasive fluorescence imaging. *Mol Imaging Biol* 2011; 13(1): 43-52.
 12. Stimac M, Kamensek U, Cemazar M, et al. Tumor radiosensitization by gene therapy against endoglin. *Cancer Gene Ther* 2016; 23(7): 214-20.
 13. Savarin M, Prevc A, Rzek M, et al. Intravital monitoring of vasculature after targeted gene therapy alone or combined with tumor irradiation. *Technol Cancer Res Treat* 2018; 17: 1533033818784208.
 14. Savarin M, Kamenšek U, Čemažar M, et al. Electrotransfer of plasmid DNA radiosensitizes B16F10 tumors through activation of immune response. *Radiol Oncol* 2017; 51: 30-9.

